

Данное изобретение касается пептидомиметических соединений, фармацевтических композиций, содержащих пептидомиметические соединения, и применения пептидомиметических соединений или их композиций в качестве ингибиторов протеазы, в частности, в качестве ингибиторов сериновой протеазы, и, более конкретно, в качестве ингибиторов NS3 протеазы вируса гепатита С ("HCV"). Пептидомиметические соединения, в качестве ингибиторов NS3 протеазы HCV, в особенности полезны для нарушения жизненного цикла вируса гепатита С и для лечения или профилактики инфекции HCV или вызванных ею физиологических состояний. Настоящее изобретение также касается способов комбинированной терапии для подавления репликации HCV в клетках, либо для лечения или профилактики инфекции HCV у пациентов путем применения пептидомиметических соединений или фармацевтических композиций, или наборов и фармацевтических упаковок из них. Настоящее изобретение в качестве фармацевтических композиций охватывает композиции, включающие ингибитор сериновой протеазы HCV в сочетании с интерфероном, обладающим анти-HCV активностью; ингибитор сериновой протеазы HCV в сочетании с соединением, отличным от интерферона, обладающим анти-HCV активностью; или ингибитор сериновой протеазы HCV в сочетании как с интерфероном, обладающим анти-HCV активностью, так и соединением, отличным от интерферона, обладающим анти-HCV активностью.

Предпосылки изобретения

Зарождение HCV является и признается в качестве причины возникновения заболевания для большинства случаев, не относящихся к гепатитам А, В.

Считается, что 3% населения мира является носителями хронической формы HCV [A. Alberti et al., "Natural History of Hepatitis C," J. Hepatology. 31, (Suppl. 1), 17-24 (1999)]. Только в Соединенных Штатах процент заражения составляет 1,8% или 3,9 миллиона человек [M.J. Alter, "Hepatitis C Virus Infection in the United States," J. Hepatology. 31, (Suppl. 1), 88-91 (1999)]. Более чем у 70% из числа всех инфицированных пациентов обнаружена хроническая инфекция, которая считается основной причиной цирроза и печеночно-клеточного рака. [D. Lavanchy, "Global Surveillance and Control of Hepatitis C," J. Viral Hepatitis, 6, 35-47 (1999)].

Репликация HCV охватывает кодирование генома полипротеина из 3010-3033 аминокислот [Q.-L. Choo, et al., "Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 2451-2455 (1991); N. Kato et al., "Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 9524-9528 (1990); A. Takamizawa et al., "Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers", J. Virol., 65, 1105-1113 (1991)]. Предполагается, что неструктурированные (NS) протеины HCV обуславливают основной катализический механизм вирусной репликации. NS протеины получают путем протеолитического расщепления полипротеина [R. Bartenschlager et al., "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions", J. Virol., 67, 3835-3844 (1993); A. Grakoui et al. "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites", J. Virol., 67, 2832-2843 (1993); A. Grakoui et al., Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products", J. Virol., 67, 1385-1395 (1993); L. Tomei et al., "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein", J. Virol., 67, 4017-4026 (1993)]. Показано, что фактически первые 181 аминокислоты NS3 (остатков 1027-1207 вирусного полипротеина) содержат домен NS3 сериновой протеазы, который процессирует все четыре нисходящих участка полипротеина HCV [C. Lin et al., "Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: Trans-Cleavage Requirements and Processing Kinetics", J. Virol., 68, 8147-8157 (1994)].

NS 3 (NS3) протеин HCV подавляет активность сериновой протеазы, что способствует процессингу основных вирусных ферментов и, таким образом, считается незаменимым для репликации вируса и инфективности. Заключение о незаменимости NS3 протеазы сделано на основании того факта, что мутация в NS3 протеазу вируса желтой лихорадки снижает вирусную инфективность [T.J. Chambers et al., "Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8898-8902 (1990)]. Совсем недавно на модели шимпанзе было показано, что мутации по активному участку NS3 протеазы HCV могут полностью устранить инфекцию HCV [CM. Rice et al. "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3'-nontranslated region are essential for virus replication in vivo." J. Virol., 74(4) 2046-51 (2000)]. NS3 сериновая протеаза HCV считается также незаменимой для репликации вируса, поскольку она и связанный с ней кофактор, NS4A, способствуют процессингу всех вирусных ферментов. Очевидно, данный процессинг аналогичен процессингу, осуществляющему аспартил-протеазой вируса иммунодефицита человека ("HIV"). В дополнение продемонстрированное на человеке применение ингибиторов протеазы HIV в качестве эффективных противовирусных средств показывает, что нарушение стадии процессинга протеаза-протеин в жизненном кольце вируса не приводит к терапевтически активным агентам. Следовательно, фермент протеаза является привлекательной мишенью с точки зрения обнаружения лекарственных средств.

Описаны некоторые потенциальные ингибиторы протеазы HCV. Публикации РСТ заявок под номерами WO 00/09558, WO 00/09543, WO 99/64442, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/50230, WO 98/46630, WO 98/17679 и WO 97/43310, патент Соединенных Штатов № 5990276, M. Llinas-Brunet et al.,

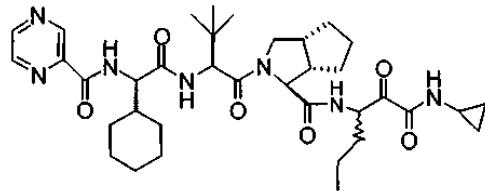
Bioorg. Med. Chem. Lett., 8, 1713-1718 (1998), W. Han et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 711-713 (2000), R. Dunsdon et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 1571-1579 (2000), M. Llinas-Brunet et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 2267-2270 (2000) и S. LaPlante et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 2271-2274 (2000), каждая ссылка описывает потенциальные ингибиторы NS3 протеазы HCV. К сожалению, отсутствуют ингибиторы сериновой протеазы, приемлемые в настоящее время в качестве анти-HCV агентов.

Фактически отсутствуют анти-HCV методы лечения, за исключением интерферона- α , комбинации интерферон- α /рибавирина и ставшего известным совсем недавно ПЭГилированного интерферона- α . Однако показатели задержки ответа при лечении интерфероном- α и интерфероном- α /рибавирином являются низкими (<50%), а обнаруживаемые побочные действия значительные и тяжелые [M.A. Walker, "Hepatitis C Virus: an Overview of Current Approaches and Progress," DDT, 4, 518-529 (1999); D. Moradpour et al., "Current and Evolving Therapies for Hepatitis C," Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 11, 1199-1202 (1999); H.L.A. Janssen et al., "Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis," J. Hepatol., 21, 241-243 (1994) и P.F. Renault et al., "Side effects of alpha interferon", Seminars in Liver Disease 9, 273-277, (1989)]. Кроме того, лечение интерфероном вызывает долговременное облегчение только в части случаев (~25%) [O. Weiland, "Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection", FEMS Microbiol. Rev., 14, 279-288 (1994)]. Указанные выше проблемы, связанные с лечением интерфероном- α , привели к разработке и клиническому испытанию соединений, являющихся ПЭГилированными производными интерферона- α , которые обеспечивают улучшенные методы анти-HCV лечения.

Ввиду сложившейся в настоящее время ситуации в отношении анти-HCV лечения, очевидно, что существует потребность в более эффективных и лучше переносимых методах лечения.

Краткое описание изобретения

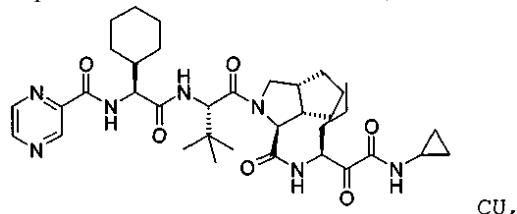
Настоящее изобретение касается пептидомиметического соединения формулы



BW,

его фармацевтически приемлемой соли или пролекарства, или сольваты указанного соединения, его соли или пролекарства.

Настоящими заявителями представлено также соединение, имеющее структурную формулу



CU,

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство, или сольват указанного соединения, его соли или пролекарства.

Изобретение также касается фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы BW или CU и фармацевтически приемлемый носитель.

Еще один аспект изобретения составляют фармацевтические композиции, содержащие соединение формулы BW или CU, интерферон, обладающий противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение также касается вышеуказанной композиции, дополнительно содержащей соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, где указанное соединение отлично от интерферона.

В следующем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы BW или CU, соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, и фармацевтически приемлемый носитель, где указанное соединение отлично от интерферона.

Указанное соединение формулы BW или CU, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, каждый присутствует в вышеуказанной композиции в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

При этом указанный интерферон предпочтительно выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2B, пэгилированный интерферон альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2A, лимфобластоидный интерферон и интерферон tau; а указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интер-

лейкин 6, интерлейкин 12, соединения, усиливающие развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

В следующем аспекте изобретение касается применения соединения формулы BW или CU для получения лекарственного средства для ингибирования протеазы HCV.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы BW или CU для получения лекарственного средства для лечения пациента, страдающего от инфекции, вызванной HCV, или связанных с инфекцией физиологических состояний.

В следующем аспекте изобретение направлено на применение соединения формулы BW или CU в комбинации с фармацевтически эффективным количеством другого анти-HCV терапевтического средства для получения лекарственного средства для лечения пациента, страдающего от инфекции, вызванной HCV, или связанных с инфекцией физиологических состояний.

Предпочтительным анти-HCV терапевтическим средством является интерферон или производное интерферона.

Изобретение также относится к применению соединения формулы BW или CU в комбинации с интерфероном, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гепатита C, у нуждающегося в таком лечении пациента.

Кроме того, в следующем аспекте настоящее изобретение касается применения соединения формулы BW или CU в комбинации с соединением, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гепатита C у нуждающегося в таком лечении пациента, где указанное соединение отлично от интерферона.

Предпочтительно указанное соединение формулы BW или CU и указанный интерферон, каждый, присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

Указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2B, пэгилированный интерферон альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2A, лимфобластоидный интерферон и интерферон tau.

Изобретение также относится к применению соединения формулы BW или CU в комбинации с интерфероном, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, и соединением, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гепатита C у нуждающегося в таком лечении пациента, где указанное соединение отлично от интерферона.

Указанное соединение формулы BW или CU, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

Указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2B, пэгилированный интерферон альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2A, лимфобластоидный интерферон и интерферон tau; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединение, усиливающее развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

В следующем аспекте изобретение направлено на применение соединения формулы BW или CU, и интерферона, обладающего противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C для получения лекарственного средства для ингибирования репликации вируса гепатита C в клетке.

Указанное лекарственное средство может дополнительно содержать соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, где указанное соединение отлично от интерферона.

Изобретение касается также применения соединения формулы BW или CU и соединения, обладающего противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, где указанное соединение отлично от интерферона, для получения лекарственного средства для ингибирования репликации вируса гепатита C в клетке.

Указанное соединение формулы BW или CU, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита C, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

Предпочтительно указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2B, пэгилированный интерферон альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2A, лимфобластоидный интерферон и интерферон tau; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью

в отношении вируса гепатита С, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединение, усиливающее развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

Настоящее изобретение касается также способа ингибирования репликации вируса гепатита С в клетке *in vitro*, включающего контактирование указанной клетки с соединением формулы BW или CU, и интерфероном, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С.

Причем способ по изобретению может дополнительно включать контактирование указанной клетки с соединением, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

В следующем аспекте настоящее изобретение направлено на способ ингибирования репликации вируса гепатита С в клетке *in vitro*, включающий контактирование указанной клетки с соединением формулы BW или CU, и соединением, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

При этом указанное соединение формулы BW или CU, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое эффективное количество и их комбинацию, а указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2B, пэгилированный интерферон альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2A, лимфобластоидный интерферон и интерферон tau; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединение, усиливающее развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

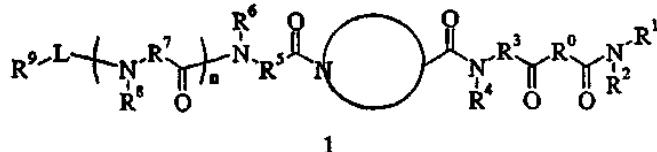
Настоящее изобретение также касается набора, включающего ряд отдельных контейнеров, где по меньшей мере один из указанных контейнеров содержит ингибитор сериновой протеазы вируса гепатита С формулы BW или CU и по меньшей мере еще один из указанных контейнеров содержит интерферон, обладающий противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к набору, включающему ряд отдельных контейнеров, где по меньшей мере один из указанных контейнеров содержит ингибитор сериновой протеазы вируса гепатита С формулы BW или CU и по меньшей мере еще один из указанных контейнеров содержит соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона, а также к набору, включающему ряд отдельных контейнеров, где по меньшей мере один из указанных контейнеров содержит ингибитор сериновой протеазы вируса гепатита С формулы BW или CU, по меньшей мере еще один из указанных контейнеров содержит интерферон, обладающий противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, и по меньшей мере еще один из указанных контейнеров содержит соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

Предпочтительно указанный ингибитор сериновой протеазы вируса гепатита С, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, каждый присутствует в количестве выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

Предпочтительно указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2B, пэгилированный интерферон альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2A, лимфобластоидный интерферон и интерферон tau; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединение, усиливающее развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

Соединения настоящего изобретения вышеуказанных формул BW или CU входят в группу новых пептидомиметических соединений формулы 1, разработанную авторами настоящего изобретения:



где

R^0 означает связь или дифторметилен;

R^1 означает водород, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную циклическую группу или необязательно замещенную ароматическую группу;

каждый из R^2 и R^9 независимо означает необязательно замещенную алифатическую группу, необя-

зательно замещенную циклическую группу или необязательно замещенную ароматическую группу;

каждый из R³, R⁵ и R⁷ независимо означает (необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную циклическую группу или необязательно замещенную ароматическую группу)(необязательно замещенный метилен или необязательно замещенный этилен), необязательно замещенный (1,1- или 1,2-)циклоалкилен или необязательно замещенный (1,1- или 1,2-)гетероцикликлен;

каждый из R⁴, R⁶, R⁸ и R¹⁰ независимо означает водород или необязательно замещенную алифатическую группу;



означает замещенный моноциклический азагетероциклик или необязательно замещенный полициклический азагетероциклик, или необязательно замещенный полициклический азагетероцикленил, где ненасыщенность находится в кольце, дистальном по отношению к кольцу, несущему R⁹-L-(N(R⁸)-R⁷-C(O)-)_nN(R⁶)-R⁵-C(O)-N группу, и к которому присоединена группа -C(O)-N(R⁴)-R³-C(O)C(O)NR²R¹;

L означает -C(O)-, -OC(O)-, -NR¹⁰C(O)-, -S(O)₂- или -NR¹⁰S(O)₂- и n равно 0 или 1, или

его фармацевтически приемлемой соли или пролекарства, или сольваты указанного соединения, его соли или пролекарства, при условии, что когда



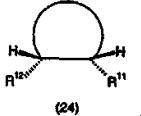
означает замещенный



то L означает -OC(O)- и R⁹ означает необязательно замещенную алифатическую группу или по меньшей мере один из R³, R⁵ и R⁷ означает (необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную циклическую группу или необязательно замещенную ароматическую группу)(необязательно замещенный этандиил), или R⁴ означает необязательно замещенную алифатическую группу.

Соединения формулы 1 могут быть получены из промежуточного соединения - хирального соединения бициклопролината, который, в свою очередь, может быть получен стереоселективным способом включающим следующие стадии:

(а) расщепления и циклизации соединения формулы 24



где

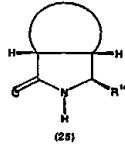


означает необязательно замещенный циклоалкил или необязательно замещенный конденсированный арилциклоалкил;

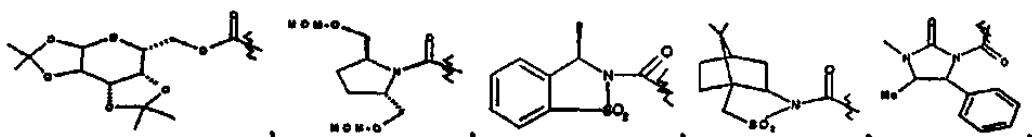
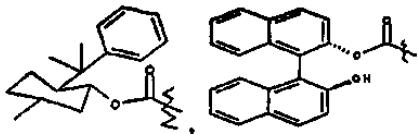
R¹¹ означает -CO₂R¹³;

R¹² означает иминный аддукт глицинамида;

R¹³ означает кислотную защитную группу или необязательно замещенную алифатическую группу; в условиях расщепления и циклизации, с образованием соединения формулы 25



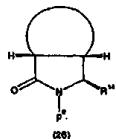
где R¹⁴ означает -CONR¹⁵R¹⁵, -CN;



или $-\text{CO}_2\text{R}^{16}$;

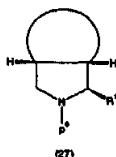
R^{15} означает необязательно замещенную алифатическую группу; R^{16} означает кислотную защитную группу, необязательно замещенную арильную группу или необязательно замещенную алифатическую группу; и

(b) защиты азота лактамовой группы в соединении формулы 25 амидной защитной группой с образованием соединения формулы 26

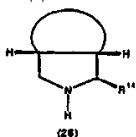


где P° означает амидную защитную группу; R^{14} принимает вышеуказанные значения; и

(c) восстановления соединения формулы 26 в условиях восстановления с образованием соединения формулы 27

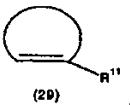


где P° и R^{14} принимают указанные выше значения; и (d) снятия защиты соединения формулы 27, в условиях для снятия защиты, с образованием соединение формулы 28



где R^{14} принимает указанные выше значения.

Указанный выше способ синтеза может дополнительно включать стадию, где соединение формулы 24 получают, осуществляя присоединение иминного соединения глициниамида к соединению формулы 29 по реакции Михаэля



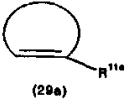
где



означает необязательно замещенный циклоалкенил или необязательно замещенный конденсированный арилциклоалкенил;

R^{11} означает $-\text{CO}_2\text{R}^{13}$;

где соединение формулы 29 может быть получено этерификацией соединения формулы 29a



где



означает необязательно замещенный циклоалкенил или необязательно замещенный конденсированный арилциклоалкенил;

R^{11a} означает $-\text{CHO}$, $-\text{COR}^{15}$, $-\text{C}\equiv\text{N}$ или $-\text{CONR}^{15}\text{R}^{15}$ и

R^{15} принимает указанные выше значения.

Следует отметить, что специалисту в данной области хорошо известно, что конверсия кетонов до сложных эфиров может быть осуществлена, например, по реакции Байера-Виллигера. Конверсия нитрилов и амидов до сложных эфиров может быть осуществлена, например, путем водного гидролиза с последующей этерификацией. Конверсия альдегидов до сложных эфиров может быть осуществлена, например, окислением альдегида с последующей этерификацией.

Краткое описание чертежей

Указанные выше и другие аспекты, особенности и преимущества настоящего изобретения будут лучше поняты из последующего подробного описания, рассматриваемого в совокупности с приложенными чертежами, все из которых приведены только с целью иллюстрации и не ограничивают настоящее изобретение.

На фиг. 1 показано ингибирование аккумуляции HCV репликона РНК после 48-часовой обработки репликонсодержащих клеток соединением СU и интерфероном-альфа 2В, по отдельности или в комбинации.

На фиг. 2 графически представлены вогнутые изоболические кривые, даваемые соединениями, используемыми в комбинации, являющимися антагонистическими, аддитивными и синергическими, согласно методам синергического расчета Greco, Park and Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327).

На фиг. 3 показана геометрическая зависимость между а и величиной кривизны изоболы. Гипотетическая изобола при уровне эффекта E=50% изображается прямолинейной изоболой, которая ожидается при аддитивности. М является точкой пересечения линии $y=x$ и гипотетической изоболы. N является точкой пересечения линии $y=x$ и прямолинейной изоболы. О означает исходную точку (0,0). S является мерой степени кривизны изоболы, где $S=ON/OM$. ON означает расстояние от О до N и OM означает расстояние от О до М. Параметр а связан с S уравнением $\alpha = 4(S^2 - S)$.

На фиг. 4 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения СU и интерферона-альфа 2В (Schering-Plough) с использованием 6 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 1.

На фиг. 5 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения СU и интерферона-альфа 2А с использованием 6 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 2.

На фиг. 6 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения СU и интерферона-альфа 2В (Schering-Plough) с использованием 8 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 3.

На фиг. 7 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения СU и интерферона-альфа 2А с использованием 8 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 4.

На фиг. 8 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения СU и овечьего интерферона tau с использованием 8 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 5.

На фиг. 9 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения ЕС и интерферона-альфа 2В (Schering-Plough) с использованием 8 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 6.

На фиг. 10 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения ЕС и интерферона-альфа 2А с использованием 8 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 7.

На фиг. 11 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения СU и интерферона бета с использованием 8 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 8.

На фиг. 12 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации соединения ЕР и интерферона-альфа 2В (Schering-Plough) с использованием 8 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 9.

На фиг. 13 приведены расчеты изобол по методу Greco и др., см. выше, для комбинации рибавирина и интерферона альфа-2В (Schering-Plough) с использованием 8 разбавлений каждого соединения согласно эксперименту 10.

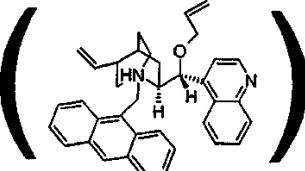
На фиг. 14 показано ингибирование аккумуляции HCV репликона РНК, вызванное обработкой содержащих репликон клеток либо (А) только рибавирином, либо (В) только интерфероном альфа-2В. Для обеих групп показаны как измеренное ингибирование, так и ингибирование с поправкой на цитотоксичность соединений.

Подробное описание изобретения

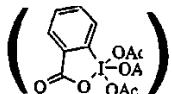
Содержание каждого из патентных документов и других приведенных ссылок полностью включено в данное описание посредством ссылок.

Как использовано выше и во всем описании изобретения, следует считать, что указанные ниже обозначения, если не оговорено особо, имеют следующие значения:

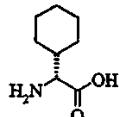
<u>Обозначение</u>	<u>Реагент или фрагмент</u>
ACN	ацетонитрил
AIBN	2,2'-азобisisобутиронитрил
ВОС или Вос	трет-бутилкарбамат
BOP	бензотриазол-1-ил-окситрис (диметиламино) фосфонийгексафторфосфат
n-Bu ₃ SnH	гидрид три-n-бутилолова
t-Bu	трет-бутил
Cbz	бензилкарбамат
хиральный РТС	хиральный межфазный катализатор (хиральный МФК)



DAST	(диэтиламино) сератрифтогид (Et ₂ NFSF ₃)
DCC	дициклокарбодиимид
DCM	дихлорметан (CH ₂ Cl ₂)
DIBAL-H	дизобутилалюминийгидрид
DIC	1, 3-дизопропилкарбодиимид
DIPEA	дизопропилэтамин
DMAP	4-(N, N-диметиламино) пиридин
DMP реагент	реагент Десс-Мартина - периодинан (Periodinane)



ДМФ	диметилформамид
ДМСО	диметилсульфоксид
ЭА	элементный анализ
EDCI	1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид·HCl
Экв.	эквивалент (ы)
Et	этил
Et ₂ O	диэтиловый эфир
EtOH	этанол
EtOAc	этилацетат
Et ₃ Si	триэтилсилан
FMOC	9-флуоренилметоксикарбонил



H-Chg-OH →

HOAt	1-гидрокси-7-азабензотриазол
HOBT	1-гидроксибензотриазол
HOBu	N-гидроксисукциниамид
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
LAH	литийалюминогидрид
Me	метил
MeI	метилиодид
MeOH	метанол
MeOC(O)Cl	метилхлорформиат
MOMCl	метоксиметилхлорид
MOM	метоксиметил
MC	масс-спектроскопия
NaBH ₄	боргидрид натрия
Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆	тартрат натрия
NMP	N-метилпирролидинон
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
P-	полимерная связь
PyBOP	бензотриазол-1-илокситрипирролидинофосфонийгексафторфосфат
TBD	1, 5, 7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ен
ОФ-ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой
TBSCl	трет-бутилдиметилсиланхлорид
TCA	трихлоруксусная кислота
TFA	трифтормуксусная кислота
Tf ₂ O	трифлатангидрид (ангидрид трифторметансульфоновой кислоты)
TГФ	тетрагидрофуран
THP	тетрагидропиран
TCX	тонкослойная хроматография

Как использовано выше и во всем описании изобретения, следует считать, что указанные ниже термины, если не оговорено особо, имеют следующие значения.

"Кислотная биостера" означает группу, обладающую химическими и физическими подобиями, обусловливающими биологические характеристики, близко схожие с карбоксильной группой (см., Lipinski, Annual Reports in Medicinal Chemistry, "Bioisosterism In Drug Design" 21, 283 (1986); Yun, Hwahak Sekye, "Application Of Bioisosterism To New Drug Design" 33, 576-579, (1993); Zhao, Huaxue Tongbao, "Bioisosteric Replacement and Development Of Lead Compounds In Drug Design" 34-38, (1995); Graham, Theochem, "Theoretical Studies Applied To Drug Design:ab initio Electronic Distributions In Bioisosteres" 343, 105-109, (1995)). Характерные примеры кислотных биостер включают -C(O)-NHOH, C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, сульфо, фосфоно, алкилсульфонилкарбамоил, тетразолил, арилсульфонилкарбамоил, N-метоксикарбамоил, гетероарилсульфонилкарбамоил, 3-гидрокси-3-циклобутен-1,2-дион, 3,5-диоксо-1,2,4-оксадиазолидинил или гидроксигетероарил, такой как 3-гидроксизоксазолил, 3-гидрокси-1-метилпиразолил и тому подобное.

"Кислотная функциональная группа" означает группу, несущую кислотный водород. Характерные примеры кислотных функциональных групп включают карбоксил (-C(O)OH), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, сульфо, фосфоно, алкилсульфонилкарбамоил, тетразолил, арилсульфонилкарбамоил, N-метоксикарбамоил, гетероарилсульфонилкарбамоил, 3-гидрокси-3-циклобутен-1,2-дион, 3,5-диоксо-1,2,4-оксадиазолидинил или гидроксигетероарил, такой как 3-гидроксизоксазолил, 3-гидрокси-1-метилпиразолил, и тому подобное, и подходящий гидрокси, такой как ароматический гидрокси, например гидроксифенил.

"Кислотная защитная группа" означает легко удаляемую группу, которая, как известно в данной области, защищает кислотный водород или карбоксильную группу от нежелательной реакции во время синтеза, например блокирует или защищает кислотную функциональность в то время, как осуществляются взаимодействия, затрагивающие другие функциональные участки соединения, и может быть избирательно удалена. Такие кислотные защитные группы хорошо известны специалистам в данной области и широко используются для защиты карбоксильных групп, как описано в патенте США № 3840556 и 3719667, содержание которых включено в данное описание посредством ссылок. В отношении подходящих кислотных защитных групп см., T.W. Green and P.G.M. Wuts in "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley and Sons, 1991. Кислотная защитная группа также включает описанную в данном описании неустойчивую к гидрированию кислотную защитную группу. Характерные примеры кислотных защитных групп включают сложные эфиры, такие как замещенные и незамещенные C₁₋₈-назывшие алкиловые эфиры, например метиловый, этиловый, трет-бутиловый, метоксиметиловый, метилтиометиловый, 2,2,2-трихлорэтиловый и тому подобное, тетрагидропиранил, замещенный и незамещенный фенилалкил, такой как бензил и его замещенные производные, такие как алcoxисибензильная или нитробензильная группы и тому подобное, циннамил, диалкиламиноалкил, например диметиламиноэтил и тому подобное, триметилсилил, замещенные и незамещенные амиды и гидразиды, например амиды и гидразиды N,N-диметиламина, 7-нитроиндола, гидразина, N-фенилгидразина и тому подобное, ацилоксиалкильные группы, такие как пивалоилоксиметил или пропионилоксиметил и тому подобное, ароилоксиалкил, такой как бензоилоксиметил и тому подобное, алcoxисикарбонилалкил, такой как метоксикарбонилметил, циклогексилоксикарбонилметил и тому подобное, алcoxисикарбонилоксиалкил, такой как трет-бутилоксикарбонилоксиметил и тому подобное, алcoxисикарбониламиноалкил, такой как трет-бутилоксикарбониламиноалкил и тому подобное, алкиламинокарбониламиноалкил, такой как метиламинокарбониламиноалкил и тому подобное, ациламиноалкил, такой как ацетиламиноалкил и тому подобное, гетероцикликкарбонилоксиалкил, такой как 4-метилпiperазинилкарбонилоксиметил и тому подобное, диалкиламинокарбонилалкил, такой как диметиламинокарбонилметил и тому подобное, (5-(низший алкил)-2-оксо-1,3-диоксолен-4-ил)алкил, такой как (5-трет-бутил-2-оксо-1,3-диоксолен-4-ил)метил и тому подобное, и (5-фенил-2-оксо-1,3-диоксолен-4-ил)алкил, такой как (5-фенил-2-оксо-1,3-диоксолен-4-ил)метил и тому подобное.

"Неустойчивая к кислоте аминозащитная группа" означает указанную аминозащитную группу, которая легко удаляется при обработке кислотой, хотя остается сравнительно стабильной по отношению к другим реагентам. Предпочтительной неустойчивой к кислоте аминозащитной группой является BOC.

"Алифатический" означает указанный в данном описании алкил, алкенил или алкинил.

"Заместитель (заместители) алифатической группы" означает заместители, присоединенные к указанной алифатической группе, включающие арил, гетероарил, гидрокси, алcoxиси, циклилокси, арилокси, гетероарилокси, ацил или его тиоксо-аналог, циклилкарбонил или его тиоксо-аналог, ароил или его тиоксо-аналог, гетероароил или его тиоксо-аналог, ацилокси, циклилкарбонилокси, ароилокси, гетероароилокси, галоген, нитро, циано, карбокси (кислота), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, сульфо, фосфоно, алкилсульфонилкарбамоил, тетразолил, арилсульфонилкарбамоил, N-метоксикарбамоил, гетероарилсульфонилкарбамоил, 3-гидрокси-3-циклобутен-1,2-дион, 3,5-диоксо-1,2,4-оксадиазолидинил или гидроксигетероарил, такой как 3-гидроксизоксазолил, 3-гидрокси-1-метилпиразолил, алcoxисикарбонил, циклилоксикарбонил, арилоксикарбонил, гетероарилоксикарбонил, алкилсульфонил, арилсульфонил, гетероарилсульфонил, алкилсульфинил, циклилсульфинил, арилсульфинил, гетероарилсульфинил, алкилсульфинил, циклилсульфинил, арил-

сульфинил, гетероарилсульфинил, алкилтио, циклилтио, арилтио, гетероарилтио, циклил, арилдиазо, гетероарилдиазо, тиол, метилен ($H_2C=$), оксо ($O=$), тиоксо ($S=$), Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$, $Y^1X^2YNSO_2-$ или $Y^3SO_2NY^1-$, где R^2 принимает указанные выше значения, Y^1 и Y^2 независимо означают водород, алкил, арил или гетероарил и Y^3 означает алкил, циклоалкиларил или гетероарил, или в случае, когда заместитель означает Y^1Y^2N- , один из Y^1 и Y^2 может означать указанные ацил, цикликарбонил, ароил, гетероароил, алcoxикарбонил, циклоксикарбонил, арилоксикарбонил или гетероарилоксикарбонил, а другой из Y^1 и Y^2 имеет значения, указанные выше, или в случае, когда заместитель означает $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ или $Y^1Y^2NSO_2-$, Y^1 и Y^2 могут вместе с атомом N, через который связан каждый из Y^1 и Y^2 , образовывать 4-7-членный азагетероциклик или азагетероцикленил. Кислотными/амидными заместителями алифатических групп являются карбокси (кислота), $-C(O)-NHOH$, $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-CH_2SH$, $-C(O)-NH-CN$, сульфо, фосфоно, алкилсульфонилкарбамоил, тетразолил, арилсульфонилкарбамоил, N-метоксикарбамоил, гетероарилсульфонилкарбамоил, 3-гидрокси-3-циклобутен-1,2-дион, 3,5-диоксо-1,2,4-оксадиазолидинил или гидроксигетероарил, такой как 3-гидроксизоксазолил, 3-гидрокси-1-метилпиразолил и Y^1Y^2NCO- . Некислотными полярными заместителями алифатических групп являются гидрокси, оксо ($O=$), тиоксо ($S=$), ацил или его тиоксо-аналог, цикликарбонил или его тиоксо-аналог, ароил или его тиоксо-аналог, гетероароил или его тиоксо-аналог, алcoxикарбонил, циклоксикарбонил, арилоксикарбонил, гетероарилоксикарбонил, ацилокси, цикликарбонилокси, ароилокси, гетероароилокси, алкилсульфонил, циклизульфонил, арилсульфонил, гетероарилсульфонил, алкилсульфинил, циклизульфини арилсульфинил, гетероарилсульфинил, тиол, Y^1Y^2N- , $Y^1Y^2NC(O)-$, $Y^1Y^2NC(O)O-$, $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ или $Y^1Y^2NCO_2-$. Характерные примеры алифатических групп с алифатической группой в качестве заместителя включают метоксиметокси, метокситокси, этокситокси, (метокси, бензилокси, фенокси или этокси)карбонил(метил или этил), бензилоксикарбонил, пиридилметилоксикарбонилметил, метокситил, этокситетил, н-бутокситетил, циклопентилметилокситетил, феноксипропил, феноксиаллил, трифторметил, циклопропилметил, циклопентилметил, карбокси(метил или этил), 2-фенетенил, бензилокси, 1- или 2-нафтилметокси, 4-пиридилметилокси, бензилокситетил, 3-бензилоксиаллил, 4-пиридилметилокситетил, 4-пиридилметилоксиаллил, бензил, 2-фенетил, нафтилметил, стирил, 4-фенил-1,3-пентадиенил, фенилпропинил, 3-фенилбут-2-инил, пирид-3-илацетиленил и хинолин-3-илацетиленил, 4-пиридилэтенил, 4-пиридилвинил, тиенилэтенил, пиридилэтенил, имидазолилэтенил, пиразинилэтенил, пиридилпентенил, пиридилгексенил и пиридилгептенил, тиенилметил, пиридилметил, имидазолилметил, пиразинилметил, тетрагидропиранилметил, тетрагидропиранилметил и тому подобное.

"Ацил" означает $H-CO-$ или (алифатическую или циклик)- $CO-$ группу, где алифатическая группа принимает указанные значения. Предпочтительные ацилы содержат низший алкил. Характерные примеры ацильных групп включают формил, ацетил, пропаноил, 2-метилпропаноил, бутаноил, пальмитоил, акрилоил, пропеноил, циклогексилкарбонил и тому подобное.

"Алкениоил" означает алкенил- $CO-$ группу, где алкенил принимает указанные значения.

"Алкенил" означает алифатическую углеводородную группу, содержащую углерод-углеродную двойную связь, указанная группа может быть линейной или разветвленной и содержит приблизительно 2-15 атомов углерода в цепи. Предпочтительные алкенильные группы содержат 2-12 атомов углерода в цепи и, более предпочтительно, 2-4 атома углерода в цепи. "Разветвленный" означает, что одна или более низших алкильных групп, таких как метил, этил или пропил, присоединены к линейной алкенильной цепи. "Низший алкенил" означает приблизительно 2-4 углеродных атома в цепи, которая может быть линейной или разветвленной. Характерные примеры алкенильных групп включают этенил, пропенил, н-бутиенил, изобутиенил, 3-метилбут-2-енил, н-пентенил, гептенил, октенил, циклогексилбутенил, деценил и тому подобное. "Замещенный алкенил" означает указанную алкенильную группу, замещенную одним или более "заместителями алифатической группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные значения. Примеры заместителей алкенильной алифатической группы включают галоген или циклоалкильные группы.

"Алкенилокси" означает алкенил- $O-$ группу, где алкенильная группа является такой, как указано выше. Характерные примеры алкенилоксигрупп включают аллилокси, 3-бутиенилокси и тому подобное.

"Алcoxики" означает алкил- $O-$ группу, где алкильная группа является такой, как указано выше. Характерные примеры алcoxикарбонильных групп включают метоксикарбонил, этоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил и тому подобное.

"Алcoxикарбонил" означает алкил- $O-CO-$ группу, где алкильная группа является такой, как указано выше. Характерные примеры алcoxикарбонильных групп включают метоксикарбонил, этоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил и тому подобное.

"Алкил" означает алифатическую углеводородную группу, которая может быть линейной или разветвленной и содержит приблизительно 1-20 атомов углерода в цепи. Предпочтительные алкильные группы содержат приблизительно 1-12 атомов углерода в цепи, более предпочтительным является указанный низший алкил. "Разветвленный" означает, что одна или более низших алкильных групп, таких как метил, этил или пропил, присоединены к линейной алкильной цепи. "Низший алкил" означает приблизительно 1-4 углеродных атома в цепи, которая может быть линейной или разветвленной. "Замещен-

"**Алкил**" означает указанную выше алкенильную группу, замещенную одним или более "заместителями алифатической группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные значения.

"**Алкилсульфинил**" означает алкил-SO- группу, где алкильная группа является такой, как указано выше. Предпочтительными группами являются те группы, в которых алкильная группа означает низший алкил.

"**Алкилсульфонил**" означает алкил-SO₂- группу, где алкильная группа является такой, как указано выше. Предпочтительными группами являются те группы, в которых алкильная группа означает низший алкил.

"**Алкилсульфонилкарбамоил**" означает алкил-SO₂-NH-C(=O)- группу, где алкильная группа является такой, как указано выше. Предпочтительными алкилсульфонилкарбамоильными группами являются те группы, в которых алкильная группа означает низший алкил.

"**Алкилтио**" означает алкил-S- группу, где алкильная группа является такой, как указано выше. Характерные примеры алкилтиогрупп включают метилтио, этилтио, изопропилтио и гептилтио.

"**Алкинил**" означает алифатическую углеводородную группу, содержащую углерод-углеродную тройную связь, указанная группа может быть линейной или разветвленной и содержать приблизительно 2-15 атомов углерода в цепи. Предпочтительные алкинильные группы содержат приблизительно 2-12 атомов углерода в цепи и более предпочтительно 2-4 атома углерода в цепи. "Разветвленный" означает, что одна или более низших алкильных групп, таких как метил, этил или пропил, присоединены к линейной алкинильной цепи. "Низший алкинил" означает приблизительно 2-4 углеродных атома в цепи, которая может быть линейной или разветвленной. Алкинильная группа может быть замещена одним или более галогенами. Характерные примеры алкинильных групп включают этинил, пропинил, н-бутинил, 2-бутинил, 3-метилбутинил, н-пентинил, гептинил, октинил, децинил и тому подобное. "Замещенный алкинил" означает указанный выше алкинил, замещенный одним или более "заместителями алифатической группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения.

"**Аминозащитная группа**" означает легко удаляемую группу, используемую, как известно в данной области, для защиты азота амино- или амидной группы от нежелательного взаимодействия в ходе синтеза и пригодную для избирательного удаления. Применение амино/амидных защитных групп для защиты групп от нежелательного взаимодействия в ходе синтеза хорошо известно в данной области, и многие такие защитные группы описаны, например, в T.W. Greene и P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York (1991), включенном здесь посредством ссылки. Амино/амидные защитные группы также включают "неустойчивую к гидрированию амино/амидную защитную группу". Характерными примерами амино/амидных защитных групп являются ацил, включая формил, ацетил, хлорацетил, трихлорацетил, о-нитрофенилацетил, о-нитрофеноксиацетил, трифторацетил, ацетоацетил, 4-хлорбутирил, изобутирил, о-нитроциннамоил, пиколиноил, ацилизотиоцианат, аминокапронил, бензоил и тому подобное, и ацилокси, включая метоксикарбонил, 9-флуоренилметоксикарбонил, 2,2,2-трифторметоксикарбонил, 2,2,2-трифторметоксикарбонил, 2-триметилсилэтооксикарбонил, винилоксикарбонил, аллилоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил (BOC), 1,1-диметилпропинилоксикарбонил, бензилоксикарбонил (CBZ), п-нитробензилоксикарбонил, 2,4-дихлорбензилоксикарбонил и тому подобное.

"**Амидная защитная группа**" означает легко удаляемую группу, используемую, как известно в данной области, для защиты азота амидной группы от нежелательного взаимодействия в ходе синтеза и пригодную для избирательного удаления после превращения в амин. Применение амидных защитных групп для защиты групп от нежелательного взаимодействия в ходе синтеза хорошо известно, и многие такие защитные группы описаны, например, в T.W. Greene и P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York (1991), включенном в данное описание в качестве ссылки. Амидная защитная группа также включает "неустойчивую к кислотам амидную защитную группу" и "неустойчивую к гидрированию амидную защитную группу". Характерными примерами амидных защитных групп являются о-нитроциннамоил, пиколиноил, аминокапронил, бензоил и тому подобное, и ацилокси, включая метоксикарбонил, 9-флуоренилметоксикарбонил, 2,2,2-трифторметоксикарбонил, 2-триметилсилэтооксикарбонил, винилоксикарбонил, аллилоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил (BOC), 1,1-диметилпропинилоксикарбонил, бензилоксикарбонил (CBZ), п-нитробензилоксикарбонил, 2,4-дихлорбензилоксикарбонил и тому подобное.

"**Аминокислота**" означает аминокислоту, выбранную из группы, включающей указанные природные и неприродные аминокислоты. Подразумевается также, что аминокислота включает аминокислоты с L или D стереохимией по α -углероду. Предпочтительными аминокислотами являются аминокислоты, имеющие α -аминогруппу. Аминокислоты могут быть нейтральными, положительно заряженными или отрицательно заряженными в зависимости от заместителей в боковой цепи. "Нейтральная аминокислота" означает аминокислоту, содержащую незаряженные заместители боковой цепи. Характерные примеры нейтральных аминокислот включают аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, триптофан, метионин, глицин, серин, треонин и цистein. "Положительная аминокислота" означает аминокисло-

ту, содержащую заместители боковой цепи, положительно заряженные при физиологическом рН. Характерные примеры положительных аминокислот включают лизин, аргинин и гистидин. "Отрицательная аминокислота" означает аминокислоту, содержащую заместители боковой цепи, несущие отрицательный заряд при физиологическом рН. Характерные примеры отрицательных аминокислот включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Предпочтительными аминокислотами являются α -аминокислоты. Характерными примерами природных аминокислот являются изолейцин, пролин, фенилаланин, триптофан, метионин, глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота. "Неприродная аминокислота" означает аминокислоту, для которой отсутствует кодон нуклеиновой кислоты. Характерные примеры неприродных аминокислот включают, например, D-изомеры указанных выше природных α -аминокислот; Aib (аминомасляную кислоту), β -Aib (3-аминоизомасляную кислоту), Nva (норвалин), β -Ala, Aad (2-аминоадипиновую кислоту), β -Aad (3-аминоадипиновую кислоту), Abu (2-аминомасляную кислоту), Gaba (γ -аминомасляную кислоту), Acp (6-аминокапроновую кислоту), Dbu (2,4-диаминомасляную кислоту), α -аминопимелиновую кислоту, TMSA (триметилсилил-Ala), alle (аллоизолейцин), Nle (норлейцин), трет-Leu, Cit (цитрулин), Orn, Dpm (2,2'-диаминопимелиновую кислоту), Dpr (2,3-диаминопропионовую кислоту), α - или β -Nal, Cha (циклогексил-Ala), гидроксипролин, Sar (саркозин) и тому подобное; циклические аминокислоты; N^a -алкилированные аминокислоты, такие как MeGly (N^a -метилглицин), EtGly (N^a -этилглицин) и EtAsn (N^a -этиласпарагин); и аминокислоты, в которых α -углерод несет два заместителя боковой цепи. Используемые в данном описании названия природных и неприродных аминокислот и их остатков соответствуют общепринятым названиям, рекомендуемым комитетом ИЮПАК по номенклатуре в органической химии и комитетом ИЮПАК-ИЮБ по биохимической номенклатуре, приведенным в "Nomenclature of α -Amino Acids (Recommendations, 1974)" Biochemistry, 14(2), (1975). Это сделано с целью внесения определенности и отсутствия разнотечений в отношении названий и аббревиатуры аминокислот и их остатков, используемых в данном описании и приложенных пунктах формул изобретения.

"Аминокислотная защитная группа" означает группу, которая защищает кислотную или амино-группу аминокислоты или другую реакционноспособную группу в боковой цепи аминокислоты, например гидрокси или тиол. В отношении примеров "соответственно защищенных производных" боковых цепей аминокислот, см., T.W. Green and P.G.M. Wuts in "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley and Sons, 1991. Защитные группы для кислотной группы аминокислоты описаны, например, в разделах "кислотная функциональная группа" и "неустойчивая к гидрированию кислотная защитная группа". Защитные группы для аминогруппы аминокислоты описаны, например, в разделах "аминозащитная группа", "неустойчивая к кислотам аминозащитная группа" и "неустойчивая к гидрированию аминозащитная группа".

"Аминокислотный остаток" означает отдельные аминокислотные структурные единицы, включенные в соединение по изобретению.

"Аминокислотная боковая цепь" означает заместитель, находящийся на углероде между амино- и карбоксигруппами в α -аминокислотах. Характерные примеры аминокислотных боковых цепей включают изопропил, метил и карбоксиметил для валина, аланина и аспарагиновой кислоты, соответственно.

"Аминокислотный эквивалент" означает аминокислоту, которая может быть замещена на другую аминокислоту в пептидах по изобретению без какой-либо утраты функции. Для выполнения таких замен осуществляют замещение подобных аминокислот на основе относительного подобия заместителей боковых цепей, например, в отношении размера, заряда, гидрофильности, гидропатичности и гидрофобности, как указано выше.

"Ароматическая группа" означает арил или гетероарил. Характерные примеры ароматических групп включают фенил, галогензамещенный фенил, азагетероарил и тому подобное.

"Ароил" означает арил-CO-группу, где арильная группа принимает указанные значения. Характерные примеры ароильных групп включают бензоил, 1- и 2-нафтоил и тому подобное.

"Арил" означает ароматическую моноциклическую или полициклическую кольцевую систему приблизительно из 6-14 атомов углерода, предпочтительно, 6-10 атомов углерода. Понятие арил охватывает указанные конденсированный арилциклоалкенил, конденсированный арилциклоалкил, конденсированный арилгетероцикленил и конденсированный арилгетероциклил, присоединенные через их арильную группу. Арил является необязательно замещенным одним или более "заместителями кольцевой группы", которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные значения. Характерные примеры арильных групп включают фенил или нафтил, или замещенный фенил, или замещенный нафтил. "Замещенный арил" означает указанную выше арильную группу, замещенную одним или более "заместителями циклической группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения.

"Арилдиазо" означает арилдиазогруппу, где арильная и диазогруппы принимают указанные выше значения.

"Арилен" означает необязательно замещенную 1,2-, 1,3-, 1,4-двуихвалентную арильную группу, где арильная группа принимает указанные выше значения. Характерные примеры ариленовых групп вклю-

чают необязательно замещенный фенилен, нафтилен и инданилен. Заслуживающим особого внимания ариленом является необязательно замещенный фенилен. "Замещенный арилен" означает указанную выше ариленовую группу, замещенную одним или более "заместителями циклической группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения.

"Арилокси" означает арил-O-группу, где арильная группа принимает указанные выше значения. Характерные примеры арилоксигрупп включают фенокси и 2-нафтилокси.

"Арилоксикарбонил" означает арил-O-CO-группу, где арильная группа принимает указанные выше значения. Характерные примеры арилоксикарбонильных групп включают феноксикарбонил и нафтоксикарбонил.

"Арилсульфонил" означает арил-SO₂-группу, где арильная группа принимает указанные выше значения.

"Арилсульфонилкарбамоил" означает арил-SO₂-NH-C(=O)-группу, где арильная группа принимает указанные выше значения. Характерным примером арилсульфонилкарбамоильной группы является фенилсульфонилкарбамоил.

"Арилсульфинил" означает арил-SO-группу, где арильная группа принимает указанные выше значения.

"Арилтио" означает арил-S-группу, где арильная группа принимает указанные выше значения. Характерные арилтиогруппы включают фенилтио и нафтилтио.

"Основной атом азота" означает sp² или sp³ гибридизированный атом азота, имеющий несвязанную пару электронов, которая может быть протонирована. Характерные примеры основного атома азота включают необязательно замещенную имино, необязательно замещенную амино и необязательно замещенную амидиногруппы.

"Карбокси" означает HO(O)C-группу (карбоновой кислоты).

"Связующий агент" означает соединение, которое реагирует с гидроксильной группой карбоксильной группы, тем самым, делая ее восприимчивой к нуклеофильной атаке. Характерные примеры связующих агентов включают DIC, EDCI, DCC и тому подобное.

"Циклоалкенил" означает неарomaticескую моно- или полициклическую кольцевую систему приблизительно из 3-10 атомов углерода, предпочтительно 5-10 атомов углерода, которая содержит по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Понятие циклоалкенил охватывает указанный конденсированный арилциклоалкенил и конденсированный гетероарилциклоалкенил, когда связь осуществляется через циклоалкенильную группу. Предпочтительные размеры колец для кольцевой системы составляют приблизительно 5-6 атомов в кольце; и такие предпочтительные размеры колец называют также "низшими". "Замещенный циклоалкенил" означает указанную выше циклоалкенильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Характерные примеры моноциклического циклоалкенила включают циклопентенил, циклогексенил, циклогептенил и тому подобное. Характерным примером полициклического циклоалкенила является норборниленил.

"Циклоалкил" означает неарomaticескую моно- или полициклическую кольцевую систему приблизительно из 3-10 атомов углерода, предпочтительно 5-10 атомов углерода. Предпочтительные размеры колец для кольцевой системы составляют приблизительно 5-6 атомов в кольце; и такие предпочтительные размеры колец называют также "низшими". Понятие циклоалкил охватывает указанный выше конденсированный арилциклоалкил и конденсированный гетероарилциклоалкил, когда связь осуществляется через циклоалкенильную группу. "Замещенный циклоалкил" означает указанную выше циклоалкильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Характерные примеры моноциклического циклоалкила включают циклопентил, циклогексил, циклогептил и тому подобное. Характерные примеры полициклического циклоалкила включают 1-декалин, норборнил, адамант-(1- или 2-)ил и тому подобное.

"Циклоалкилен" означает двухвалентную указанную выше циклоалкильную группу, имеющую приблизительно 4-8 атомов углерода. Предпочтительные размеры колец для циклоалкилена составляют приблизительно 5-6 атомов в кольце; и такие предпочтительные размеры колец называют также "низшими". Точки связывания по циклоалкенильной группе включают 1,1-, 1,2-, 1,3-или 1,4- схемы связывания, где подходящая стереохимическая взаимосвязь точек связывания представляет собой либо цис-, либо транс-конфигурации. Характерные примеры циклоалкиленовых групп включают (1,1-, 1,2- или 1,3-)циклогексилен и (1,1- или 1,2-)циклопентилен. "Замещенный циклоалкилен" означает указанную выше циклоалкиленовую группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения.

"Циклический" или "циклил" означает указанный циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклик или гетероцикленил. Термин "низший", используемый в сочетании с термином циклический, имеет то же значение в отношении циклоалкила, циклоалкенила, гетероциклила или гетероцикленила.

"Циклилокси" означает циклил-O-группу, где циклильная группа является такой, как указано выше. Характерные примеры циклоалкоксигрупп включают циклопентилокси, циклогексилокси, хинуклиди-

локси, пентаметиленсульфидокси, тетрагидропирианилокси, тетрагидротиофенилокси, пирролидинилокси, тетрагидрофуранилокси или 7-оксабицикло[2,2,1]гептанилокси, гидрокситетрагидропирианилокси, гидрокси-7-оксабицикло[2,2,1]гептанилокси и тому подобное.

"Циклилсульфинил" означает циклил-S(O)-группу, где циклическая группа является такой, как указано выше.

"Циклилсульфонил" означает циклил-S(O)₂-группу, где циклическая группа является такой, как указано выше.

"Циклилтио" означает циклил-S-группу, где циклическая группа является такой, как указано выше.

"Диазо" означает двухвалентную -N=N- группу.

"Замещаемая группа" означает группу, которая, когда связана с указанным L, становится способной к замещению под действием нуклеофильной атаки моно- или дизамещенной аминогруппы в присутствии или в отсутствии агента, облегчающего указанную атаку, например связующего агента. Характерные примеры замещаемых групп включают гидрокси, алифатическую оксигруппу, галоген, N-оксисукцинимид, ацилокси и тому подобное.

"Эффективное количество" означает количество соединения/композиции по данному изобретение, эффективное для получения требуемого терапевтического действия.

"Конденсированный арилциклоалкенил" означает конденсированные указанные выше арил и циклоалкенил. Предпочтительными конденсированными арилциклоалкенилами являются те, в которых арил означает фенил, а циклоалкенил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце. Конденсированный арилциклоалкенил, как неустойчивый, может быть связан через любой способный к этому атом кольцевой системы. "Замещенный конденсированный арилциклоалкенил" означает указанную выше конденсированную арилциклоалкенильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Характерные примеры конденсированного арилциклоалкенила включают 1,2-дигидронафтилен, инден и тому подобное.

"Конденсированный арилциклоалкил" означает конденсированные указанные выше арил и циклоалкил. Предпочтительными конденсированными арилциклоалкилами являются те, в которых арил означает фенил, а циклоалкил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце. Конденсированный арилциклоалкил, как неустойчивый, может быть связан через любой способный к этому атом кольцевой системы. "Замещенный конденсированный арилциклоалкил" означает указанную выше конденсированную арилциклоалкильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Характерные примеры конденсированного арилциклоалкила включают 1,2,3,4-тетрагидронафтилен и тому подобное.

"Конденсированный арилгетероцикленил" означает конденсированные указанные выше арил и гетероцикленил. Предпочтительными конденсированными арилгетероцикленилами являются те, в которых арил означает фенил, а гетероцикленил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце. Конденсированный арилгетероцикленил, как неустойчивый, может быть связан через любой способный к этому атом кольцевой системы. Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероцикленильной частью конденсированного арилгетероцикленила означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. "Замещенный конденсированный арилгетероцикленил" означает указанную выше конденсированную арилгетероцикленильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Атом азота конденсированного арилгетероцикленила может быть основным атомом азота. Атом азота или серы гетероцикленильной части конденсированного арилгетероцикленила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида, S-оксида или S,S-диоксида. Характерные примеры конденсированного арилгетероцикленила включают 3Н-индолинил, 1Н-2-оксохинолил, 2Н-1-оксоизохинолил, 1,2-дигидрохинолинил, 3,4-дигидрохинолинил, 1,2-дигидроизохинолинил, 3,4-дигидроизохинолинил и тому подобное.

"Конденсированный арилгетероциклил" означает конденсированные указанные выше арил и гетероциклил. Предпочтительными конденсированными арилгетероциклилами являются те, в которых арил означает фенил, а гетероциклил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце. Конденсированный арилгетероциклил, как неустойчивый, может быть связан через любой способный к этому атом кольцевой системы. Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероциклильной частью конденсированного арилгетероциклила означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. "Замещенный конденсированный арилгетероциклил" означает указанную выше конденсированную арилгетероциклильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Атом азота конденсированного арилгетероциклила может быть основным атомом азота. Атом азота или серы гетероциклильной части конденсированного арилгетероциклила может быть также, необязательно, окислен до соответств-

вующего N-оксида, S-оксида или S,S-диоксида.

Характерные примеры конденсированных арилгетероциклических кольцевых систем включают индолинил, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, 1,2,3,4-тетрагидрохинолин, 1Н-2,3-дигидроизоиндол-2-ил, 2,3-дигидробенз[f]изоиндол-2-ил, 1,2,3,4-тетрагидробенз[g]изохинолин-2-ил и тому подобное.

"Конденсированный гетероарилциклоалкенил" означает конденсированные указанные выше гетероарил и циклоалкенил. Предпочтительными конденсированными гетероарилциклоалкенилами являются те, в которых гетероарил означает фенил, а циклоалкенил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце. Конденсированный гетероарилциклоалкенил, как неустойчивый, может быть связан через любой способный к этому атом кольцевой системы. Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероарильной частью конденсированного гетероарилциклоалкенила означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. "Замещенный конденсированный гетероарилциклоалкенил" означает конденсированную гетероарилциклоалкенильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Атом азота конденсированного гетероарилциклоалкенила может быть основным атомом азота. Атом азота гетероарильной части конденсированного гетероарилциклоалкенила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида. Характерные примеры конденсированного гетероарилциклоалкенила включают 5,6-дигидрохинолил, 5,6-дигидроизохинолил, 5,6-дигидрохиноксалинил, 5,6-дигидрохиназолинил, 4,5-дигидро-1Н-бензимидазолил, 4,5-дигидробензоксазолил и тому подобное.

"Конденсированный гетероарилциклоалкил" означает конденсированные указанные выше гетероарил и циклоалкил. Предпочтительными конденсированными гетероарилциклоалкилами являются те, в которых гетероарил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце и циклоалкил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце. Конденсированный гетероарилциклоалкил, как неустойчивый, может быть связан через любой способный к этому атом кольцевой системы. Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероарильной частью конденсированного гетероарилциклоалкила означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. "Замещенный конденсированный гетероарилциклоалкил" означает указанную выше конденсированную гетероарилциклоалкильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Атом азота конденсированного гетероарилциклоалкила может быть основным атомом азота. Атом азота гетероарильной части конденсированного гетероарилциклоалкила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида. Характерные примеры конденсированного гетероарилциклоалкила включают 5,6,7,8-тетрагидрохинолинил, 5,6,7,8-тетрагидроизохинолил, 5,6,7,8-тетрагидрохиноксалинил, 5,6,7,8-тетрагидрохиназолил, 4,5,6,7-тетрагидро-1Н-бензимидазолил, 4,5,6,7-тетрагидробензоксазолил, 1Н-4-окса-1,5-диазанафталин-2-онил, 1,3-дигидроимидизол[4,5]пиридин-2-онил и тому подобное.

"Конденсированный гетероарилгетероцикленил" означает конденсированные указанные выше гетероарил и гетероцикленил. Предпочтительными конденсированными гетероарилгетероцикленилами являются те, в которых гетероарил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце и гетероцикленил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце. Конденсированный гетероарилгетероцикленил, как неустойчивый, может быть связан через любой способный к этому атом кольцевой системы. Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероарильной или гетероцикленильной частью конденсированного гетероарилгетероцикленила означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. "Замещенный конденсированный гетероарилгетероцикленил" означает указанную выше конденсированную гетероарилгетероцикленильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Атом азота конденсированного гетероарилгетероцикленила может быть основным атомом азота. Атом азота или серы гетероарильной части конденсированного гетероарилгетероцикленила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида. Атом азота или серы гетероарильной или гетероцикленильной части конденсированного гетероарилгетероцикленила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего S-оксида, S-оксида или S,S-диоксида. Характерные примеры конденсированного гетероарилгетероцикленила включают 7,8-дигидро[1,7]нафтиридинил, 1,2-дигидро[2,7]нафтиридинил, 6,7-дигидро-3Н-имидаzo[4,5-с]пиридинил, 1,2-дигидро-1,5-нафтиридинил, 1,2-дигидро-1,6-нафтиридинил, 1,2-дигидро-1,7-нафтиридинил, 1,2-дигидро-1,8-нафтиридинил, 1,2-дигидро-2,6-нафтиридинил и тому подобное.

"Конденсированный гетероарилгетероциклил" означает конденсированные указанные выше гетероарил и гетероциклил. Предпочтительными конденсированными гетероарилгетероциклилами являются те, в которых гетероарил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце и гетероциклил содержит приблизительно 5-6 атомов в кольце. Конденсированный гетероарилгетероциклил, как неустойчивый, может быть связан через любой способный к этому атом циклической системы. Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероарильной или гетероциклической частью конденсированного гете-

роарилгетероциклила означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. "Замещенный конденсированный гетероарилгетероциклил" означает указанную выше конденсированную гетероарилгетероциклическую группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Атом азота конденсированного гетероарилгетероциклила может быть основным атомом азота. Атом азота гетероарильной части конденсированного гетероарилгетероциклила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида. Атом азота или серы гетероарильной или гетероциклической части конденсированного гетероарилгетероциклила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида, S-оксида или S,S-диоксида. Характерные примеры конденсированного гетероарилгетероциклила включают 2,3-дигидро-1Н-пиррол[3,4-*b*]хинолин-2-ил, 1,2,3,4-тетрагидробенз[*b*][1,7]нафтиридин-2-ил, 1,2,3,4-тетрагидробенз[*b*][1,6]нафтиридин-2-ил, 1,2,3,4-тетрагидро-9Н-пиридо[3,4-*b*]индол-2-ил, 1,2,3,4-тетрагидро-9Н-пиридо[4,3-*b*]индол-2-ил, 2,3-дигидро-1Н-пирроло[3,4-*b*]индол-2-ил, 1Н-2,3,4,5-тетрагидроазепино[3,4-*b*]индол-2-ил, 1Н-2,3,4,5-тетрагидроазепино[4,3-*b*]индол-3-ил, 1Н-2,3,4,5-тетрагидроазепино[4,5-*b*]индол-2-ил, 5,6,7,8-тетрагидро[1,7]нафтиридил, 1,2,3,4-тетрагидро[2,7]нафтиридил, 2,3-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*b*]пиридил, 2,3-дигидро[1,4]диоксино[2,3-*b*]пиридил, 3,4-дигидро-2Н-1-окса[4,6]диазанафталинил, 4,5,6,7-тетрагидро-3Н-имидазо[4,5-*c*]пиридил, 6,7-дигидро[5,8]диазанафталинил, 1,2,3,4-тетрагидро[1,5]нафтиридинил, 1,2,3,4-тетрагидро[1,6]нафтиридинил, 1,2,3,4-тетрагидро[1,7]нафтиридинил, 1,2,3,4-тетрагидро[2,6]нафтиридинил и тому подобное.

"Галоген" означает фтор, хлор, бром или иод. Предпочтительными являются фтор, хлор или бром, и более желательны фтор или хлор.

"Гетероароил" означает гетеробарил-CO- группу, где гетероарильная группа принимает указанные выше значения. Характерные примеры гетероароильных групп включают тиофеноил, никотиноил, пиррол-2-илкарбонил, 1- и 2-нафтоил, пиридиноил и тому подобное.

"Гетероарил" означает ароматическую моноциклическую или полициклическую кольцевую систему из приблизительно 5-14 атомов углерода, предпочтительно 5-10 атомов углерода, где один или более атомов углерода в кольцевой системе заменены гетероэлементом (элементами), отличными от углерода, например азотом, кислородом или серой. Предпочтительно кольцевая система включает 1-3 гетероатома. Предпочтительные размеры колец кольцевой системы соответствуют приблизительно 5-6 атомам в кольце. Термин гетероарил охватывает указанные выше конденсированный гетероарилциклоалкенил, конденсированный гетероарилциклоалкил, конденсированный гетероарилгетероцикленил и конденсированный гетероарилгетероциклил, когда связь осуществляется через гетероарильную группу. "Замещенный гетероарил" означает указанную выше гетероарильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероарилом означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. Атом азота гетероарила может быть основным атомом азота, и может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида. Характерные примеры гетероарильной и замещенной гетероарильной групп включают пиразинил, тиенил, изотиазолил, оксазолил, пиразолил, фуразанил, пирролил, 1,2,4-тиадиазолил, пиридазинил, хиноксанлинил, фталазинил, имидазо[1,2-*a*]пиридин, имидазо[2,1-*b*]тиазолил, бензофуразанил, азаиндолил, бензимидазолил, бензотиенил, тиенопиридилил, тиенопиридинил, пирролопиридилил, имидазопиридилил, бензоазаиндолил, 1,2,4-триазинил, бензотиазолил, фуранил, имидазолил, индолил, индолизинил, изоксазолил, изохинолинил, изотиазолил, оксадиазолил, пиразинил, пиридазинил, пиразолил, пиридил, пиридимидинил, пирролил, хиназолинил, хинолинил, 1,3,4-тиадиазолил, тиазолил, тиенил, триазолил и тому подобное. Предпочтительной гетероарильной группой является пиразинил.

"Гетероарилазо" означает гетероарилазогруппу, где гетероарил и азогруппы принимают указанные значения.

"Гетероарилдиил" означает двухвалентную группу, полученную из гетероарила, где гетероарил принимает указанные значения. Характерным примером гетероарилдиильной группы является необязательно замещенный пиридиндиил.

"Гетероарилсульфонилкарбамоил" означает гетероарил-SO₂-NH-C(=O)-группу, где гетероарильная группа принимает указанные значения.

"Гетероцикленил" означает неароматическую моноциклическую или полициклическую систему углеводородных колец из, приблизительно 3-10 атомов углерода, предпочтительно 5-10 атомов углерода, где один или более атомов углерода в кольцевой системе заменен гетероэлементом (элементами), отличными от углерода, например азотом, кислородом или серой, и которая содержит, по меньшей мере, одну углерод-углеродную двойную связь или углерод-азотную двойную связь. Предпочтительно кольцо включает 1-3 гетероатома. Предпочтительные размеры колец кольцевой системы соответствуют приблизительно 5-6 атомам в кольце, и такие предпочтительные размеры колец называются также "низшими". Термин гетероцикленил охватывает указанные выше конденсированный арилгетероцикленил и конденсированный гетероарилгетероцикленил, когда связь осуществляется через гетероцикленильную группу.

Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероцикленом означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. "Замещенный гетероциклен" означает указанную выше гетероцикленильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Атом азота гетероцикленила может быть основным атомом азота. Атом азота или серы гетероцикленила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида, S-оксида или S,S-диоксида. Характерные примеры азагетероцикленильных групп включают 1,2,3,4-тетрагидропиридин, 1,2-дигидропиридинил, 1,4-дигидропиридинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридин, 1,4,5,6-тетрагидропиримидин, 2-пирролинил, 3-пирролинил, 2-имидазолинил, 2-пиразолинил и тому подобное. Характерные примеры оксагетероцикленильных групп включают 3,4-дигидро-2Н-пиран, дигидрофуранил и фтордигидрофуранил. Характерным примером полициклической оксагетероцикленильной группы является 7-оксабицикло[2,2,1]гептенил. Характерные примеры моноциклических тиагетероцикленильных групп включают дигидротиофенил и дигидротиопирианил.

"Гетероциклил" означает неарomaticескую насыщенную моноциклическую или полициклическую кольцевую систему приблизительно из 3-10 атомов углерода, предпочтительно 5-10 атомов углерода, где один или более атомов углерода в кольцевой системе заменены гетероэлементом (элементами), отличными от углерода, например азотом, кислородом или серой. Предпочтительно кольцевая система включает 1-3 гетероатома. Предпочтительные размеры колец кольцевой системы соответствуют приблизительно 5-6 атомам в кольце; и такие предпочтительные размеры колец называются также "низшими". Термин гетероциклил охватывает указанные выше конденсированный гетероциклил и конденсированный гетероарилгетероциклил, когда связь осуществляется через гетероциклическую группу. Использование аза-, окса- или тиа- в качестве приставки перед гетероциклилом означает, что, по меньшей мере, атом азота, кислорода или серы, соответственно, присутствует в качестве входящего в кольцо атома. "Замещенный гетероциклил" означает указанную выше гетероциклическую группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. Атом азота гетероциклила может быть основным атомом азота. Атом азота или серы гетероциклила может быть также, необязательно, окислен до соответствующего N-оксида, S-оксида или S,S-диоксида. Характерные примеры моноциклических гетероциклических колец включают пиперидил, пирролидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, тиазолидинил, 1,3-диоксоланил, 1,4-диоксанил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопирианил и тому подобное.



как замещенный моноциклический азагетероциклил замещен непосредственно или через связующую группу по меньшей мере одним заместителем, который означает, или включает, или замещен, указанной выше ароматической группой; например, такой как арил, гетероарил, арилокси, гетероарилокси, ароил или его тиоксо-аналог, гетероароил или его тиоксо-аналог, ароилокси, гетероароилокси, арилоксикарбонил, гетероарилоксикарбонил, арилсульфонил, гетероарилсульфонил, арилсульфинил, гетероарилсульфинил, арилтио, гетероарилтио, арилдиазо, гетероарилдиазо, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{N}$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC(O)}$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NCO(O)}$, $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NC(O)NY}^3$ - или $\text{Y}^1\text{Y}^2\text{NSO}_2^-$, по меньшей мере один из Y^1 и Y^2 означает, включает или замещен арильной или гетероарильной группой. Предпочтительные связующие группы включают $-\text{C(O)}-$, $-\text{OC(O)}-$, низший алкил, низший алкокси, низший алкенил, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{C(O)C(O)}-$, $-\text{S(O)}-$, $-\text{S(O)}_2-$, $-\text{NR}^{80}-$, где R^{80} означает водород, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероциклил или гетероарил. В особенностях предпочтительными мостиковыми группами являются $-\text{C(O)}-$ и $-\text{OC(O)}-$. "Замещенный полициклический азагетероциклил" означает указанную выше полициклическую азагетероциклическую группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения. "Замещенный полициклический азагетероциклен" означает указанную выше полициклическую азагетероцикленильную группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения.

"Гетероциклилен" означает двухвалентную указанную выше гетероциклическую группу приблизительно из 4-8 атомов углерода. Предпочтительные размеры колец гетероциклилена соответствуют приблизительно 5-6 атомам в кольце; и такие предпочтительные размеры колец называются также как "низшие". Точки связывания по циклоалкиленовой группе включают 1,1-, 1,2-, 1,3- или 1,4-примеры связывания, где подходящая стереохимическая взаимосвязь точек связывания представляет собой либо цис, либо транс конфигурации. Характерные примеры гетероциклиленовых групп включают (1,1-, 1,2- или 1,3-)пиперидинилен и (1,1- или 1,2-)тетрагидрофуранилен. "Замещенный гетероциклилен" означает указанную выше гетероциклиленовую группу, замещенную одним или более "заместителями кольцевой группы" (предпочтительно 1-3), которые могут быть одинаковыми или различными и принимают указанные выше значения.

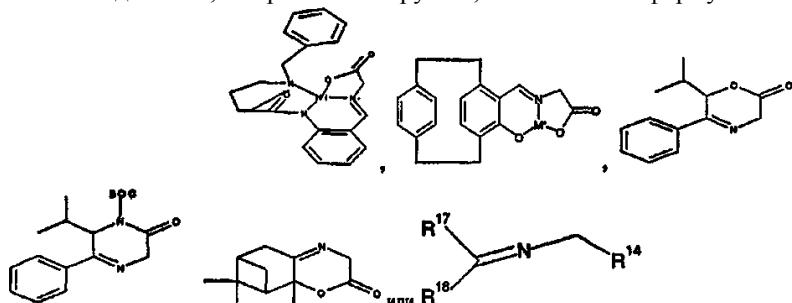
"Гидрат" означает сольват, где молекулой (молекулами) растворителя является H_2O .

"Неустойчивая к гидрированию аминозащитная группа" означает указанную выше аминозащитную группу, которая легко удаляется гидрированием, тогда как сравнительно устойчива к другим реагентам. Предпочтительной неустойчивой к гидрированию аминозащитной группой является Cbz.

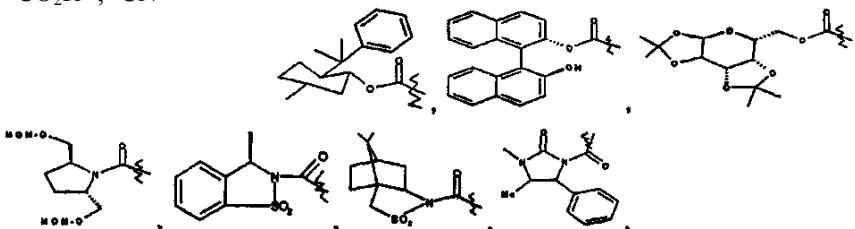
"Неустойчивая к гидрированию кислотная защитная группа" означает указанную выше кислотную защитную группу, которая легко удаляется гидрированием, тогда как сравнительно устойчива к другим реагентам. Предпочтительной неустойчивой к гидрированию кислотной защитной группой является бензил.

"Гигроскопичность" означает сорбцию, выражаемую в количестве поглощенной или удерживаемой воды, достаточном для влияния на физические и химические свойства вещества (Eds. J. Swarbrick and J.C. Boylan, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 10, 33).

"Иминное производное глициниимида" означает иминное основание Шиффа на основе глицина, используемое в синтезе α -аминокислот, как природных, так и неприродных. Функциональная группа иминного сложного эфира может содержать один или более асимметрических центров, которые могут усиливать стереоиндукцию во время процесса образования связи. В дополнение, такие иминные производные глициниимида могут быть нанесены на полимерные основы, что облегчает комбинаторный синтез. Иминные производные глициниимида могут быть получены конденсацией глицинового эфира с соответствующим кетоном в присутствии кислотного катализатора. Реакции способствует удаление воды. Иминные производные глициниимида хорошо известны в данной области и используются в реакции присоединения Михаэля, например, как описано в Guillena, G., et al, J. Org. Chem. 2000, 65, 7310-7322, включенном в данное описание посредством ссылки. Конкретные примеры иминных производных глициниимида по изобретению включают соединения, выбранные из группы, описываемой формулами:



где M^* означает переходный металл, предпочтительно Cu, более предпочтительно Cu^{II}.
 R^{14} означает $-CO_2R^{16}$, -CN

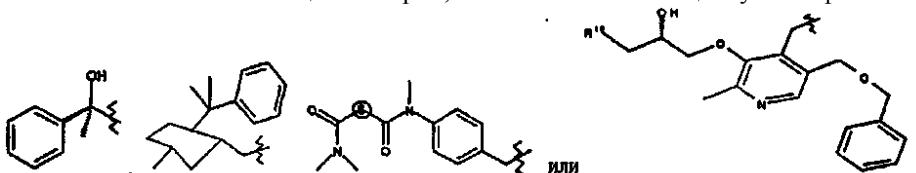


или $-CONR^{15}R^{15}$.

R^{15} означает необязательно замещенную алифатическую группу;

R^{16} означает кислотную защитную группу, необязательно замещенный арил или необязательно замещенную алифатическую группу;

R^{17} означает необязательно замещенный арил, необязательно замещенную алифатическую группу,



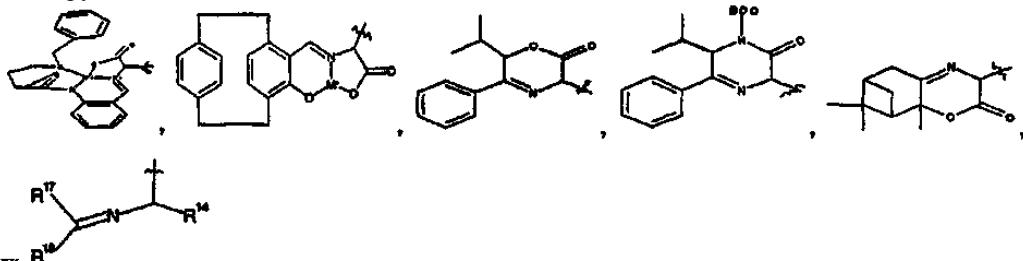
R^{18} означает водород, алкил или алкилтио; или необязательно замещенный арил;

R^{17} и R^{18} , взятые вместе с углеродом, к которому R^{17} и R^{18} присоединены, образуют структуры присоединения



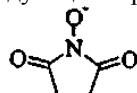
(S) означает твердую fazу.

"Аддукт иминного производного глицинимида" означает соединение, образующееся при отщеплении α -водорода относительно положения азота и карбонильной группы основания Шиффа, и используется для осуществления присоединения за счет образования связи. Конкретные примеры аддуктов иминного производного глицинимида по изобретению включают соединения, описываемые формулами, выбранными из группы



где R^{14} , R^{17} и R^{18} принимают значения, указанные в определении иминного производного глицинимида.

"N-оксисукцинимид" означает группу следующей структуры



"N-оксид" означает группу следующей структуры



Термин "пациент" включает как человека, так и млекопитающих.

"Пептидомиметический" означает полимер, включающий аминокислотные остатки, присоединенные друг к другу через амидные связи.

"Фармацевтически приемлемый сложный эфир" означает сложный эфир, гидролизующийся *in vivo*, и включает те эфиры, которые легко распадаются в организме до исходного соединения или его соли. Подходящие сложноэфирные группы включают, например, группы, образованные фармацевтически приемлемыми алифатическими карбоновыми кислотами, в особенности алкановыми, алкеновыми, циклоалкановыми и алкандионовыми кислотами, в которых каждая алкильная или алкенильная группа преимущественно содержит не более 6 атомов углерода. Характерные примеры сложных эфиров включают формиаты, ацетаты, пропионаты, бутираты, акрилаты, этилсукцинаты и тому подобное.

"Фармацевтически приемлемые пролекарства", как использовано в данном описании, означают те пролекарства соединений по изобретению, которые эффективны по разумной биологической оценке и пригодны для использования в контакте с клетками человека или других млекопитающих, не являясь излишне токсичными, вызывающими раздражение, аллергическую реакцию и тому подобное, соответствующие разумному соотношению польза/риск, и эффективные в целях предусмотренного применения, а также цвтерионные формы, где возможно, соединений по изобретению. Термин "пролекарство" означает соединения, которые подвергаются быстрому превращению *in vivo*, давая исходное соединение указанной выше формулы, например, за счет гидролиза в крови. Функциональные группы, которые могут быть быстро превращены путем метаболического расщепления *in vivo*, образуют класс групп, реакционноспособных по отношению к карбоксильной группе соединений по изобретению.

Указанные группы включают, но не ограничиваясь ими, такие группы, как алканоил (такой как ацетил, пропаноил, бутаноил и тому подобное), незамещенный и замещенный ароил (такой как бензоил и замещенный бензоил), алcoxикарбонил (такой как этоксикарбонил), триалкилсилил (такой как триметил- и триэтилсилил), образующие сложные моноэфиры с дикарбоновыми кислотами (такими как янтарная) и тому подобное.

Из-за легкости, с какой метаболически расщепляемые группы соединений по настоящему изобретению расщепляются *in vivo*, соединения, несущие такие группы, ведут себя как пролекарства. Соединения с метаболически расщепляемыми группами обладают тем преимуществом, что для них может быть характерна повышенная биодоступность, являющаяся результатом повышенной растворимости и/или скорости всасывания, обусловленных наличием в исходных соединениях метаболически расщепляемых групп. Подробный обзор представлен в Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ed., Elsevier (1985); Methods in Enzymology; K. Widder et al., Ed., Academic Press, 42, 309-396 (1985); A Textbook of Drug Design and Development, Krogsgaard-Larsen and H. Bandaged, ed., Chapter 5; "Design and Applications of Prodrugs" 113-191 (1991); Advanced Drug Delivery Reviews, H. Bundgard, 8, 1-38, (1992); J. Pharm. Sci., 77, 285 (1988); Chem. Pharm. Bull., N. Nakaya et al, 32, 692 (1984); Pro-drugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi and V. Stella, 14 A.C.S. Symposium Series and Bioreversible Carriers in Drug Design, E.B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, включенных в данное описание посредством ссылок.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к сравнительно нетоксичным аддитивным

солям соединений по настоящему изобретению с неорганическими и органическими кислотами и основаниями. Указанные соли могут быть получены *in situ* во время окончательного выделения или очистки соединений. В частности, аддитивные соли кислот могут быть получены взаимодействием очищенного соединения в форме свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой и выделением полученной таким образом соли. Характерные примеры кислотно-аддитивных солей включают гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, фосфат, нитрат, ацетат, оксалат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, борат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глукогентанат, лактобионат, сульфаматы, малонаты, салицилаты, пропионаты, метилен-бис-п-гидроксинафтоаты, гентизаты, изэтионаты, ди-п-толуоилтартраты, метансульфонаты, этансульфонаты, бензолсульфонаты, п-толуолсульфонаты, циклогексилсульфаматы, хинаты и лаурилсульфонаты, и тому подобное. См., например, S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977), включенный в данное описание посредством ссылки. Аддитивные соли оснований могут также быть получены взаимодействием очищенного соединения в форме кислоты с подходящим органическим или неорганическим основанием и выделением полученной таким образом соли. Основно-аддитивные соли включают соли фармацевтически приемлемых металлов и аминов. Подходящие соли металлов включают соли натрия, калия, кальция, бария, цинка, магния и алюминия. Предпочтительны соли натрия и калия. Подходящие аддитивные соли неорганических оснований получают из оснований металлов, которые включают гидрид натрия, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид кальция, гидроксид алюминия, гидроксид лития, гидроксид магния, гидроксид цинка и тому подобное. Подходящие аддитивные соли аминных оснований получают из аминов, обладающих достаточной основностью для образования стабильной соли, указанные аддитивные соли предпочтительно включают те амины, которые часто используются в химии лекарственных препаратов по причине их низкой токсичности и приемлемости для применения в области медицины. Указанные амины включают аммиак, этилендиамин, N-метилглюкамин, лизин, аргинин, орнитин, холин, N,N'-дibenзилэтидиамин, хлорпрокайн, диэтаноламин, прокайн, N-бензилфенетиламин, диэтиламин, пиперазин, трис(гидроксиметил)аминометан, гидроксид тетраметиламмония, триэтиламин, дibenзиламин, эфенамин, дегидроабиетиламин, N-этилпиперидин, бензиламин, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, trimetilamin, этиламин, основные аминокислоты, например лизин и аргинин, и циклогексиламин, и тому подобное.

"Заместители кольцевой группы" означают заместители, присоединенные к ароматическим или ненасыщенным кольцевым системам, включающие: арил, гетероарил, гидрокси, алкокси, циклилокси, арилокси, гетероарилокси, ацил или его тиоксо-аналог, цикликарбонил или его тиоксо-аналог, ароил или его тиоксо-аналог, гетероароил или его тиоксо-аналог, ацилокси, цикликарбонилокси, ароилокси, гетероароилокси, галоген, нитро, циано, карбокси (кислота), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, сульфо, фосфоно, алкилсульфонилкарбамоил, тетразолил, арилсульфонилкарбамоил, N-метоксикарбамоил, гетероарилсульфонилкарбамоил, 3-гидрокси-3-циклобутен-1,2-дион, 3,5-диоксо-1,2,4-оксадиазолидинил или гидроксигетероарил, такой как 3-гидроксизоксазолил, 3-гидрокси-1-метилпиразолил, алcoxикарбонил, циклилоксикикарбонил, арилоксикикарбонил, гетероарилоксикикарбонил, алкилсульфонил, циклилсульфонил, арилсульфонил, гетероарилсульфонил, алкилтио, циклилтио, арилтио, гетероарилтио, циклизил, арилдиазо, гетероарилдиазо, тиол, Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- или Y¹Y²NSO₂-, где Y¹, Y² и Y³ независимо означают водород, алкил, арил или гетероарил, или в случае, когда заместитель означает Y¹Y²N-, один из Y¹ и Y² может означать указанные выше ацил, цикликарбонил, ароил, гетероароил, алcoxикарбонил, циклилоксикикарбонил, арилоксикикарбонил или гетероарилоксикикарбонил, а другой из Y¹ и Y² принимает значения указанные выше, или в случае, когда заместитель означает Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- или Y¹Y²NSO₂, Y¹ и Y² могут вместе с атомом N, через который связан каждый из Y¹ и Y², образовывать 4-7-членный азагетероциклик или азагетероцикленил. Когда кольцевая система является насыщенной или частично насыщенной, "заместители кольцевой группы" дополнительно включают метилен (H₂C=), оксо (O=) и тиоксо (S=). Кислотными/амидными заместителями циклических групп являются карбокси (кислота), -C(O)-NHOH, -C(O)-CH₂OH, -C(O)-CH₂SH, -C(O)-NH-CN, сульфо, фосфоно, алкилсульфонилкарбамоил, тетразолил, арилсульфонилкарбамоил, N-метоксикарбамоил, гетероарилсульфонилкарбамоил, 3-гидрокси-3-циклобутен-1,2-дион, 3,5-диоксо-1,2,4-оксадиазолидинил или гидроксигетероарил, такой как 3-гидроксизоксазолил, 3-гидрокси-1-метилпиразолил и Y¹Y²NCO-. Некислотными полярными заместителями циклических групп являются гидрокси, оксо (O=), тиоксо (S=), ацил или его тиоксо-аналог, цикликарбонил или его тиоксо-аналог, ароил или его тиоксо-аналог, гетероароил или его тиоксо-аналог, алcoxикарбонил, циклилоксикикарбонил, арилоксикикарбонил, гетероарилоксикикарбонил, ацилокси, цикликарбонилокси, ароилокси, гетероароилокси, алкилсульфонил, циклилсульфонил, арилсульфонил, гетероарилсульфонил, алкилсульфинил, циклилсульфинил, арилсульфинил, гетероарилсульфинил, тиол, Y¹Y²N-, Y¹Y²NC(O)-, Y¹Y²NC(O)O-, Y¹Y²NC(O)NY³- или Y¹Y²NSO₂-.

"Сольват" означает физическую ассоциацию соединения по настоящему изобретению с одной или более молекулами растворителя. Физическая ассоциация включает образование водородной связи. В некоторых случаях сольват поддается выделению, например, когда одна или более молекул растворителя

включены в кристаллическую решетку твердого кристаллического соединения. Понятие "сольват" охватывает как фазу раствора, так и поддающиеся выделению сольваты. Характерные примеры сольватов включают гидраты, этаноляты, метаноляты и тому подобное.

Соединения по изобретению, необязательно, могут быть представлены в виде солей. Указанные соли, являющиеся фармацевтически приемлемыми, представляют особый интерес, поскольку они используются при применении указанных выше соединений в медицинских целях. Соли, которые фармацевтически не приемлемы, используются в способах получения для выделения и очистки и, в некоторых случаях, для разделения стереоизомерных форм соединений по изобретению. Последнее в особенности справедливо в отношении солей аминов, полученных из оптически гистивных аминов.

Когда соединение по изобретению содержит карбоксильную группу или достаточно кислотную биостеру, могут быть получены аддитивные соли с основаниями, которые являются просто более удобной формой для применения; и на практике использование солевой формы, по существу, равносильно применению в форме свободной кислоты.

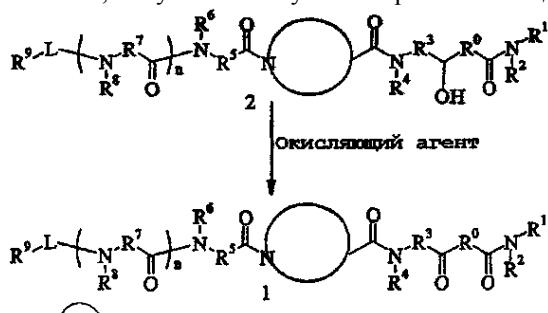
Также, когда соединение по изобретению содержит основную группу или достаточно основную биостеру, могут быть получены аддитивные соли с кислотами, которые являются просто более удобной формой для применения; и на практике использование солевой формы, по существу, равносильно применению в форме свободного основания.

Получение соединений по изобретению

Исходные вещества и промежуточные соединения для соединений по изобретению могут быть получены путем применения или адаптации известных способов, как, например, способы, описанные в стандартных примерах, или очевидными, химически эквивалентными им способами.

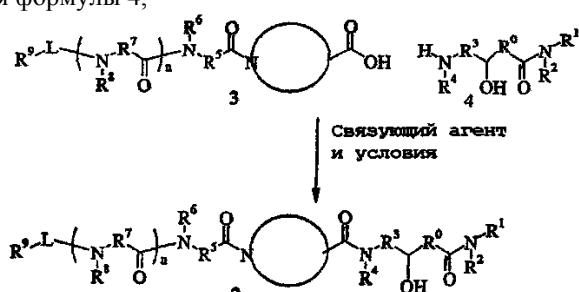
Соединения по изобретению могут быть получены путем применения или адаптации известных способов, под которыми понимаются способы, используемые для этого ранее или описанные в литературе, например, способами, описанными в R.C. Larock in Comprehensive Organic Transformations, VCH publishers (1989).

Соединение формулы 1, где переменные и группа  принимают указанные значения, могут быть получены обработкой соединения формулы 2,



где переменные и группа  принимают указанные значения, соответствующим окисляющим агентом и в подходящих условиях. Характерным окисляющим агентом является DMP реагент. Характерные условия включают окисление в соответствующем органическом растворителе, таком как дихлорметан, при температуре, близкой к комнатной.

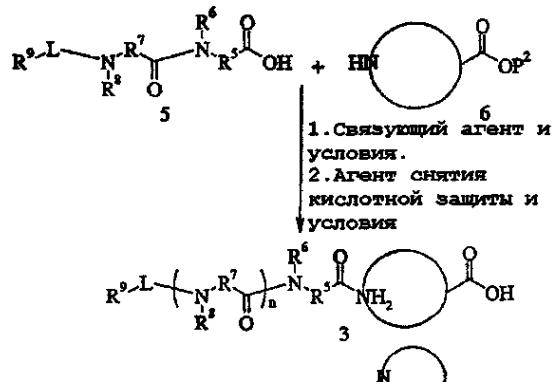
Соединение формулы 2, где переменные и группа  принимают указанные значения, может быть получено сочетанием соединения формулы 3, где переменные и группа  принимают указанные значения, и соединения формулы 4,



где переменные принимают указанные значения, с соответствующим связующим агентом и в подходящих условиях. Характерный связующий агент и условия включают использование DIC и HOAt в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ, приблизительно при 0°C, или использование PyBop и DIPEA в подходящем органическом растворителе, таком как дихлорметан, при температуре,

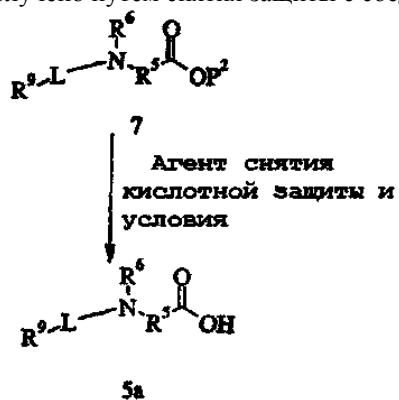
близкой к комнатной.

Соединение формулы 3, где переменные и группа  принимают указанные значения, может быть получено сочетанием соединения формулы 5, где переменные принимают указанные значения, и соединения формулы 6,



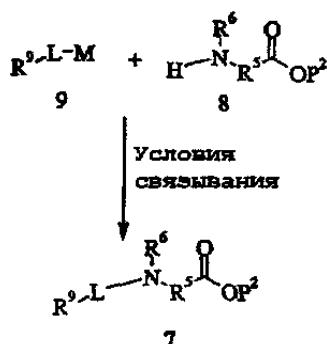
где P^2 означает кислотную защитную группу и группа  принимает указанные значения, с соответствующим связующим агентом и в подходящих условиях связывания, с последующим использованием соответствующего агента для снятия защиты в подходящих для снятия защиты условиях. Характерные связующий агент и условия включают использование DIC или DCC и HOAt в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ, при температуре приблизительно от 0°C до комнатной. Снятие защиты осуществляют, используя соответствующий агент для снятия защиты, зависящий от природы защитного агента, т.е. от того, удаляется (неустойчив) он под действием кислоты, основания или в условиях гидрирования, и других реакционноспособных групп подвергаемого снятию защиты соединения, т.е. агент для снятия защиты выбирают так, чтобы выполнить снятие защиты без воздействия на другие реакционноспособные группы, за исключением случаев, когда сопутствующая реакция является желательной. Характерным кислотным защитным агентом является C_1-C_8 -низший алкил; в частности метил. Характерным агентом для снятия защиты является неорганическое основание, такое как гидроксид щелочного металла; в частности NaOH. Характерные условия снятия защиты включают снятие защиты в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, при температуре, близкой к комнатной.

Соединение формулы 5, где n равно 0 и остальные переменные принимают указанные значения, т.е., соединение 5a, может быть получено путем снятия защиты с соединения формулы 7



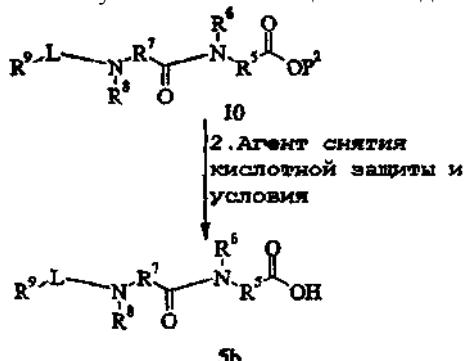
где P^2 означает кислотную защитную группу, и остальные переменные принимают указанные выше значения, с помощью соответствующего агента для снятия защиты и в подходящих условиях. Снятие защиты осуществляют, используя соответствующий агент для снятия защиты, зависящий от природы защитного агента, т.е. от того, удаляется (неустойчив) он под действием кислоты, основания или в условиях гидрирования, и других реакционноспособных групп подвергаемого снятию защиты соединения, т.е. агент для снятия защиты выбирают так, чтобы выполнить снятие защиты без воздействия на другие реакционноспособные группы, за исключением случаев, когда сопутствующая реакция является желательной. Характерным кислотным защитным агентом является C_1-C_8 -низший алкил; в частности метил. Характерным агентом для снятия защиты является неорганическое основание, такое как гидроксид щелочного металла; в частности NaOH. Характерные условия снятия защиты включают снятие защиты в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, при температуре, близкой к комнатной.

Соединение формулы 7, где переменные принимают указанные значения, может быть получено ацилированием соединения формулы 8, где переменные принимают указанные значения, соединением формулы 9



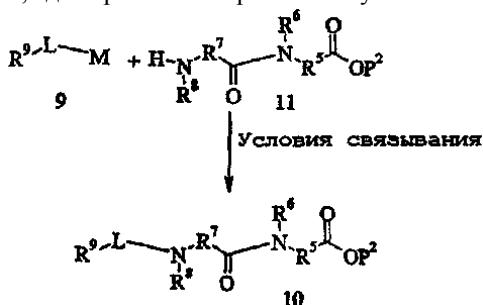
где М означает заменяемую группу, а остальные переменные принимают указанные выше значения, в подходящих условиях. Характерные условия связывания подразумевают использование DIC или DCC и HOAt в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ или дихлорметан, приблизительно при температуре от 0°C до комнатной, или использование PyBor и DIPEA в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ или дихлорметан, при температуре, близкой к комнатной; последние условия являются предпочтительными. Характерный L означает карбонил. Характерный M означает гидрокси или N-оксисукцинимид.

Соединение формулы 5, где n равно 1 и остальные переменные принимают указанные выше значения, т.е., соединение 5b, может быть получено снятием защиты с соединения формулы 10



где P² означает кислотную защитную группу и остальные переменные принимают указанные выше значения, с помощью подходящего агента для снятия защиты и в соответствующих условиях. Снятие защиты осуществляют, используя соответствующий агент для снятия защиты, зависящий от природы защитного агента, т.е. от того, удаляется (неустойчив) он под действием кислоты, основания или в условиях гидрирования, и других реакционноспособных групп подвергаемого снятию защиты соединения, т.е. агент для снятия защиты выбирают так, чтобы выполнить снятие защиты без воздействия на другие реакционноспособные группы, за исключением случаев, когда сопутствующая реакция является желательной. Характерным кислотным защитным агентом является C₁-C₈-низший алкил; в частности метил. Характерным агентом для снятия защиты является неорганическое основание, такое как гидроксид щелочного металла; в частности NaOH. Характерные условия снятия защиты включают снятие защиты в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, при температуре, близкой к комнатной.

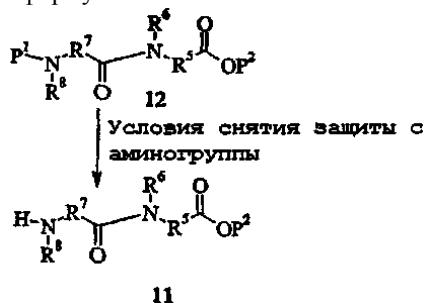
Соединение формулы 10, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено ацилированием соединения формулы 11, где переменные принимают указанные выше значения, с помощью соединения формулы 9, где переменные принимают указанные выше значения,



в подходящих условиях. Характерные условия связывания подразумевают использование DIC или DCC и HOAt в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ или дихлорметан, приблизительно при температуре от 0°C до комнатной, или использование PyBor и DIPEA в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ или дихлорметан, при температуре, близкой к комнатной; последние условия являются предпочтительными. Характерный L означает карбонил. Характерный M означает

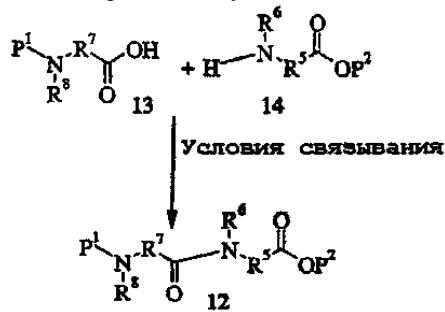
гидрокси или N-оксисукцинимид.

Соединение формулы 11, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено снятием защиты с соединения формулы 12



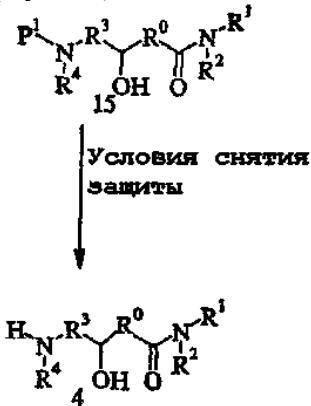
где P^1 означает аминозащитную группу и остальные переменные принимают указанные выше значения, с помощью подходящего агента для снятия защиты и в соответствующих условиях. Снятие защиты осуществляют, используя соответствующий агент для снятия защиты, зависящий от природы аминозащитного агента, т.е. от того, удаляется (неустойчив) он под действием кислоты, основания или в условиях гидрирования, и других реакционноспособных групп подвергаемого снятию защиты соединения, т.е. агент для снятия защиты выбирают так, чтобы выполнить снятие защиты без воздействия на другие реакционноспособные группы, за исключением случаев, когда сопутствующая реакция является желательной. Характерным аминозащитным агентом является Cbz или BOC; более предпочтителен Cbz. Характерным агентом для снятия защиты является кислота, такая как HCl , или $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2$; более предпочтителен $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2$. Характерные условия снятия защиты включают снятие защиты в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, или алкилалканоатном растворителе, таком как этилацетат, при температуре, близкой к комнатной.

Соединение формулы 12, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено сочетанием соединения формулы 13, где переменные принимают указанные выше значения, с соединением формулы 14, где переменные принимают указанные выше значения,



в подходящих условиях. Характерные условия связывания подразумевают использование HOAt/DIC и DIPEA в подходящем органическом растворителе, таком как ТГФ, при температуре, близкой к комнатной.

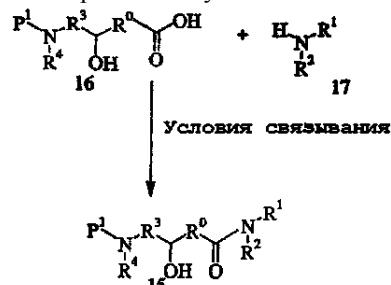
Соединение формулы 4, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено снятием защиты с соединения формулы 15,



где переменные принимают указанные выше значения, с помощью подходящего агента для снятия защиты и в соответствующих условиях. Снятие защиты осуществляют, используя соответствующий агент для снятия защиты, зависящий от природы аминозащитного агента, т.е. от того, удаляется (неустойчив) он под действием кислоты, основания или в условиях гидрирования, и других реакционноспособных групп подвергаемого снятию защиты соединения, т.е. агент для снятия защиты выбирают так,

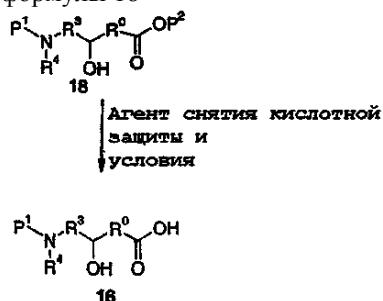
чтобы выполнить снятие защиты без воздействия на другие реакционноспособные группы, за исключением случаев, когда сопутствующая реакция является желательной. Характерным аминозащитным агентом является Cbz или BOC; более предпочтителен Cbz. Характерным агентом для снятия защиты является кислота, такая как HCl, или H₂/Pd(OH)₂; более предпочтителен H₂/Pd(OH)₂. Характерные условия снятия защиты включают снятие защиты в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, или алкилалканоатном растворителе, таком как этилацетат, при температуре, близкой к комнатной.

Соединение формулы 15, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено сочетанием соединения формулы 16, где переменные принимают указанные выше значения, с соединением формулы 17, где переменные принимают указанные выше значения,



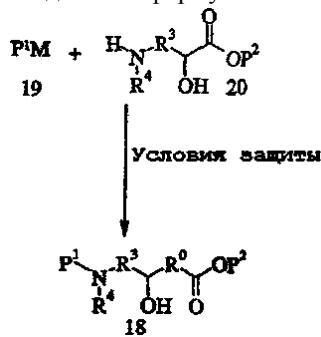
в подходящих условиях. Характерным аминозащитным агентом является Cbz или BOC; более предпочтителен Cbz. Характерные условия связывания подразумевают использование НОВТ, PyBOP и DIPEA в подходящем органическом растворителе, таком как дихлорметан, при температуре приблизительно от 0°C до комнатной.

Соединение формулы 16, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено снятием защиты с соединения формулы 18



где остальные переменные принимают указанные выше значения, с помощью подходящего агента для снятия защиты и в соответствующих условиях. Снятие защиты осуществляют, используя соответствующий агент для снятия защиты, зависящий от природы кислотного защитного агента, т.е. от того, удаляется (неустойчив) он под действием кислоты, основания или в условиях гидрирования, и других реакционноспособных групп подвергаемого снятию защиты соединения, т.е. агент для снятия защиты выбирают так, чтобы выполнить снятие защиты без воздействия на другие реакционноспособные группы, за исключением случаев, когда сопутствующая реакция является желательной. Характерным аминозащитным агентом является Cbz. Характерным кислотным защитным агентом является C₁-C₈-низший алкил; в частности метил. Характерным агентом для снятия защиты является неорганическое основание, такое как гидроксид щелочного металла; в частности NaOH. Характерные условия снятия защиты включают снятие защиты в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, при температуре, близкой к комнатной.

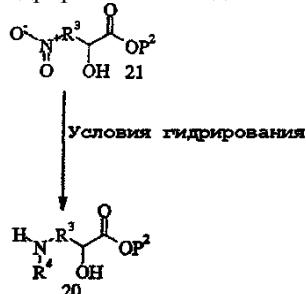
Соединение формулы 18, где R⁰ означает связь, и остальные параметры принимают указанные выше значения, может быть получено путем защиты соединения формулы 20, где переменные принимают указанные выше значения, с помощью соединения формулы 19



где переменные принимают указанные выше значения, в соответствующих условиях. Характерным

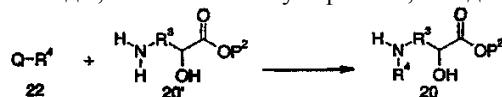
аминозащитным агентом является Cbz или ВОС. Характерные условия связывания подразумевают использование подходящего органического растворителя, такого как дихлорметан, при температуре приблизительно от 0°C до комнатной.

Соединение формулы 20, где R⁴ означает водород, и остальные переменные принимают указанные выше значения, может быть получено гидрированием соединения формулы 21



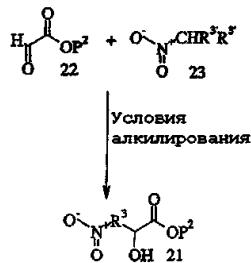
где переменные принимают указанные выше значения, с помощью гидрирующего агента и в подходящих условиях. Характерным гидрирующим агентом является H₂/Pd(OH)₂. Характерные условия гидрирования включают гидрирование в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, или алкилалканоатном растворителе, таком как этилацетат, при температуре, близкой к комнатной.

Соединение формулы 20, где R⁴ означает необязательно замещенную алифатическую группу, и остальные переменные принимают указанные выше значения, может быть получено алкилированием соединения 20', где переменные принимают указанные выше значения, с помощью соединения 22 (алкилирующего агента), где R⁴ означает необязательно замещенную алифатическую группу и Q означает замещаемую группу, такую как галогениды, тозилаты или сульфонаты, в подходящих условиях.



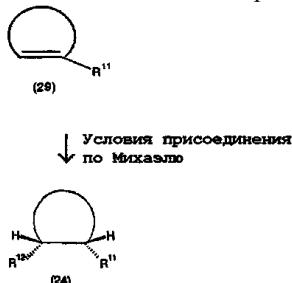
Подходящие алкилирующие агенты включают алифатические (галогениды, тозилаты или сульфонаты). Подходящие условия алкилирования включают алкилирование в подходящем органическом растворителе, таком как спиртовой растворитель, например метанол или этанол, или простой эфирный растворитель, например, диэтиловый эфир или тетрагидрофуран, приблизительно от комнатной температуры до температуры дефлегмации.

Соединение формулы 21, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено алкилированием соединения формулы 22, где переменная принимает указанные выше значения, с помощью соединения формулы 23



где заместители R^{3'} независимо означают указанные необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную циклическую группу или необязательно замещенную ароматическую группу, в подходящих условиях. Характерные условия алкилирования включают алкилирование с применением сильного основания, такого как трет-бутилат калия, в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, при температуре, близкой к комнатной.

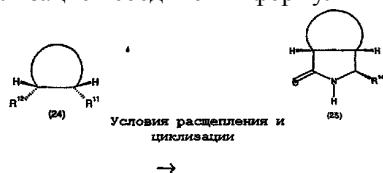
Соединение формулы 24, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено осуществлением присоединения по Михаэлю к акцептору Михаэля формулы 29, где переменная принимает указанные выше значения, с помощью иминного производного глицинидата.



Условия присоединения по Михаэлю включают подходящие полярные растворители, гидроксиды

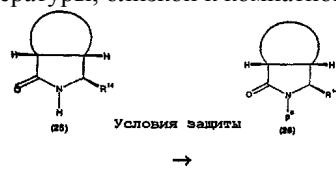
щелочных металлов в качестве оснований и соответствующие температуры. В отношении присоединения по Михаэлю, см., Corey, E.J.; Noe, M.C.; Xu, F. Tetrahedron Letter 1998, 39, 5347. В отношении синтеза с применением хиальных межфазных катализаторов, см., Corey, E.J.; Noe, M.C.; Xu, F.J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 12414. Подходящие растворители включают DCM, ACN или NUA. В зависимости от условий взаимодействия. Подходящие основания включают CsOH, NaOH, KOH и LiOH. Подходящий интервал температур составляет приблизительно от -78 до 0°C, более предпочтительно приблизительно -60°C. Иминные глицинимины, полезные по изобретению, приведены в данном описании. Предпочтительным иминным глицинимидом является трет-бутиловый эфир N-(дифенилметилен)глицина. Кроме того, условия присоединения по Михаэлю могут зависеть от наличия или отсутствия межфазного катализатора (МФК) (хиального и нехирального). Предпочтительным МФК является O-[9]-аллил-N-9-антраценилметилцинхонидийбромид.

Соединение формулы 25, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено иминным расщеплением и циклизацией соединения формулы 24.

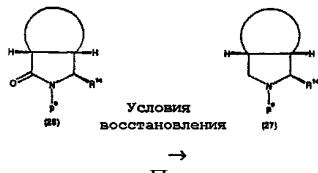


В отношении методик расщепления и циклизации, см., Javidan, A.; Schfer, K.; Pyne, S. Synlett 1996, 100; Tatsukawa, A.; Dan, M.; Ohbatake, M.; Kawatake, K.; Fukata, T.; Wada, E.; Kanemase, S.; Kakei, S. J. Org. Chem. 1993, 58, 4221. Условия расщепления и циклизации включают использование полярных растворителей, кислотных реагентов и температур приблизительно в интервале от комнатной температуры до 150° С. Предпочтительные условия включают использование EtOH, AcONa и NH₂OH·HCl, и температуры, близкой к температуре кипения используемого растворителя.

Соединение формулы 26, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено защищкой амида соединения формулы 25, где переменные принимают указанные выше значения, с помощью подходящей амидной защитной группы, такой как ВОС. Другие подходящие защитные группы включают CBz, -CO₂алкил. См. также, Greene, T.W.; P.G.M. in Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, New York, 1991. в отношении других аминозащитных групп. Условия защиты включают применение аprotонных полярных растворителей, органических оснований в качестве катализаторов и температур приблизительно в интервале 0° С-100° С. Предпочтительные условия включают использование ACN, диметиламинопиридина и температуры, близкой к комнатной.

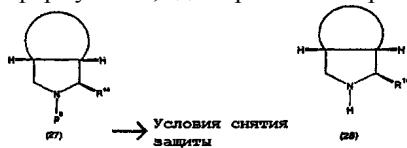


Соединение формулы 27, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено восстановлением защищенного соединения формулы 26, где переменные принимают указанные выше значения.



Фактически выполняют два восстановления. Первым является восстановление амида до гемиаминаля с использованием DIBALH или супергидрида [LiBEt₃H]. Вторым является восстановление гемиаминаля до амина с использованием Et₃SiH и BF₃•OEt₂. См., Collado, I.; Ezquerro, J.; Mateo, A.I.; Rubio, A., J. Org. Chem. 1998, 63 1995-2001 и Ezqueera, J.; Pedregal, C.; Yguretagoyena, B.; Rubio, A.; Carrasco, M.C.; Escrivano, A.; Garcia Ruano, J.L. J. Org. Chem. 1995, 60, 2925, в отношении условий восстановления. Другие стандартные условия превращения пироглютаматов в пирролидины состоят в использовании BH₃SM₂.

Соединение формулы 28, где переменные принимают указанные выше значения, может быть получено снятием защиты с соединения формулы 27, где переменные принимают указанные выше значения.



См., Gibson, F.G.; Bermeier, S.C.; Rapoport, H., J. Org. Chem. 1994, 59, 3216-3218 в отношении условий селективного удаления N-ВОС защитной группы в присутствии сложного трет-бутилового эфира.

Каждому специалисту в данной области известно, что условия снятия защиты зависят от выбора защитной группы. Например, если используют CBz, могут быть использованы условия гидрирования или основные условия. Например, если используют BOC, то можно использовать 1н. HCl в этилацетате. См., Greene, T.W.; P.G.M. in Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, New York, 1991.

Для специалиста в данной области ценно, что соединение формулы 3 может быть получено сочетанием соединения формулы 5 с соединением формулы 28 в указанных выше условиях.

Способы получения R³, R⁵ или R⁷, в виде необязательно замещенных этандиильных групп, включают способы, известные специалистам в данной области, например, способы, описанные в "The organic Chemistry of p-Lactams" edited by G. Georg, VCH Publishers, Inc. (1993), например, страницы 240-241 и 303-305.

Приведенные далее схемы 1-11 иллюстрируют разнообразные способы получения необязательно замещенных полициклических азагетероциклических. Способы, приведенные ниже в виде схем, приемлемы также для других необязательно замещенных полициклических азагетероциклических, включающих подобные совместимые заместители.

Схема 1

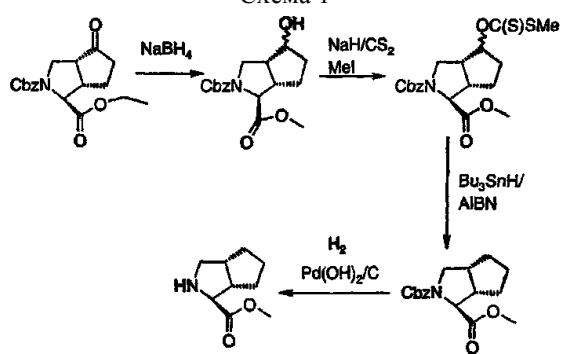


Схема 2

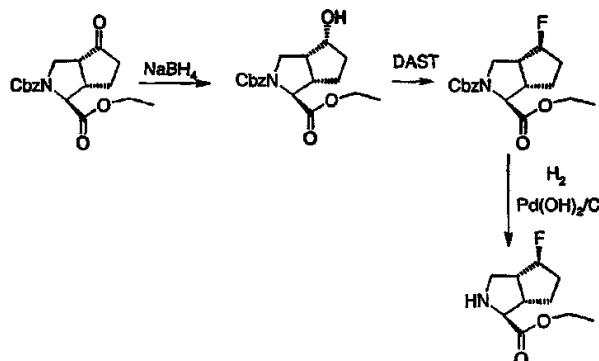


Схема 3

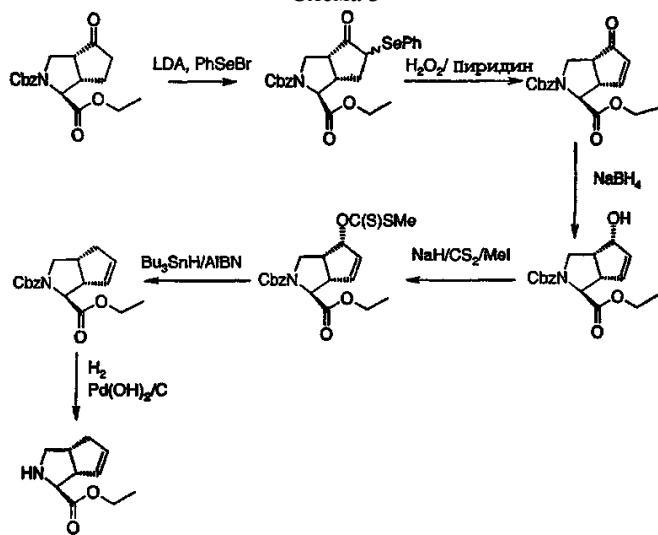


Схема 4

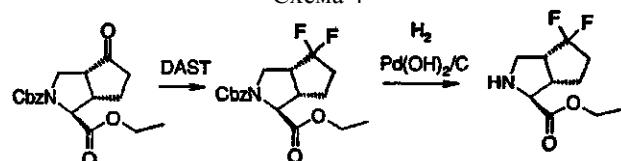


Схема 5

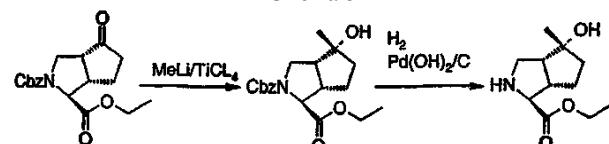


Схема 6

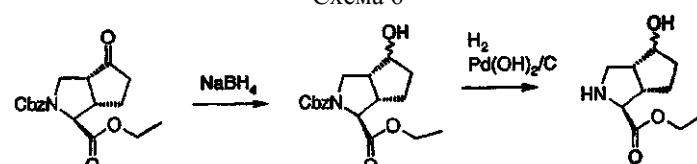


Схема 7

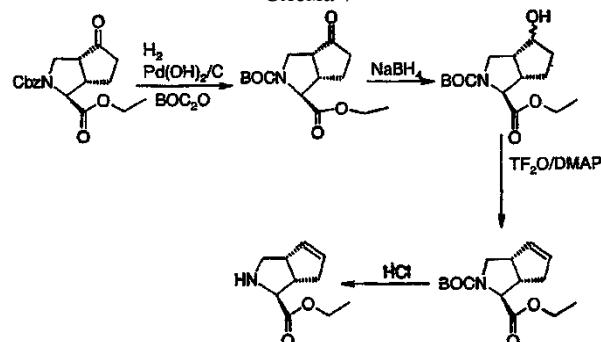


Схема 8

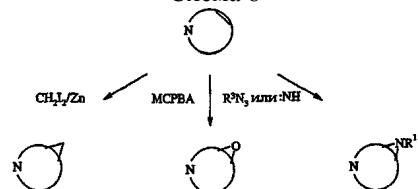


Схема 9

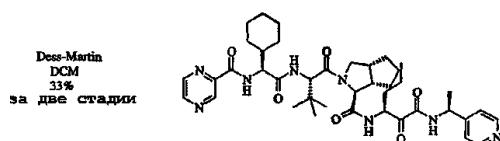
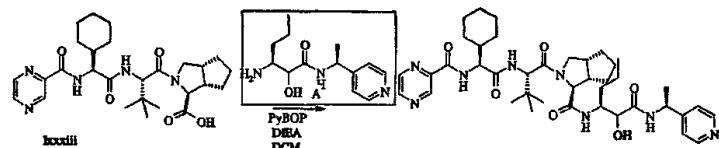
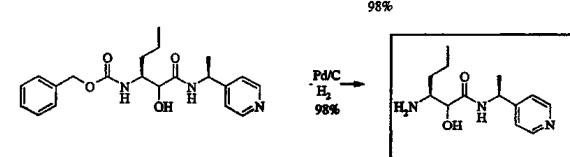
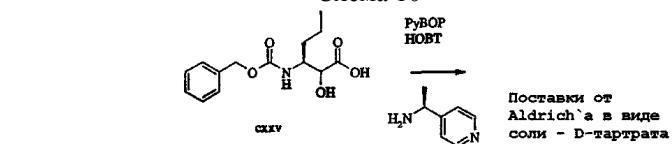
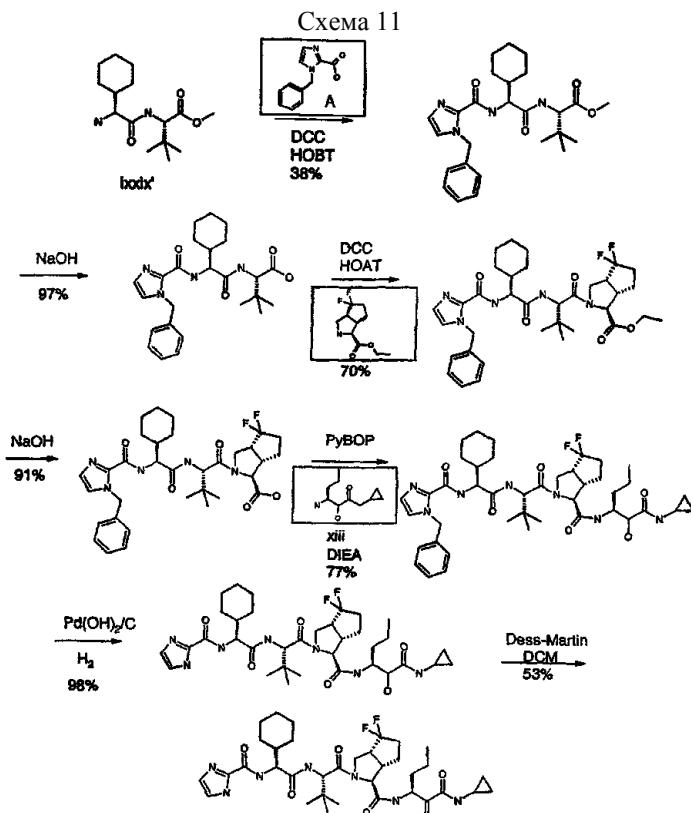


Схема 10





Соединение формулы 1, включающее группу, содержащую один или более атомов азота в кольце, предпочтительно имин ($=\text{N}-$), может быть превращено в соответствующее соединение, где один или более циклических атомов азота в группе окислены до N-оксида, преимущественно путем взаимодействия с перкислотой, например перуксусной кислотой в уксусной кислоте или м-хлорпероксибензойной кислотой в инертном растворителе, таком как дихлорметан, при температуре приблизительно в интервале от комнатной до температуры дефлегмации, предпочтительно при повышенной температуре.

При осуществлении приведенных ниже взаимодействий может возникнуть необходимость защиты реакционноспособных функциональных групп, например гидрокси-, амино-, имино-, тио- или карбокси-групп во избежание их нежелательного участия в реакциях, когда требуется наличие указанных групп в конечном продукте. Могут быть использованы обычные защитные группы в соответствии со стандартными методиками, например, см., T.W. Green and P.G.M. Wuts in "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley and Sons (1991); J.F.W. McOmie in "Protective Groups in Organic Chemistry" Plenum Press, 1973.

Соединение, полученное указанными способами, может быть выделено из реакционной смеси общепринятыми способами. Например, соединение может быть выделено путем отгонки растворителя из реакционной смеси или, по необходимости, выливанием остатка после отгонки растворителя из реакционной смеси в воду с последующей экстракцией несмешивающимся с водой органическим растворителем и отгонкой растворителя из экстракта. Кроме того, продукт может быть, по желанию, дополнительно очищен различными подходящими способами, такими как перекристаллизация, переосаждение или различные хроматографические методы, в особенности, хроматографией на колонке или препаративной тонкослойной хроматографией.

Согласно еще одной отличительной особенности настоящего изобретения соединения по изобретению могут быть получены взаимным превращением соединений по изобретению.

В качестве примера взаимного превращения, соединения формулы 1, содержащие сульфоксидные мостики, могут быть получены окислением соответствующих соединений, содержащих $-S-$ связи. Например, окисление может обычно быть выполнено путем взаимодействия с перкислотой, например, 3-хлорпербензойной кислотой, предпочтительно в инертном растворителе, например, дихлорметане, преимущественно при температуре, близкой к комнатной, или иначе, под действием кислого пероксомоносульфата калия в такой среде, как водный метанол забуференный приблизительно до pH 5, в интервале температур приблизительно от 0°C до комнатной температуры. Последний способ предпочтителен для соединений, содержащих неустойчивую к кислоте группу.

В качестве другого примера взаимного превращения, соединения формулы 1, содержащие сульфоновые мостики, могут быть получены окислением соответствующих соединений, содержащих $-S-$ или сульфоксидные мостики. Например, окисление может обычно быть выполнено путем взаимодействия с перкислотой, например 3-хлорпербензойной кислотой, предпочтительно в инертном растворителе, например дихлорметане, преимущественно при температуре, близкой к комнатной.

Очевидно, что определение ароматичности в отношении арилов и гетероарилов включает высокорезонансную ненасыщенную кольцевую структуру. Альтернативно, наличие двойных связей, где это указано, представляет одну из возможных структур описываемого соединения, но подразумевается, что она включает другие резонансные состояния, такие как протонированные и заряженные состояния, только одно из которых может быть показано.

Следует отметить, что соединения по настоящему изобретению имеют асимметрические центры. Такие асимметрические центры могут независимо иметь R или S конфигурацию. Для специалистов в данной области очевидно, что некоторые соединения по изобретению могут также обладать геометрической изомерией. Понятно, что настоящее изобретение включает отдельные геометрические изомеры, стереоизомеры и их смеси, включая рацемические смеси, соединений по изобретению. Такие изомеры могут быть выделены из их смесей путем применения или адаптации известных способов, например, хроматографическими методами и способами перекристаллизации, либо их раздельно получают из подходящих изомеров промежуточных соединений.

Применительно к данному описанию имеется в виду, что в перечень указанных групп входят их таутомерные формы, например тиоксо/меркапто или оксо/гидроксил.

Аддитивные соли кислот получают с соединениями по изобретению, в которых присутствуют основные функциональные группы, такие как амино, алкиламино или диалкиламино. Предпочтительны фармацевтически приемлемые, т.е. нетоксичные, аддитивные соли кислот. Выбранные соли подбирают таким образом, чтобы они были оптимально совместимы с обычными фармацевтическими наполнителями и подходили для перорального или парентерального введения. Кислотно-аддитивные соли соединений по настоящему изобретению могут быть получены взаимодействием свободного основания с подходящей кислотой, на основе применения или адаптации известных способов. Например, кислотно-аддитивные соли соединений по настоящему изобретению могут быть получены либо растворением свободного основания в воде или водном спиртовом растворе, или других подходящих растворителях, содержащих соответствующую кислоту, и выделением соли путем упаривания раствора, или взаимодействием свободного основания и кислоты в органическом растворителе, в этом случае соль выделяется сразу, либо может быть получена концентрированием раствора. Ряд подходящих кислот, используемых для получения таких солей, включает: хлористоводородную кислоту, бромисто-водородную кислоту, фосфорную кислоту, серную кислоту, различные органические, карбоновые и сульфоновые кислоты, такие как уксусная кислота, лимонная кислота, пропионовая кислота, янтарная кислота, бензойная кислота, винная кислота, фумаровая кислота, миндальная кислота, аскорбиновая кислота, яблочная кислота, ментансульфоновая кислота, толуолсульфоновая кислота, жирные кислоты. Например, используются такие соли органических кислот, как адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, бисульфат, бутират, лактат, лаурат, лаурилсульфат, молат, гидроидид, 2-гидрокситансульфонат, глицерофосфат, пикрат, пивалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, тиоцианат, 2-нафталинсульфонат, ундеканоат, никотинат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, камфорат, камфорсульфонат и другие.

Соединения по настоящему изобретению могут быть регенерированы из солей на основе применения или адаптации известных способов. Например, соединения по изобретению могут быть восстановлены из их кислотно-аддитивных солей путем обработки их щелочью, например водным раствором бикарбоната натрия или водным раствором аммиака.

Соединения по настоящему изобретению могут быть регенерированы из основно-аддитивных солей на основе применения или адаптации известных способов. Например, соединения по изобретению могут быть восстановлены из их основно-аддитивных солей путем обработки их кислотой, например соляной кислотой.

Основно-аддитивные соли могут быть получены, когда соединение по изобретению содержит карбоксигруппу или достаточно кислотную биостеру. Основания, которые могут быть использованы для получения основно-аддитивных солей, включают преимущественно основания, образующие при взаимодействии со свободной кислотой фармацевтически приемлемые соли, то есть соли, катионы которых в фармацевтических дозах не токсичны для пациента, так что положительные ингибирующие воздействия, присущие свободным основаниям, не ослабляются побочными действиями за счет катионов. Фармацевтически приемлемые соли, включая соли щелочных и щелочно-земельных металлов, охватываются объемом настоящего изобретения и включают соли, полученные с основаниями, такими как: гидрид натрия, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид кальция, гидроксид алюминия, гидроксид лития, гидроксид магния, гидроксид цинка, аммиак, этилендиамин, N-метилглюкамин, лизин, аргинин, орнитин, холин, N,N'-дibenзил этилендиамин, хлорпрокаин, дизтаноламин, прокайн, N-бензилфенетиламин, диэтиламин, пиперазин, трис(гидроксиметил)аминометан, гидроксид тетраметиламмония и тому подобное.

Соединения по настоящему изобретению удобно переводить в форму сольватов, либо они образуются по ходу осуществления способа по изобретению в виде сольватов (например, гидратов). Гидраты соединений по настоящему изобретению удобно получать перекристаллизацией из смеси водных/органических растворителей, используя такие органические растворители, как диоксан, тетрагидрофуран или метанол.

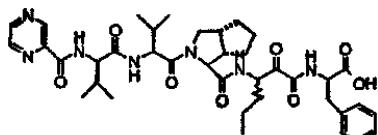
Исходные вещества и промежуточные соединения могут быть получены на основе применения или адаптации известных способов, например способов, описанных в стандартных примерах или используя их очевидные химические эквиваленты.

Соединения по изобретению, способы или методики их получения и биологическая активность станут более очевидными при анализе приведенных ниже примеров, которые представлены исключительно для иллюстрации и не рассматриваются, как ограничивающие объем изобретения.

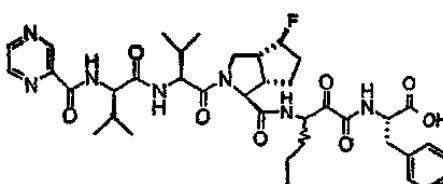
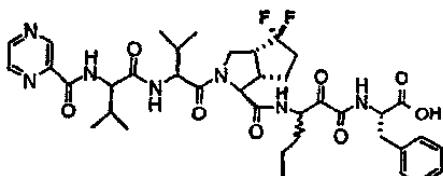
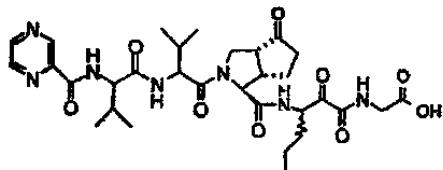
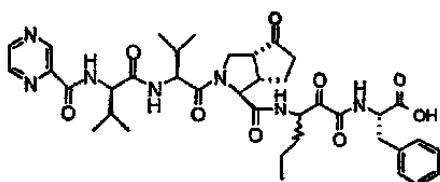
Образцы анализированы путем ТСХ, ЯМР, ОТ-ПЦР или ЭА.

Пример 1. Соединения А-Е.

К DCM раствору (10 мл) соединения xi (310 мг, 0,39 ммоль) добавляют TFA (4 мл). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 5 ч. По окончанию этого времени растворитель удаляют в вакууме. Полученный остаток очищают ВЭЖХ с обращенной фазой, получая 195 мг (68%) соединения А.

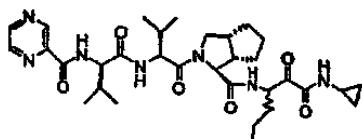


Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения В-Е:

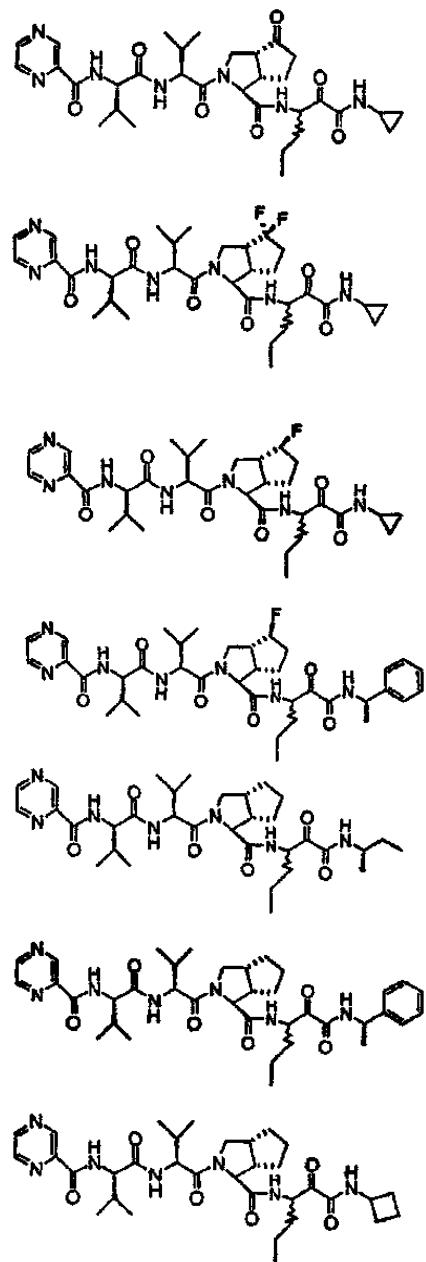


Пример 2. Соединения F-M.

К DCM раствору (10 мл) соединения xii (350 мг, 0,56 ммоль) добавляют DMP реагент (307 мг, 0,73 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч и затем гасят добавлением 10% Na₂SO₃ в течение 30 мин. Реакционную смесь экстрагируют затем EtOAc (75 мл) и промывают насыщенным раствором соли. Органический слой сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (80-90% EtOAc/гексаны), получая 248 мг (71%) соединения F.

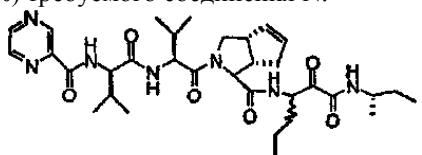


Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения G-M:

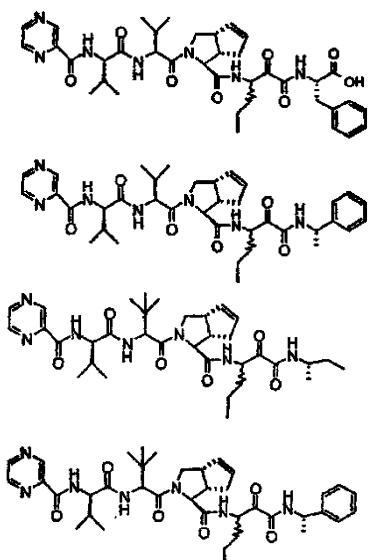


Пример 3. Соединения N-R.

К DCM раствору (4 мл) соединения xix (~0,22 ммоль) добавляют DMP реагент (146 мг, 0,34 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч реакцию гасят добавлением 10% Na₂SO₃. Реакционную смесь разбавляют затем DCM. Органический слой отделяют и промывают дважды 10% Na₂SO₃ и насыщенным раствором соли. Полученный органический слой сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc), что дает 78 мг (56%) требуемого соединения N.

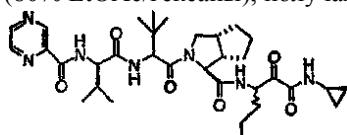


Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения O-R:

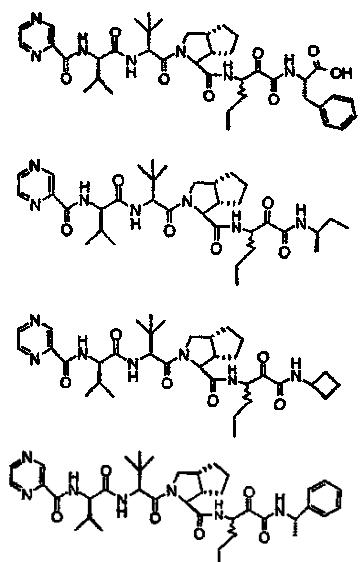


Пример 4. Соединения S-W.

К DCM раствору (10 мл) соединения xxv (320 мг, 0,5 ммоль) добавляют DMP реагент (272 мг, 0,65 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч и гасят 10% Na₂SO₃ в течение 20 мин. Образовавшуюся смесь затем экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (80% EtOAc/гексаны), получая 170 мг (53%) соединения S.

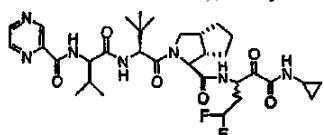


Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения T-W:



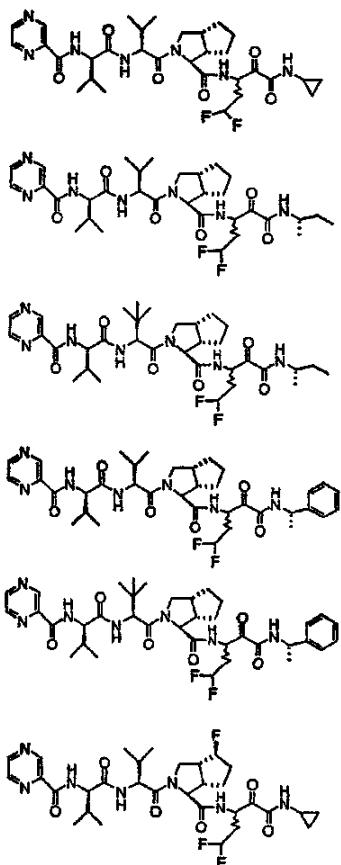
Пример 5. Соединения X-AD.

К DCM раствору (20 мл) соединения xxvi (400 мг, 0,6 ммоль) добавляют DMP реагент (329 мг, 0,78 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, 1,5 ч и гасят 10% Na₂NO₃ в течение 20 мин. Образовавшуюся смесь затем экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (70-100% EtOAc/гексаны), получая 210 мг (53%) соединения X.



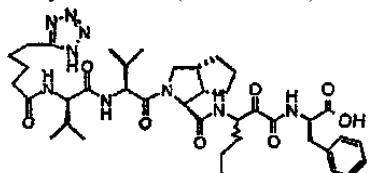
Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают сле-

дующие соединения Y-AD:

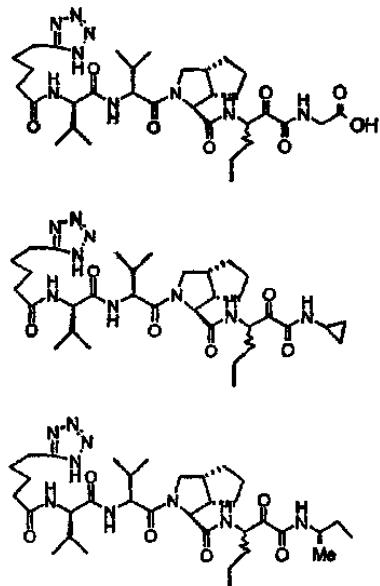


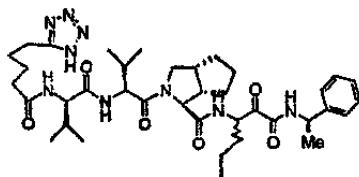
Пример 6. Соединения AE-AI.

Соединение xxxiii (150 мг; 0,076 ммоль) растворяют в 5 мл TFA и перемешивают в течение двух дней. Продукт очищают ОФ-ВЭЖХ, получая 40 мг (33% выход) соединения AE.



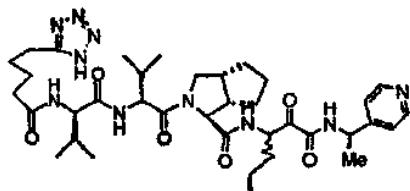
Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения AF-AI:





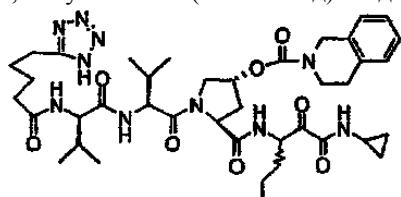
Пример 7. Соединение AJ.

Соединение xxxviii (180 мг, 0,21 ммоль) растворяют в чистом TFA (5 мл) и оставляют на 3 дня при температуре, близкой к комнатной. По прошествии указанного времени реакционную смесь концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают ВЭЖХ с обращенной фазой, получая 50 мг (32%) соединения AJ.

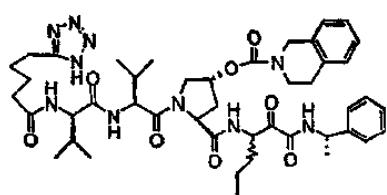
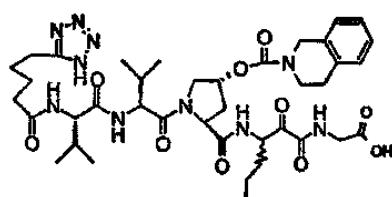


Пример 8. Соединения AK-AM.

Соединение xxxix (150 мг; 0,16 ммоль) растворяют в 4,5 мл TFA и перемешивают в течение трех дней. Продукт очищают ОФ-ВЭЖХ, получая 70 мг (54% выход) соединения AK.

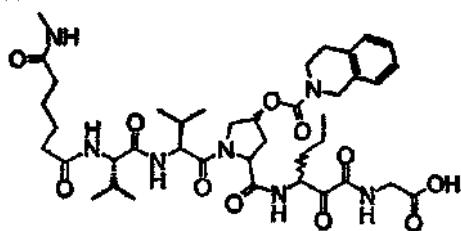


Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения AL-AM:



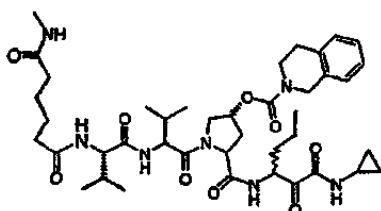
Пример 9. Соединения AN.

Соединение lii (80 мг) растворяют в 3 мл TFA и 3 мл DCM. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 5 ч. Растворитель удаляют упариванием. Полученный остаток очищают ВЭЖХ, получая 62 мг (83%) соединения AN.



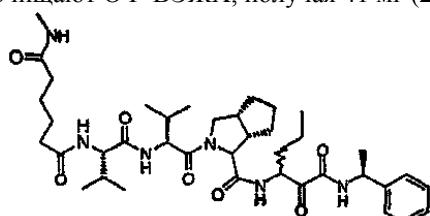
Пример 10. Соединения AO.

Соединение liii (160 мг; 0,2 ммоль) растворяют в 5 мл DCM и добавляют DMP реагент (170 мг; 0,4 ммоль). Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение трех часов. Растворитель удаляют упариванием и остаток растворяют в смеси 50% ацетонитрил/вода и очищают ОФ-ВЭЖХ, получая 51 мг (32%) соединения AO.



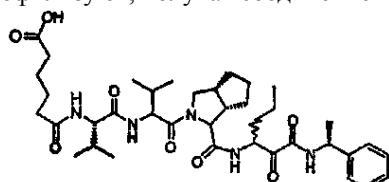
Пример 11. Соединения АР.

Соединение lix (162 мг; 0,22 ммоль) растворяют в 8 мл DCM и добавляют DMP реагент (189 мг; 0,44 ммоль). Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 3 ч. Растворитель удаляют упариванием и продукт очищают ОФ-ВЭЖХ, получая 41 мг (25%) соединения АР.



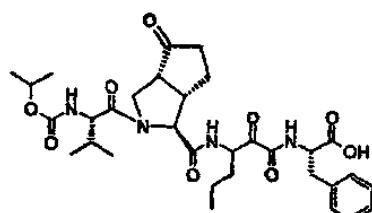
Пример 12. Соединения AQ.

Соединение Ix (70 мг; 0,09 ммоль) растворяют в 5 мл TFA и 5 мл DCM. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 3 ч. Растворитель удаляют в вакууме и остаток растворяют в смеси 50% ацетонитрил/вода и лиофилизируют, получая соединение AQ в виде порошка.

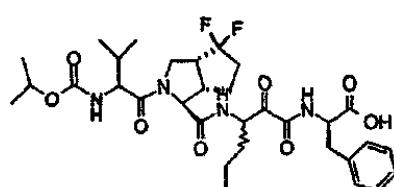
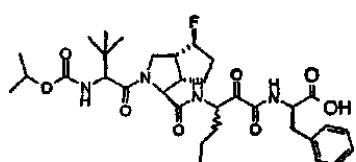
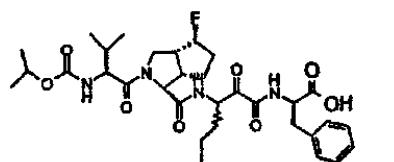


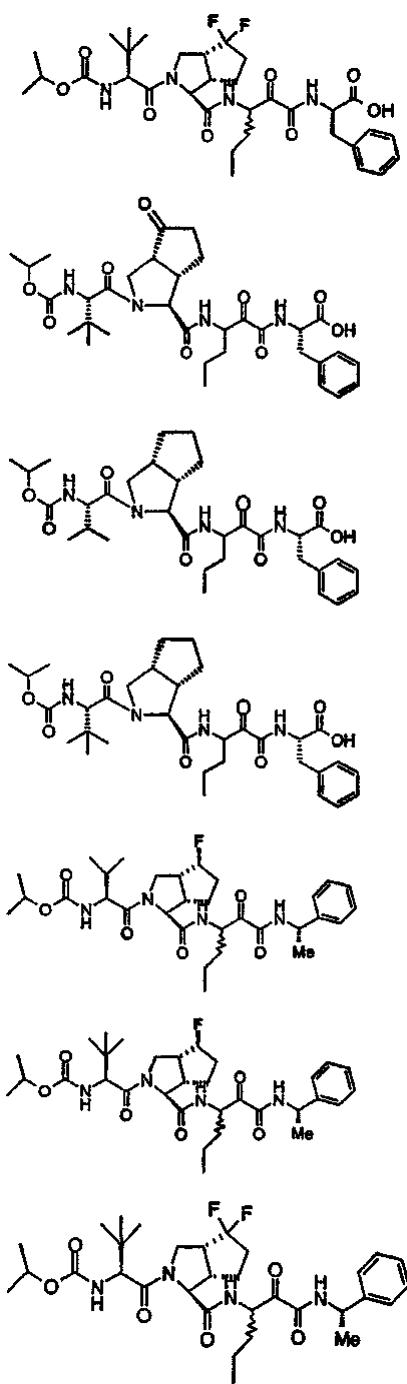
Пример 13. Соединения AR-BG.

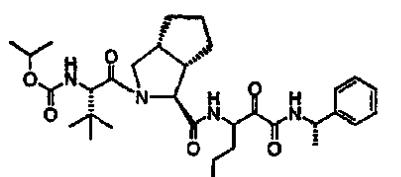
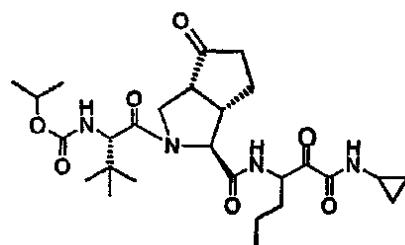
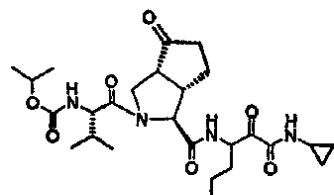
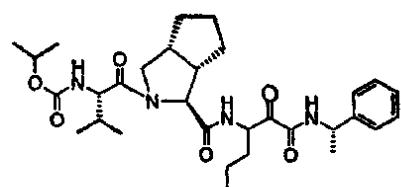
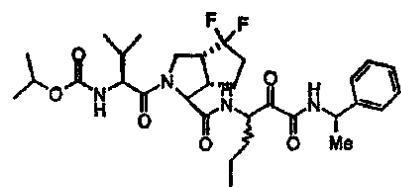
Соединение Ixvi (223 мг, 0,326 ммоль) перемешивают в растворе TFA (5 мл) и DCM (5 мл) 4 ч. TCX (силикагель: 2% MeOH/EtOAc) свидетельствует о полной конверсии в более медленно перемещающийся продукт. Растворитель удаляют при пониженном давлении и продукт лиофилизируют, получая 198 мг (97%) соединения AR.



Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения AS-BG:

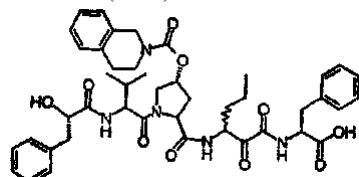




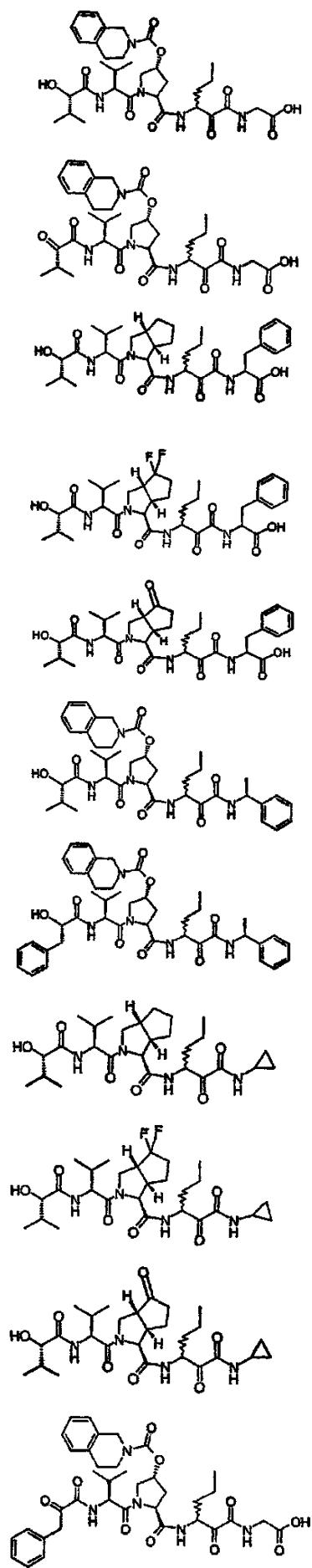


Пример 14. Соединения ВН-BS.

Соединение Ixxiii (150 мг, 0,15 ммоль) поглощают DCM (3 мл). К указанному раствору добавляют TFA (1,5 мл). Образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи. По прошествии указанного времени реакционную смесь концентрируют в вакууме, получая остаток. Остаток очищают ВЭЖХ с обращенной фазой и лиофилизируют, получая 60 мг (50%) соединения ВН.

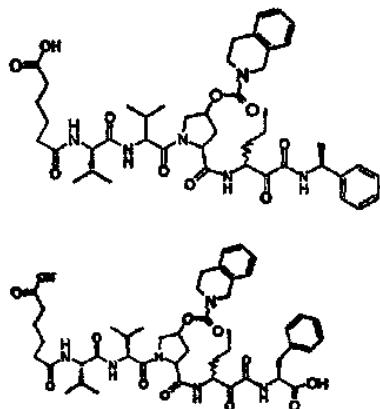


Следуя указанному выше способу и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения BI-BS:



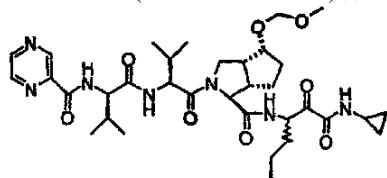
Пример 15. Соединения BT-BU.

Следуя методике примера 12 и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения BT-BU:



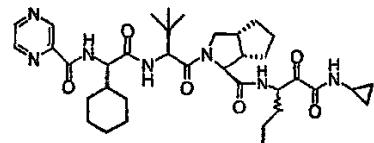
Пример 16. Соединение BV.

К дихлорметановому раствору (4,2 мл) соединения Ixxvii (143 мг, 0,21 ммоль) добавляют DMP реагент (165 мг, 0,39 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч и гасят 10% Na₂SO₃ (водн.) в течение 20 мин. Полученную смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат над MgSO₄ и концентрируют до желтого масла. Очистка хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc) дает 124 мг (79%) соединения BV.

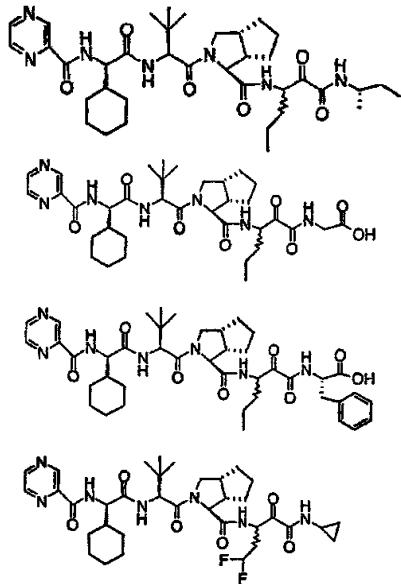


Пример 17. Соединения BW-CA.

К дихлорметановому раствору (20 мл) соединения Ixxxix (420 мг, 0,62 ммоль) добавляют DMP реагент (342 мг, 0,81 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 1 ч и гасят 10% Na₂SO₃ в течение 20 мин. Образовавшуюся смесь затем экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (80% EtOAc/тексан), получая 208 мг (50%) соединения BW.

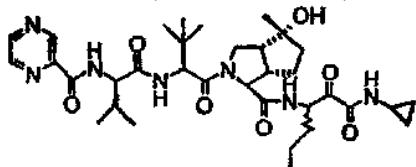


Следуя указанному выше способу, но, используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения BX-CA:

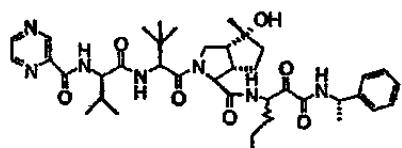


Пример 18. Соединения СВ-СС.

К дихлорметановому раствору (6,5 мл) соединения Ixxxvii (200 мг, 0,3 ммоль) добавляют DMP реагент (227 мг, 0,54 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч и гасят 10% Na₂SO₃ (водн.) в течение 20 мин. Полученную смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат над MgSO₄ и концентрируют до желтого масла. Очистка хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc) дает 138 мг (70%) соединения СВ.

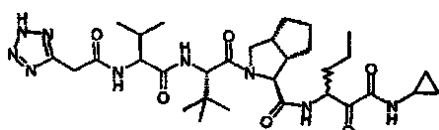


Следуя указанному выше способу, но, используя соответствующие исходные вещества, получают следующее соединение СС:



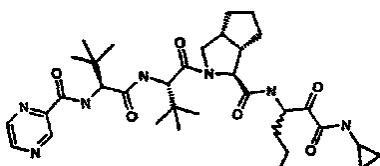
Пример 19. Соединение CD.

Соединение Ixxxxviii (40 мг, 0,05 ммоль) поглощают TFA (3 мл). Раствор перемешивают в течение двух ночей и концентрируют. Остаток очищают ВЭЖХ с обращенной фазой, получая 25 мг (74%) соединения CD.



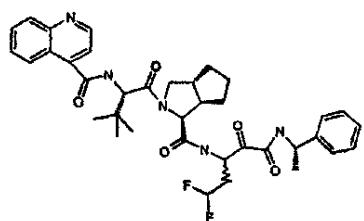
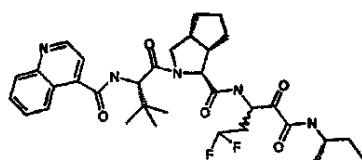
Пример 20. Соединение CE.

Следуя методике примера 17 и используя соответствующие исходные вещества, получают следующее соединение CE:



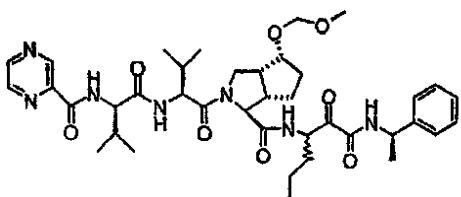
Пример 21. Соединения CF-CG.

Следуя методике примера 14 и используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения CF-CG:



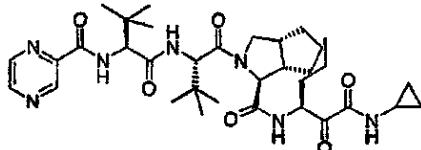
Пример 22. Соединение CH.

Следуя методике примера 16 и используя соответствующие исходные вещества, получают следующее соединение CH:

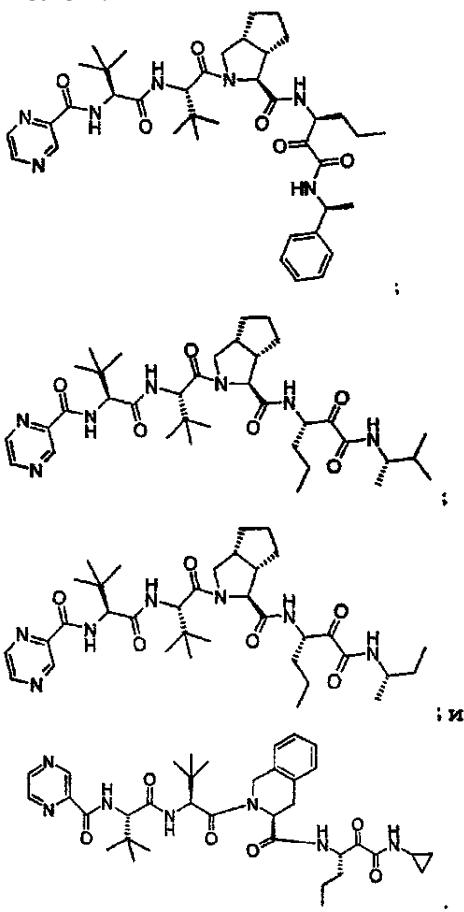


Пример 23. Соединения СI-СМ.

Соединение cxii (490 мг, 0,75 ммоль) растворяют в DCM (6 мл). К указанному раствору добавляют DMP реагент (380 мг, 0,9 ммоль) и перемешивают 1 ч. Реакционную смесь гасят 10% раствором Na_2SO_3 и затем органическую фазу промывают насыщенным NaHCO_3 и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы, полученный остаток очищают хроматографией, используя 70% EtOAc/гексан, получают соединение СI (325 мг, 66,4%).

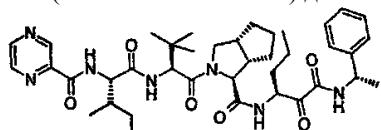


Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения CJ-CM:



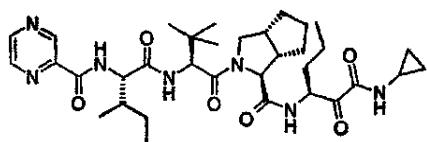
Пример 24. Соединения СН.

К DCM/ТГФ раствору (3 мл/3 мл) соединения cxviii (335 мг, 0,46 ммоль) добавляют DMP реагент (300 мг, 0,69 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч и гасят 10% Na_2SO_3 (водн.) в течение 20 мин. Полученную смесь экстрагируют EtOAc. Органическую фазу промывают насыщенным раствором соли, сушат над MgSO_4 и концентрируют, получая желтое масло. Очистка хроматографией на силикагеле (80% EtOAc/гексаны) дает соединение СН (220 мг, 67%).

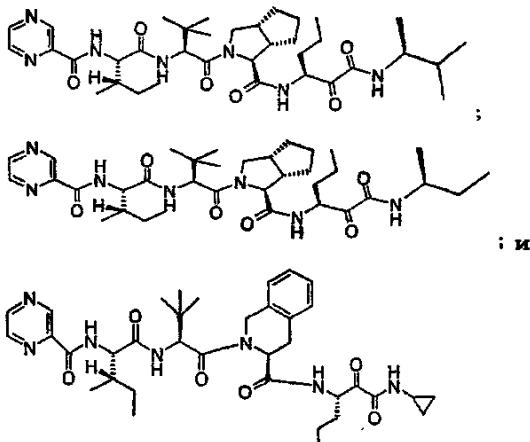


Пример 25. Соединения СО-CR.

К DCM/ТГФ раствору (1,5 мл/1,5 мл) соединения cxix (164 мг, 0,25 ммоль) добавляют DMP реагент (159 мг, 0,38 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч и гасят 10% Na_2SO_3 (водн.) в течение 20 мин. Полученную смесь экстрагируют EtOAc. Органическую фазу промывают насыщенным раствором соли, сушат над MgSO_4 и концентрируют до желтого масла. Очистка хроматографией на силикагеле (70% EtOAc/гексаны) дает соединение СО (100 мг, 61%).

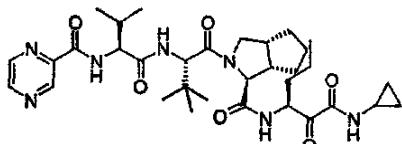


Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения CP-СR:

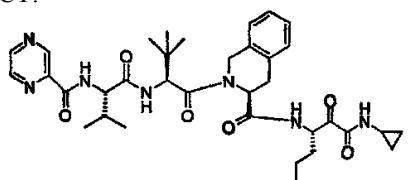


Пример 26. Соединения CS-СT.

Соединение схх растворяют в DCM (3 мл). К раствору добавляют DMP реагент (180 мг, 0,41 ммоль) и затем перемешивают в течение 1 ч. Реакционную смесь гасят 10% Na₂SO₃ и затем органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы остаток очищают хроматографией, используя 100% EtOAc, и получают соединение CS (95 мг, 43,7%).

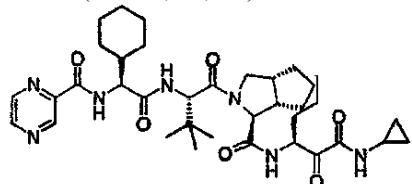


Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующее соединение СТ:

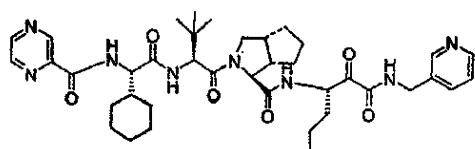
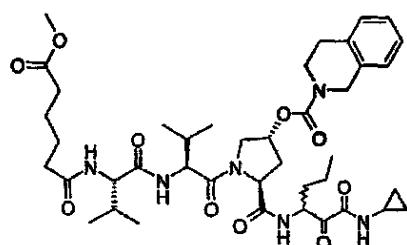


Пример 27. Соединения CU, EI, EK-ЕМ, EO-EZ и FA-FG.

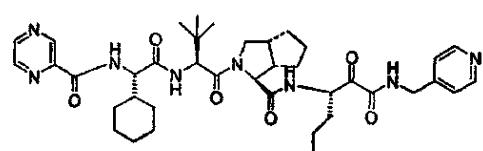
Соединение сххvii (356 мг, 0,52 ммоль) растворяют в DCM (5 мл). К указанному раствору добавляют DMP реагент (270 мг, 0,63 ммоль) и перемешивают 1 ч. Реакционную смесь гасят 10% Na₂SO₃ и затем органическую фазу отделяют и промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органического растворителя остаток очищают хроматографией, используя 100% EtOAc, и получают соединение CU (200 мг, 56,3%). Т.пл. 225-235°C.



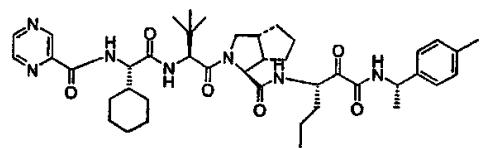
Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения EI, EK-ЕМ, EO-EZ и FA-FH:



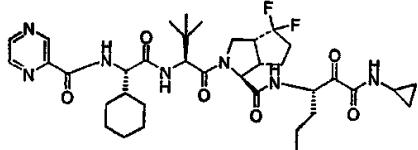
EK,



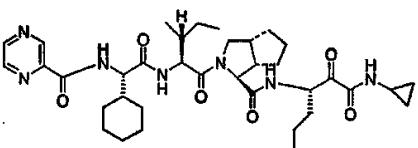
EL,



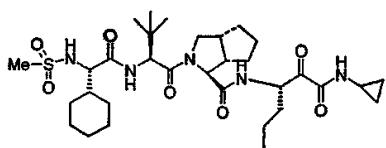
EM,



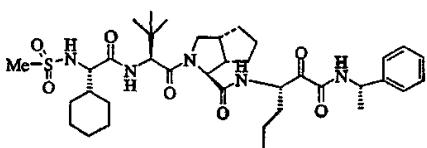
EO,



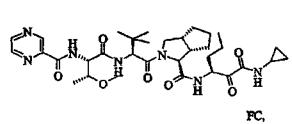
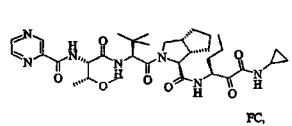
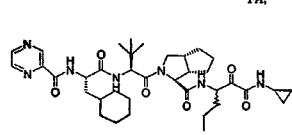
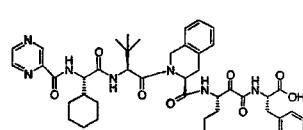
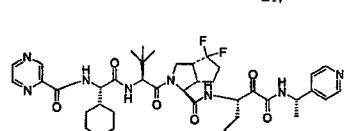
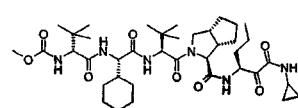
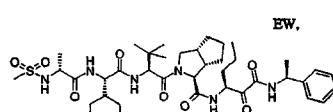
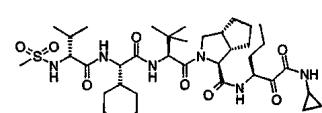
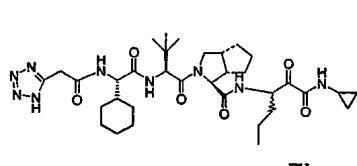
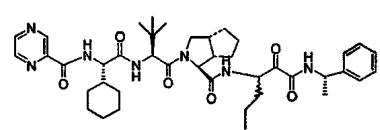
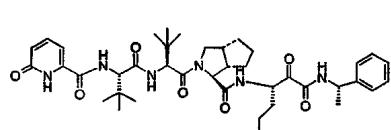
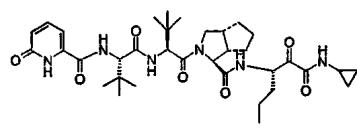
EP,

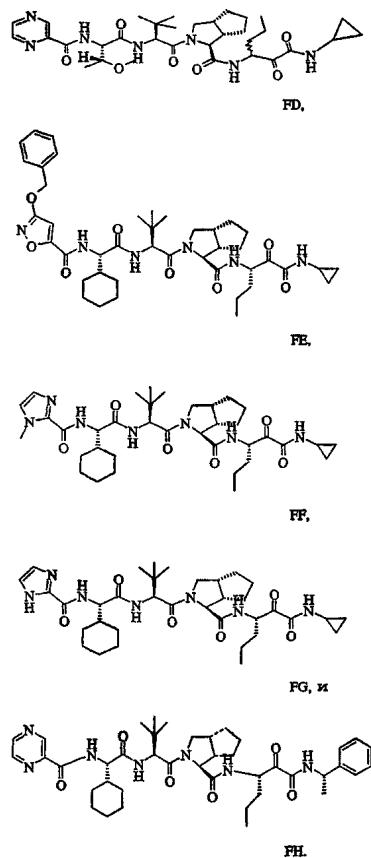


EQ,



ER,

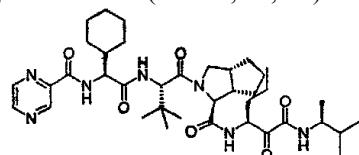




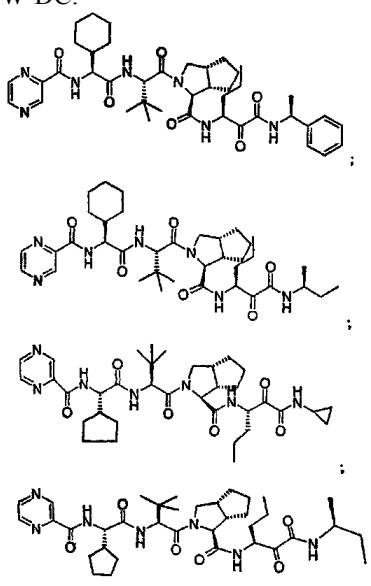
Соединения CV-DC.

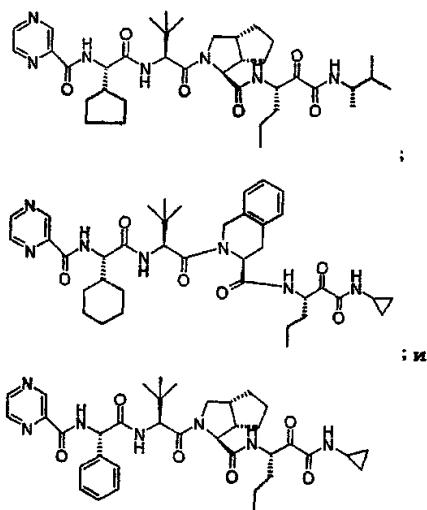
Соединение cxxx (330 мг, 0,46 ммоль) растворяют в DCM (5 мл). К указанному раствору добавляют DMP реагент (240 мг, 0,56 ммоль) и перемешивают 1 ч. Реакционную смесь гасят 10% Na₂SO₃ и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли.

После концентрирования органической фазы полученный остаток очищают хроматографией, используя 100% EtOAc, получают соединение cxxx (280 мг, 85,9%).



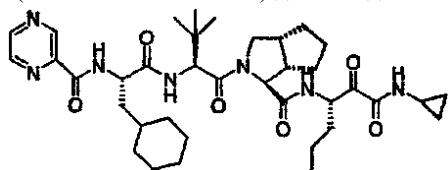
Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения CW-DC:



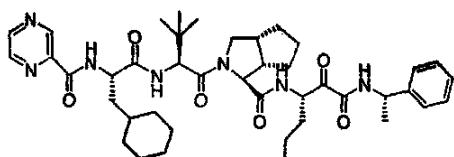


Пример 29. Соединения DD-DE.

К DCM раствору (6 мл) соединения cxxxviii (400 мг, 0,57 ммоль) добавляют DMP реагент (362 мг, 0,85 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч и гасят 10% Na₂SO₃ (водн.) в течение 20 мин. Полученную смесь экстрагируют EtOAc. Экстрагированную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли, сушат над MgSO₄ и концентрируют, получая желтое масло. Очистка на силикагеле (7 0% EtOAc/гексаны) дает соединение DD (201 мг, 51%).

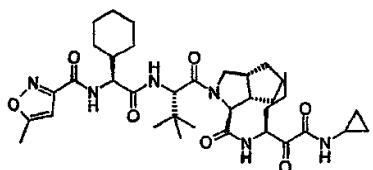


Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующее соединение DE:



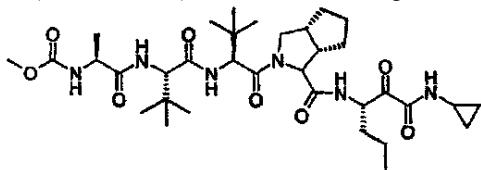
Пример 30. Соединение DF.

Соединение cxxxxii (165 мг, 0,24 ммоль) растворяют в DCM (5 мл). К раствору добавляют DMP реагент (125 мг, 0,29 ммоль) и перемешивают 1 ч. Реакционную смесь гасят 10% Na₂SO₃ и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы полученный остаток очищают хроматографией, используя 70% EtOAc/гексан, получают соединение DF (108 мг, 65,6%).



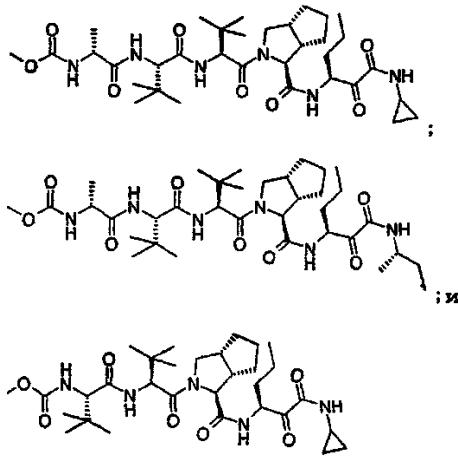
Пример 31. Соединения DG-DJ.

К раствору соединения cil (0,350 г, 0,516 ммоль) в DCM (15 мл), охлажденному на ледяной бане, добавляют DMP реагент (0,281 г, 0,671 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч, затем гасят 10% раствором Na₂SO₃ и перемешивают в течение 20 мин. Полученную смесь экстрагируют DCM (3×20 мл) и органический экстракт сушат (MgSO₄). После фильтрования с целью удаления MgSO₄, фильтрат концентрируют и очищают хроматографией на колонке (70% этилацетат/гексаны), получая конечное соединение DG (0,265 г, 76%) в виде белого твердого вещества.



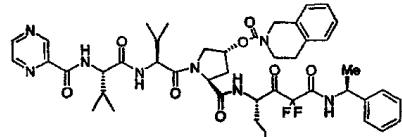
Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным

ным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения DH-DJ:

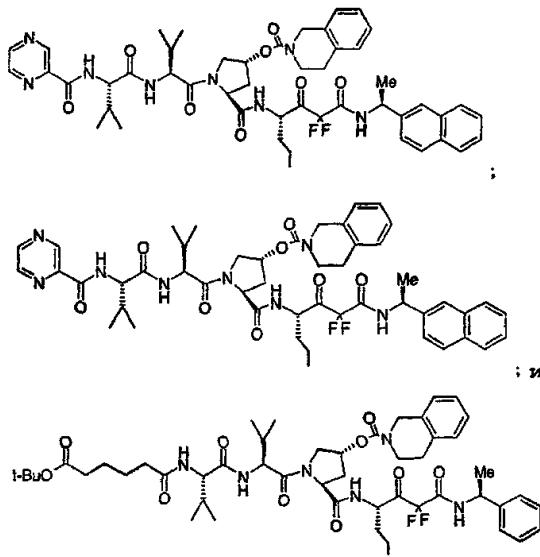


Пример 32. Соединения DK-DN.

DCM раствор соединения clx (108 мг, 0,123 ммоль) обрабатывают DMP реагентом (78 мг, 0,185 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 1 ч реакционную смесь разбавляют EtOAc (50 мл) и затем гасят 10% Na₂SO₃. После перемешивания в течение 30 мин органическую фазу отделяют и промывают NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (80% EtOAc/гексан), что дает соединение DK (84 мг, 78%)

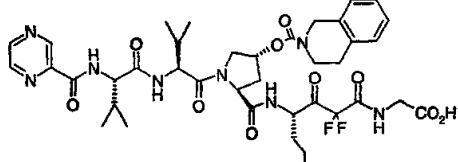


Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения DL-DN

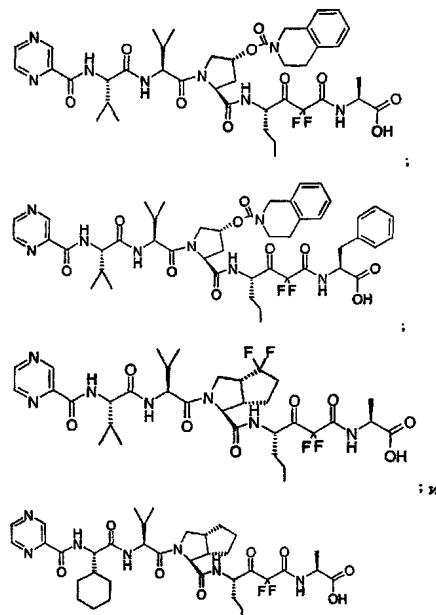


Пример 33. Соединения DO-DS.

EtOH раствор (10 мл) соединения clxii (174 мг, 0,189 ммоль) гидрируют, используя Pd/C (30% экв., 60 мг, 10% содержание палладия) в течение 2,5 ч. Затем катализатор отфильтровывают. Полученный фильтрат концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают полупрепартивной хроматографией с обращенной фазой и лиофилизируют, получая соединение DO с 70% выходом



Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения DP-DS:



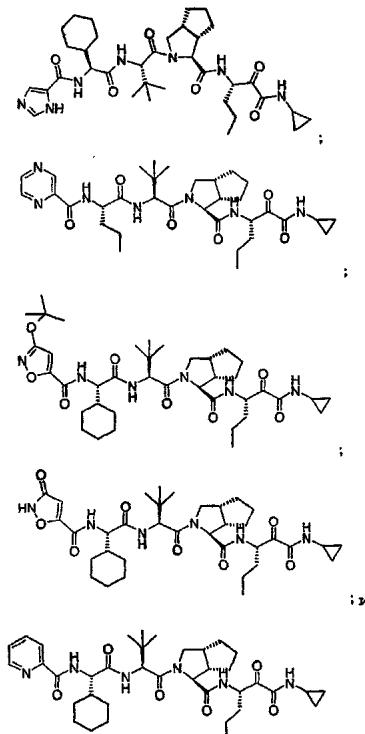
Пример 34. Соединение CW.

Соединение clxiii (175 мг, 0,24 ммоль) поглощают DCM (3 мл). К указанному раствору добавляют DMP реагент (120 мг, 0,28 ммоль) и перемешивают 1 ч. Реакционную смесь гасят 10% Na₂SO₃ и промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Очистка 70% EtOAc дает соединение CW (134 мг, 75%).

Пример 35. Соединения CY и DT-DX.

К DCM раствору (15 мл) clxxii (290 мг, 0,43 ммоль) добавляют DMP реагент (239 мг, 0,56 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч и гасят 10% Na₂SO₃ в течение 20 мин. Образовавшуюся смесь затем экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (8-100% EtOAc/гексан), получая соединение CY (151 мг, 52%).

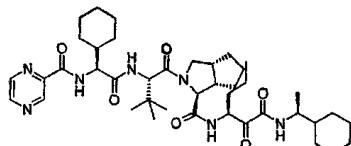
Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения DT-DX:



Пример 36. Соединения DY.

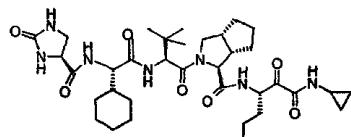
Соединение Ixxxv (1,17 ммоль) поглощают DCM (5 мл). К указанному раствору добавляют DMP реагент (545 мг, 1,3 ммоль) и перемешивают 1 ч. Реакционную смесь гасят P-Na₂SO₃ (1,5 ммоль/г полимера) и перемешивают один час. Добавляют P-TBD полимерный поглотитель* (2,5 ммоль/г полимера) и перемешивают 45 мин. Полученную смесь фильтруют и очищают 50% EtOAc, получая соединение DY (440 мг, 50,2% за две стадии).

*Ссылка относительно P-TBD полимерного поглотителя: J. Parlow et al. Tetrahedron. 55, 6785-6796 (1999).



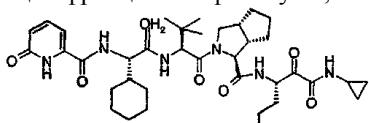
Пример 37. Соединение DZ.

Исходное вещество, соединение clxxxxi (94 мг, 0,14 ммоль), растворяют в смеси ТГФ (10 мл) и DCM (20 мл). Затем добавляют DMP реагент (118 мг, 0,28 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 ч, реакционную смесь переносят в делительную воронку, содержащую Dri Solv ТГФ (120 мл). Реакционную смесь промывают 10% Na₂SO₃ (50 мл) и затем насыщенным раствором соли (75 мл). Затем органический слой отделяют, сушат над MgSO₄ и растворитель удаляют при пониженном давлении. После хроматографии (силикагель: элюирование смесью 50% Dri Solv ТГФ/EtOAc и затем 4% MeOH/TГФ), фракции анализируют МС. Соответствующие фракции лиофилизируют, получая соединение DZ (38,8 мг, 41%).

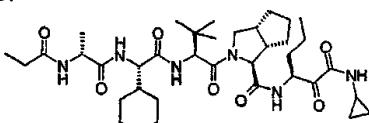


Пример 38. Соединения EA-EB.

Исходное соединение clxxxxv (185 мг, 0,26 ммоль) растворяют в ТГФ (20 мл). Затем добавляют DMP реагент (219 мг, 0,52 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 1 ч ТСХ свидетельствует о завершении превращения в кетон (5% MeOH/TГФ). Реакционную смесь переносят в делительную воронку, содержащую Dri Solv ТГФ (120 мл). Реакционную смесь промывают 10% Na₂SO₃ (50 мл) и затем насыщенным раствором соли (75 мл). Затем органический слой отделяют, сушат над MgSO₄ и растворитель удаляют при пониженном давлении, получая остаток, который очишают хроматографией (силикагель: элюирование смесью 50% Dri Solv ТГФ/EtOAc и затем 4% MeOH/TГФ), и фракции контролируют по УФ и МС. Подходящие фракции лиофилизируют, получая соединение EA (159 мг, 88%).

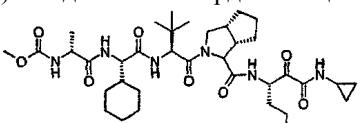


Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующее соединение EB:

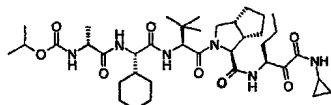


Пример 39. Соединения EC-ED.

К раствору соединения clxxxxviii (0,341 г, 0,503 ммоль) в DCM (15 мл), охлажденному на ледяной бане добавляют DMP реагент (0,277 г, 0,654 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч, затем гасят 10% раствором Na₂SO₃ и перемешивают в течение 20 мин. Полученную смесь экстрагируют DCM (3× 20 мл) и органический экстракт сушат (MgSO₄). После фильтрования с целью удаления MgSO₄ фильтрат концентрируют и очищают хроматографией на колонке (70% EtOAc/гексан), получая соединение EC (0,183 г, 54%) в виде белого твердого вещества.

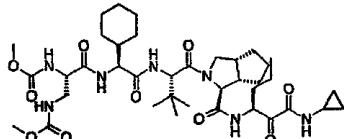


Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующее соединение ED:

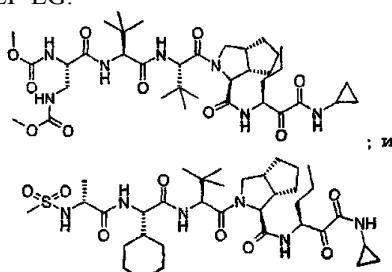


Пример 40. Соединения ЕЕ-ЕГ.

Соединение ccii (290 мг, 0,37 ммоль) поглощают DCM (5 мл). К указанному раствору добавляют DMP реагент (175 мг, 0,41 ммоль) и перемешивают 1 ч. Реакционную смесь гасят P-Na₂SO₃ (1,5 ммоль/г полимера) и перемешивают 1 ч. Погашенный DMP реагент поглощают P-TBD (2,5 ммоль/г полимера) и перемешивают 1 ч. Полученную смесь фильтруют и промывают DCM, прежде чем сконцентрировать до остаточного продукта. Полученный остаток очишают 50% EtOAc/Гексан, получая соединение ЕЕ (440 мг, 28%).

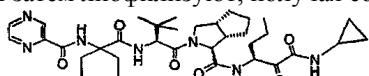


Следуя указанному выше способу получения приведенного выше соединения и способам, связанным с получением его промежуточного соединения, но используя соответствующие исходные вещества, получают следующие соединения EF-EG:



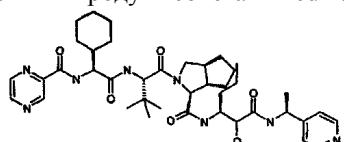
Пример 41. Соединение ЕН.

К DCM раствору (3 мл) соединения cciii (140 мг, 0,2 ммоль) добавляют DMP реагент (133 мг, 0,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч и гасят 10% Na₂SO₃ (водн.) в течение 20 мин. Полученную смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат над MgSO₄, концентрируют до желтого масла, которое очишают на силикагеле (70% EtOAc/гексан), и затем лиофилизируют, получая соединение ЕН (50 мг, 38%).

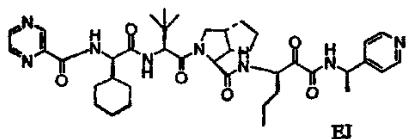


Пример 42. Соединение ЕJ.

Соединение lxxxiii (520 мг, 1 ммоль) поглощают DCM (5 мл). К указанному выше раствору добавляют РуBOP (624 мг, 1,2 ммоль) и перемешивают 5 мин. Соединение cdviii (300 мг, 1,2 ммоль) в ТГФ (5 мл) добавляют по каплям к указанному раствору, с последующим добавлением DIPEA (0,22 мл, 1,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи в атмосфере азота. По прошествии указанного времени реакционную смесь разбавляют EtOAc, промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат MgSO₄, фильтруют и концентрируют, получая неочищенный промежуточный продукт сочетания cdix.

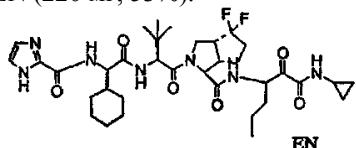


Промежуточное соединение cdix (~1 ммоль) поглощают DCM (10 мл). К полученному раствору добавляют периодинан Десс-Мартина (466 мг, 1,1 ммоль). После перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре реакционную смесь гасят полимерносвязанным Na₂SO₃ (740 мг, 1,5 ммоль DMP/г полимера) и перемешивают 45 мин. Затем реакционную смесь очищают от примесей с помощью полимера с полимерносвязанным TBD (440 мг, 2,5 ммоль DMP/г полимера). Полученную смесь перемешивают 45 мин и затем фильтруют. Очистку выполняют в 5% EtOH/EtOAc, получая соединение ЕJ (245 мг, 32% за 2 стадии). Литературная ссылка по методике обработки может быть найдена в Tetrahedron 55 (1999) 6785-6796.



Пример 43. Соединение ЕN.

Промежуточное соединение cdvii (415 мг, 0,59 ммоль) поглощают DCM (10 мл) и ТГФ (10 мл). Добавляют трет-БuOH (300 мкл) с последующим добавлением периодинана Десс-Мартина (750 мг, 1,77 ммоль). Реакционную смесь перемешивают 50 мин и затем гасят P-Na₂SO₃ (1,5 ммоль DMP/г полимера). После перемешивания в течение 20 мин при комнатной температуре реакционную смесь очищают от примесей с помощью P-TBD (2,5 ммоль DMP/г полимера). После перемешивания в течение 1 ч полученную смесь фильтруют и концентрируют. Продукт очишают хроматографией на силикагеле (50-70% EtOAc/гексан), получая соединение EN (220 мг, 53%).



В приведенной ниже табл. 1 приведены массспектральные [M], полученные для перечисленных соединений.

Таблица 1

LY#	Пример	Найденная масса
	A	733.3
	B	747.2
	C	657.2
	D	769.4
	E	733.4
	F	625.4
	G	639.3
	H	661.4
	I	643.4
	J	707.3
	K	641.3
	L	689.3
	M	639.3
	N	639.4
	O	731.4
	P	687.4
	Q	653.4
	R	701.4
	S	639.3
	T	747.1
	U	655.4
	V	653.4
	W	703.4
	X	661.3
	Y	647.3
	Z	663.3
	AA	667.4
	AB	711.4
	AC	725.4
	AD	647.3
	AE	779.4
	AF	689.3
	AG	671.4
	AK	806.4
	AH	687.5
	AI	735.4
	AJ	736.5
	AM	870.4
	AN	813.3
	AP	724.4
	AQ	653.4
	AR	628.2
	AW	642.2
	AX	614.2
	AY	628.3
	BD	570.3
	BE	520.2
	BF	534.3
	BG	584.3
	BU	890.3
	BV	685.4
	BW	679.3
	BX	695.3
	BY	697.3
	BZ	787.4

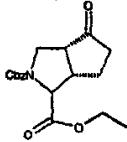
CA	701.3
CB	669.4
CC	733.5
CD	643.3
CE	653.5
CH	749.4
CI	653.3
CJ	717.5
CK	683.4
CL	669.3
CM	675.2
CN	717.2
CO	653.3
CP	683.3
CQ	669.3
CR	675.2
CT	661.8
CS	639.3
CU	679.2
CV	709.3
CW	743.3
CX	695.3
CY	665.2
CZ	681.3
DA	695.3
DB	701.2
DC	673.3
DD	693.3
DE	757.4
DF	682.3
DG	676.3
DH	676.2
DI	692.5
DJ	605.2
DK	874.4
DL	924.5
DM	924.2
DN	952.7
DO	830
DP	842.5
DT	667.4
DU	639.2
DV	740.3
DW	684.2
DX	678.5
DY	749.3
DZ	685.3
EA	649.3
EB	700.3
EC	702.3
ED	730.3
EE	775.3
EF	749.3
EG	722.3
EH	665.2
EI	796.4
EJ	744.3
EK	730.5
EL	730.5
EM	757.3
EN	703.5
EO	715.5
EP	679.2
EQ	651.3
ER	715.3
ES	668.5
ET	732.5
EU	743.3
EV	683.3
EW	750.4
EX	786.4
EY	744.5
EZ	780.4
FB	693.4
FC	655.3
FD	655.3
FE	774.4
FF	681.5
PG	667.5

В табл. 2 приведены масс-спектры высокого разрешения (ВРМС) для следующих соединений:
Таблица 2

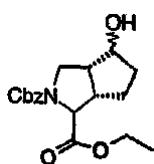
Пример	Молекулярная формула (M+1)	Рассчитанный MS (M+1)	Найденная масса (M+1)
L	C37H52N7O6	690.3979	690.3986
M	C33H50N7O6	640.3822	640.3822
Z	C32H48F2N7O6	664.3634	664.3627
AB	C36H48F2N7O6	712.3634	712.3649
CE	C34H52N7O6	654.3979	654.3967
EN	C35H52N7O6F2	704.3947	704.3945
EK	C37H63N6O8S	751.4428	750.4350 (M)
EC	C36H59N6O8	703.4395	703.4382
CA	C35H50N7O6F2	702.3790	702.3801
EZ	C40H55N8O6F2	781.4213	781.4196
EU	C36H52N7O6F2	716.3947	716.3929
CY	C35H52N7O6	666.3979	666.3966
BX	C37H58N7O6	696.4448	696.4432
S	C33H50N7O6	640.3823	640.3831
BW	C36H54N7O6	680.4136	680.4126
CU	C36H54N7O6	680.4136	680.4128
EJ	C40H57N8O6	745.4401	745.4417
EM	C35H54N7O6	668.4136	668.4139
не обозначен	C41H58N7O6	744.4448	744.4691

Пример полупродукта 1. Соединение ii.

К этанольному раствору (40 мл) соединения i (8,1 г, 24,4 ммоль) добавляют NaBH₄

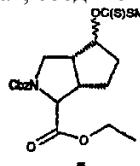


(924 мг, 24,4 ммоль) при -10°C. Реакционную смесь перемешивают при указанной температуре в течение 30 мин и затем гасят AcOH (3 мл). Реакционную смесь разбавляют EtOAc (250 мл) и промывают NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органический слой сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (50% EtOAc/гексан), что дает 7,85 г (97%) соединения ii.



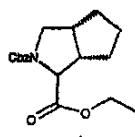
Пример полупродукта 2. Соединение iii.

К ТГФ раствору (70 мл) соединения ii (4,48 г, 13,4 ммоль) добавляют при 0°C NaH (699 мг, 60%, 17,42 ммоль). После перемешивания при указанной температуре в течение 40 мин добавляют чистый MeI (1,25 мл, 20,1 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. По прошествии указанного времени реакционную смесь осторожно гасят насыщенным раствором NH₄Cl при 0°C. Реакционную смесь экстрагируют Et₂O и EtOAc. Органический слой промывают водой, насыщенным раствором соли и сушат Na₂SO₄. Полученный таким образом органический слой концентрируют в вакууме, что дает ксантогенат, соединение iii.



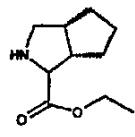
Пример полупродукта 3. Соединение iv.

Ксантогенат, соединение iii (~13,4 ммоль), растворяют в толуоле (100 мл). К указанному раствору добавляют AIBN (216 мг, 1,34 ммоль). Образовавшийся раствор дегазируют сухим азотом и затем обрабатывают n-Bu₃SnH (5,4 мл, 20,1 ммоль). Реакционную смесь нагревают до 90°C в течение 3 ч. По прошествии указанного времени реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (15-20% EtOAc/гексан), что дает 2,8 г (66% в расчете на соединение ii) соединения iv.



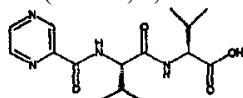
Пример полупродукта 4. Соединение v.

К этанольному раствору (21 мл) соединения iv (1 г, 3,15 ммоль) добавляют $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (655 мг, 20%, 0,95 ммоль) в токе азота. Полученную реакционную смесь гидрируют стандартным способом (1,5 атм). Через 5 ч источник гидрирования удаляют и реакционную смесь фильтруют. Фильтраты концентрируют в вакууме, что дает свободный амин, соединение v.

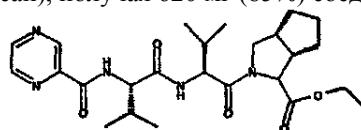


Пример полупродукта 5. Соединение vi.

К DCM раствору (10 мл) соединения vii (629 мг, 1,95 ммоль) добавляют

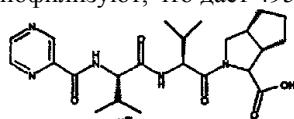


при температуре, близкой к комнатной, HOAt (265 мг, 1,95 ммоль) и затем 1М раствор DCC в DCM (1,95 мл, 1,95 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин к HOAt-активированной кислоте добавляют DCM раствор (3 мл) соединения v (1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. По прошествии указанного времени реакционную смесь фильтруют через целинит. Фильтраты разбавляют EtOAc (75 мл) и промывают водой и насыщенным раствором соли. Органический слой сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (70-80% EtOAc/гексан), получая 620 мг (85%) соединения vi.



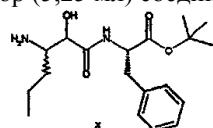
Пример полупродукта 6. Соединение viii.

К этанольному раствору (10 мл) соединения vi (615 мг, 1,26 ммоль) добавляют 2н. водный раствор NaOH (1,26 мл, 2,52 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной, и затем подкисляют до pH 3, используя Dowex кислотные смолы. Твердые вещества отфильтровываются и фильтраты концентрируются в вакууме, получая остаток, который вновь растворяют в 1:1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$. Полученный раствор лиофилизируют, что дает 495 мг (85%) соединения viii.

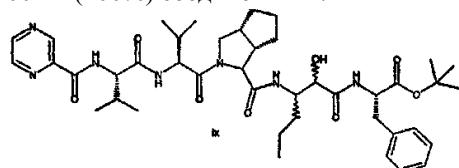


Пример полупродукта 7. Соединение ix.

К DCM раствору (10 мл) соединения viii (230 мг, 0,5 ммоль) добавляют PyBOP (417 мг, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 30 мин. К указанному раствору добавляют затем ТГФ раствор (5,25 мл) соединения x (263 мг, 0,75 ммоль)



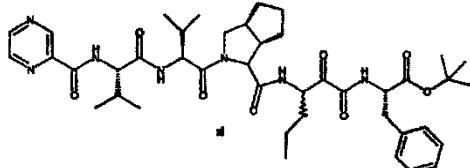
с последующим добавлением DIPEA (0,174 мл, 1 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи и затем гасят водой (30 мл) в течение 30 мин. Реакционную смесь экстрагируют EtOAc (100 мл). Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc), получая ~400 мг (100%) соединения ix.



Пример полупродукта 8. Соединение xi.

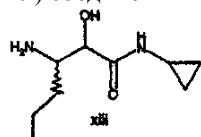
К DCM раствору (10 мл) соединения ix (396 мг, 0,5 ммоль) добавляют DMP реагент (278 мг, 0,65

ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 1 ч и затем гасят 10% Na₂SO₃ в течение 30 мин. Реакционную смесь экстрагируют затем EtOAc (75 мл) и промывают насыщенным раствором соли. Органический слой сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (70% EtOAc/гексаны), получая 320 мг (81%) соединения xi.

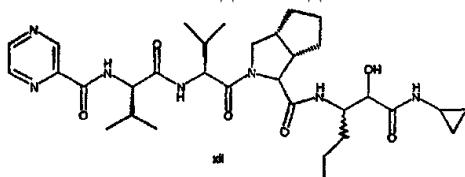


Пример полупродукта 9. Соединение xi'.

К DCM раствору (10 мл) соединения viii (230 мг, 0,5 ммоль) добавляют РуВор (417 мг, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 30 мин. К указанному раствору добавляют ТГФ раствор (3,5 мл) соединения xiii (140 мг, 0,75 ммоль)

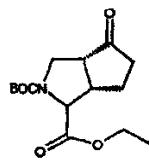


с последующим добавлением DIPEA (0,174 мл, 1 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи и затем гасят водой (30 мл) в течение 30 мин. Реакционную смесь экстрагируют EtOAc (75 мл). Органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc), получая с количественным выходом соединение xi'.



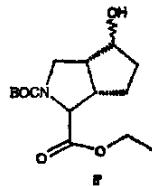
Пример полупродукта 10. Соединение i'.

К метанольному раствору (30 мл) соединения i (5 г, 15,1 ммоль) добавляют (BOC)₂O (3,3 г, 15,1 ммоль) и H₂/Pd (OH)₂/C (1,6 г, 10% Pd содержание). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч и затем фильтруют через целинит дважды. Слой целинита промывают DCM. Объединенные фильтраты концентрируют в вакууме, получая маслянистый остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (40% EtOAc/гексаны), получая 3,8 г (85%) соединения i'.



Пример полупродукта 11. Соединение ii'.

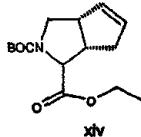
К метанольному раствору (111 мл) соединения i' (3,7 г, 12,5 ммоль) добавляют при 0°C NaBH₄ (0,805 г, 21 ммоль). После перемешивания при 0°C в течение 2,5 ч, реакционный растворитель медленно упаривают в вакууме, получая остаток, который разбавляют EtOAc. Полученный раствор затем дважды промывают водой. Водный слой экстрагируют EtOAc. Объединенные органические слои сушат MgSO₄, фильтруют и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией, что дает 3,76 г (99%) соединения ii'.



Пример полупродукта 12. Соединение xiv.

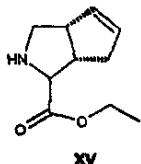
К DCM раствору (180 мл) соединения ii' (3,76 г, 12,3 ммоль) добавляют при 0°C DMAP (5 г, 40,1 ммоль) и затем Tf₂O (4 мл, 23,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 1 ч и при температуре, близкой к комнатной, еще 1,5 ч. Реакционную смесь промывают затем дважды 5% NaHCO₃ и сушат MgSO₄. Полученный таким образом органический слой концентрируют в вакууме, что дает неочищенный трифлат. Полученный трифлат (2,7 г, 6 ммоль) растворяют в DCM (120 мл). К указанному раствору добавляют DMAP (2,5 г, 20,5 ммоль). Полученную реакционную смесь кипятят с обратным хо-

лодильником в течение ночи. По прошествии указанного времени реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и промывают дважды 5% NaHCO₃. Реакционную смесь сушат MgSO₄, фильтруют и концентрируют в вакууме, получая коричневатый маслянистый остаток, который очищают (1% MeOH/DCM), получая 500 мг (30%) соединения XIV.



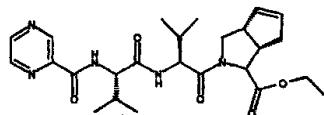
Пример полупродукта 13. Соединение XV.

Соединение XIV (500 мг, 1,8 ммоль) растворяют в 4н. HCl в диоксане (6,75 мл). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, ~4 ч. По прошествии указанного времени, растворитель удаляют в вакууме. Полученный остаток растирают дважды с диэтиловым эфиром, получая почти с количественным выходом HCl-соль соединения XV.



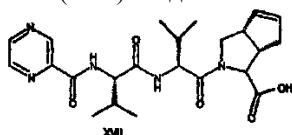
Пример полупродукта 14. Соединение XVI.

К ТГФ раствору (7 мл) соединения VII (57,9 мг, 1,8 ммоль) добавляют HOAt (245 мг, 1,8 ммоль) и DCC (1,8 мл, 1М в DCM). Получают суспензию. После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 15 мин к указанной выше суспензии добавляют ТГФ раствор (6 мл) соединения XV (1,8 ммоль) и DIPEA (0,63 мл, 3,6 ммоль). Затем добавляют дополнительное количество DIPEA (0,8 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной. По прошествии указанного времени полученные таким образом белые твердые вещества отфильтровывают. Белые твердые вещества промывают ТГФ. Объединенные фильтраты и промывные воды концентрируют в вакууме, получая неочищенный продукт, который очищают хроматографией на силикагеле (100% EtOAc), что дает 665 мг (76%) соединения XVI.



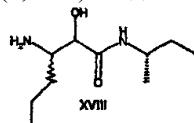
Пример полупродукта 15. Соединение XVII.

К этанольному раствору (8 мл) 7 (665 мг, 1,37 ммоль) добавляют 1н. водный NaOH (2,4 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной, и затем подкисляют до pH 3, используя Dowex кислотные смолы. Твердые вещества фильтруют. Полученные фильтраты концентрируют в вакууме, получая бледно-желтый остаток, который вновь растворяют в 1:1 CH₃CN/H₂O и лиофилизируют, получая 467 мг (74%) соединения XVII.

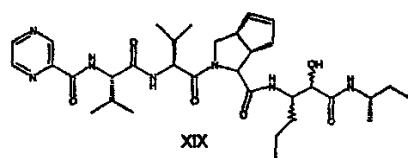


Пример полупродукта 16. Соединение XVIII.

DCM раствор (4 мл) соединения XVII (100 мг, 0,22 ммоль) обрабатывают PyBOP (207 мг, 0,4 ммоль) при температуре, близкой к комнатной, в течение 20 мин. По прошествии указанного времени полученный раствор обрабатывают ТГФ раствором (2,6 мл) соединения XVIII (65 мг, 0,32 ммоль)

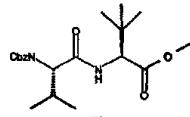


и затем DIPEA (0,076 мл). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 7 ч реакционную смесь гасят водой. Реакционную смесь разбавляют DCM (60 мл). Органический слой отделяют, промывают дважды насыщенным раствором соли и сушат MgSO₄. После фильтрования, концентрирования и хроматографии на силикагеле (5% EtOH/EtOAc) получают 148 мг (~100%) соединения XIX.



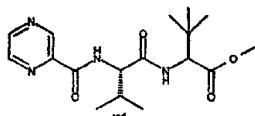
Пример полу продукта 17. Соединение xx.

К ТГФ раствору (100 мл) N-Cbz-L-валина (14,4 г, 57,2 ммоль) добавляют НОВТ (7,72 г, 57,2 ммоль) и EDCI (10,98 г, 57,2 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 20 мин, к полученному раствору добавляют ТГФ раствор (50 мл), содержащий гидрохлорид метилового эфира трет-L-лейцина (10,4 г, 57,2 ммоль) и DIPEA (11,9 мл, 68,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. После стандартной водной обработки и хроматографии на силикагеле (30% EtOAc/гексаны) получают 14 г (64%) соединения xx.



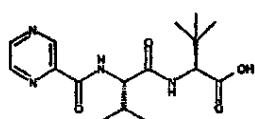
Пример полу продукта 18. Соединение xxi.

К метанольному раствору (80 мл) xx (6,71 г, 17,7 ммоль) добавляют (в токе N_2) Pd/C (1,88 г, 10% Pd содержание). Содержимое сосуда гидрируют (1 атм H_2) в течение ночи при температуре, близкой к комнатной. По прошествии указанного времени реакционную смесь фильтруют через слой целита и концентрируют в вакууме, что дает соответствующий неочищенный свободный амин для следующей стадии. ТГФ раствор указанного амина (~17,7 ммоль) добавляют к ТГФ (46 мл) и ДМФ (5 мл) раствору, содержащему 2-пиразинкарбоновую кислоту (2,85 г, 23 ммоль), Hobbit (3,12 г, 23 ммоль) и EDCI (4,41 г, 23 ммоль). К образовавшейся смеси добавляют затем DIPEA (3,08 г, 17,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной, и затем гасят водой. Реакционную смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли и концентрируют в вакууме, что дает остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (40-50% EtOAc/гексан), получая 3,9 г (63%) соединения xxi.



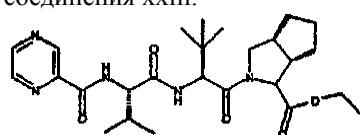
Пример полу продукта 19. Соединение xxii.

К метанольному раствору (40 мл) соединения xxi (4,67 г, 13,34 ммоль) добавляют 2н. NaOH (10 мл, 20 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч. По истечении указанного времени к реакционной смеси добавляют 2н. NaOH (3,3 мл, 6,67 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи, реакционную смесь подкисляют до pH 3, используя кислотную смолу. Реакционную смесь затем фильтруют и фильтраты концентрируют в вакууме, получая остаток, который растворяют в 1:1 CH_3CN/H_2O для лиофилизации. Получают 4,15 г (93%) соединения xxii.



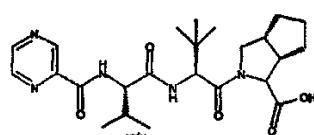
Пример полу продукта 20. Соединение xxiii.

DCM раствор (10 мл) соединения xxii (917 мг, 2,73 ммоль) обрабатывают HOAt (371 мг, 2,73 ммоль) и DCC (2,73 мл, 1 М, 2,73 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь обрабатывают ТГФ раствором (10 мл) соединения v (500 мг, 2,73 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи, отфильтровывают белые твердые вещества (мочевину). Фильтраты концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (60-7 0% EtOAc/гексан), что дает 1,06 г (77%) соединения xxiii.



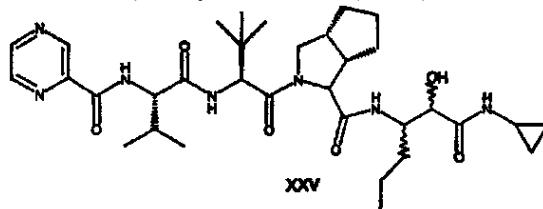
Пример полу продукта 21. Соединение xxiv.

Этанольный раствор (20 мл) соединения xxiii (1,06 г, 2,11 ммоль) обрабатывают 2н. NaOH (2,11 мл, 4,23 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи, реакционную смесь подкисляют до pH 3 с помощью кислотной смолы. Твердые вещества отфильтровывают. Полученные фильтраты концентрируют в вакууме, что дает остаток, который лиофилизируют, получая ~1г (100%) соединения xxiv.



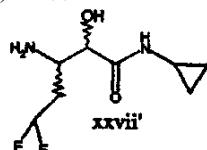
Пример полу продукта 22. Соединение xxv.

DCM раствор (10 мл) соединения xxiv (236,7 мг, 0,5 ммоль) обрабатывают PyBOP (417 мг, 0,8 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 20 мин, реакционную смесь обрабатывают DMF раствором (5,6 мл) соединения xiii (139,5 мг, 0,75 ммоль) и затем DIPEA (0,174 мл, 1 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 8 ч, реакционную смесь гасят водой и экстрагируют EtOAc. Полученный органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc), получая ~320 мг (100%) соединения xxv.

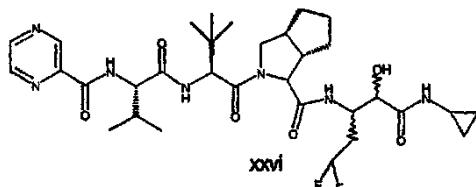


Пример полу продукта 23. Соединение xxvi.

DCM раствор (15 мл) соединения xxiv (355 мг, 0,75 ммоль) обрабатывают PyBOP (622 мг, 1,2 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 20 мин, реакционную смесь обрабатывают TГФ раствором (10 мл) соединения xxvii'



(156 мг, 0,75ммоль) и затем DIPEA (0,26 мл, 1,5 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи, реакционную смесь гасят водой и экстрагируют EtOAc. Полученный органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (2% EtOH/EtOAc), получая ~400 мг (80%) соединения xxvi.



Пример полу продукта 24. Метил 5-цианопентаноат.

Цианид калия (4 г, 61,44 ммоль) растворяют в 70 мл воды и 200 мл метанола. К раствору добавляют 10 г (51,2 ммоль) метил 5-бромпентаноата и смесь нагревают до температуры кипения с обратным холодильником в течение ночи. Реакционную смесь концентрируют досуха. К остатку добавляют 100 мл EtOAc для экстракции продукта. Органическую фазу трижды промывают водой, сушат и концентрируют, получая 5,37 г (74%) метил 5-цианопентаноата в виде масла.

Пример полу продукта 25. Метил 5-тетразол-5-илпентаноат.

Метил 5-цианопентаноат (4,8 г, 34 ммоль) растворяют в толуоле, добавляют триэтиламмонийхлорид (14 г, 102 ммоль) и азид натрия (6,63, 102 ммоль). Смесь нагревают до температуры кипения с обратным холодильником в течение ночи. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, добавляют воду для экстракции (3×100 мл) метил-5-тетразол-5-илпентаноата из органической фазы. К водной фазе добавляют концентрированную HCl для доведения pH до 2. Продукт экстрагируют из водного раствора с помощью EtOAc (3×50 мл). Органические фазы объединяют, сушат и концентрируют, получая 4,25 г (68%) метил 5-тетразол-5-илпентаноата.

Пример полу продукта 26. Метил 5-[N-(1,1-диметилбензил)тетразол-5-ил]пентаноат.

Метил 5-тетразол-5-илпентаноат (4,23 г, 23 ммоль) и трихлоруксусную кислоту (8,69 г, 53 ммоль) растворяют в 50 мл CHCl₃. К раствору добавляют по каплям α-метилстирол (2,72, 23 ммоль) и реакционную смесь оставляют перемешиваться при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют EtOAc до 200 мл и органический слой промывают 10% водным KOH и насыщенным раствором соли. Органический слой сушат, концентрируют. Продукт очищают фланш хроматографией на колонке, получая 6,6 г (95%) метил 5-[N-(1,1-диметилбензил)тетразол-5-ил]пентаноата.

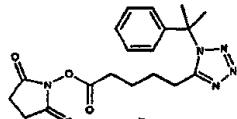
Пример полу продукта 27. 5-[N-(1,1-диметилбензил)тетразол-5-ил]пентановая кислота.

Метил 5-[N-(1,1-диметилбензил)тетразол-5-ил]пентаноат (6,6 г, 21,8 ммоль) растворяют в метаноле (100 мл) и добавляют 23 мл 1н. водного NaOH. Смесь перемешивают в течение ночи и концентрируют для удаления метанола. Остаток растворяют в воде (100 мл) и раствор нейтрализуют добавлением эквивалентного количества 1н. водной HCl. Продукт экстрагируют EtOAc (3×50 мл). Органическую фазу су-

шат и концентрируют, получая 4,75 г (75%) 5-[N-(1,1-диметилбензил)тетразол-5-ил]пентановой кислоты.

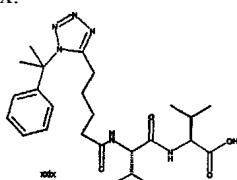
Пример полупродукта 28. Соединение xxvii.

5-[N-(1,1-диметилбензил)тетразол-5-ил]пентановую кислоту (4,75 г, 16,5 ммоль) растворяют в DCM (100 мл), добавляют 4,8 г (24,8 ммоль) EDCI и 6 мл DIPEA. К смеси добавляют N-гидроксилсукининимид (3,8 г, 33 ммоль). Реакционную смесь перемешивают 3 ч при температуре, близкой к комнатной. Смесь разбавляют DCM до 200 мл и раствор трижды промывают водой. Органическую фазу сушат и концентрируют, получая 4,79 г (75%) соединения xxvii.



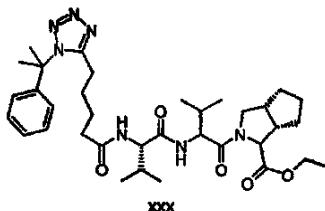
Пример полупродукта 29. Соединение xxix.

Дипептид H-Val-Val-OH (3,22 г, 14,9 ммоль) сусpendingируют в 50 мл N,N-диметилформамида (ДМФ) и добавляют 4,75 г (12,42 ммоль) соединения xxvii с последующим добавлением 3,4 мл (18,63 ммоль) дизопропилэтамина (DIPEA). Смесь нагревают до 40°C и перемешивают в течение ночи. Растворитель упаривают в вакууме. Остаток растворяют в EtOAc и промывают 1н. HCl и насыщенным раствором соли, получая 5,52 г (91%) соединения xxix.



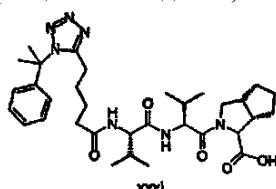
Пример полупродукта 30. Соединение xxx.

1,6 г (3,29 ммоль) соединения xxix растворяют в 20 мл DCM, добавляют 3,3 мл 1 М раствора DCC в ТГФ. К смеси добавляют 500 мг (2,73 ммоль) соединения v. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Смесь разбавляют EtOAc до 100 мл и промывают 1н. HCl, NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Очищают хроматографией на колонке (50% EtOAc/гексан), получая 1,02 г (58%) соединения xxx.



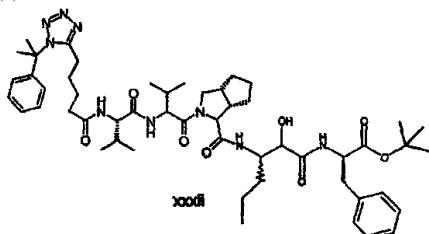
Пример полупродукта 31. Соединение xxxi.

Соединение xxx (1,02 г, 1,57 ммоль) растворяют в 10 мл MeOH и добавляют 2 мл 1н водного NaOH. Смесь перемешивают в течение ночи. Метанол удаляют упариванием и остаток растворяют в воде и нейтрализуют 2 мл HCl. Последующая экстракция EtOAc дает 1,00 г (~100%) соединения xxxi.



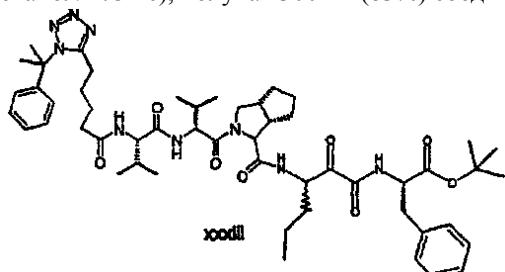
Пример полупродукта 32. Соединение xxxii.

Соединение xxxi (300 мг, 0,48 ммоль) и РуВор (300 мг, 0,58 ммоль) растворяют в 10 мл DCM. К раствору добавляют соединение x (201 мг, 0,58 ммоль) и затем добавляют DIPEA (104 мкл). Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют затем EtOAc до 100 мл и промывают дважды 1н. HCl, дважды NaHCO₃ и трижды насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат и концентрируют. Остаток очищают хроматографией на колонке (100% EtOAc), получая 450 мг (98%) соединения xxxii.



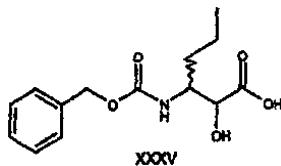
Пример полупродукта 33. Соединение xxxiii.

Соединение xxxii 360 мг (0,38 ммоль) растворяют в 8 мл DCM и добавляют 240 мг (0,57 ммоль) DMP реагента. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение трех часов. Смесь разбавляют EtOAc до 50 мл и трижды промывают насыщенным раствором соли. Продукт очищают хроматографией на колонке (25% этанол/EtOAc), получая 300 мг (83%) соединения xxxiii.

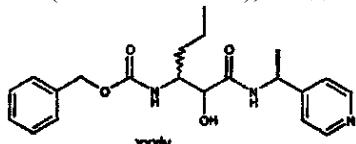


Пример полупродукта 34. Соединение xxxiv.

К DCM раствору (10 мл) xxxv



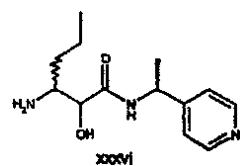
(790 мг, 2,80 ммоль) добавляют PyBOP (1,7 г, 3,36 ммоль) и Hobbit (450 мг, 3,36 ммоль). Образовавшийся раствор охлаждают до 0°C и обрабатывают DCM раствором (3 мл) (s)- α -(4-пиридинил)этиламина (410 мг, 3,36 ммоль). Затем добавляют DIPEA (0,5 мл, 3,36 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной. По прошествии указанного времени реакционную смесь разбавляют EtOAc. Весь объем промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Полученный таким образом органический слой сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc), что дает 630 мг (58%) соединения xxxiv.



Примечание: (s)- α -(4-пиридинил)этиламин получают из его соли, D-тартрата, путем промывки основанием (1н NaOH) и последующей экстракцией EtOAc. Степень выделения составляет 89%.

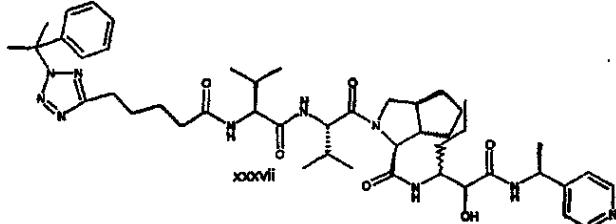
Пример полупродукта 35. Соединение xxxvi.

К метанольному раствору (15 мл) соединения xxxiv (630 мг, 1,64 ммоль) добавляют в атмосфере N₂ Pd/C (150 мг, 10% содержание палладия). Реакционную смесь перемешивают в атмосфере H₂ в течение ночи. Реакционную смесь фильтруют через слой Celite® 521. Фильтраты концентрируют в вакууме, получая 420 мг (~100%) соединения xxxvi.



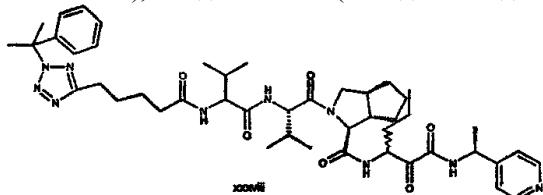
Пример полупродукта 36. Соединение xxxvii.

К DCM раствору (3 мл) соединения xxxi (270 мг, 0,43 ммоль) добавляют PyBOP (270 мг, 0,52 ммоль). Затем добавляют соединение xxxvi (160 мг, 0,64 ммоль) и DIPEA (0,09 мл, 0,52 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. По прошествии указанного времени реакционную смесь разбавляют EtOAc и промывают 0,1н. HCl, затем насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Полученный органический слой сушат и концентрируют, получая соединение xxxvii (430 мг общей массой) для следующей стадии.



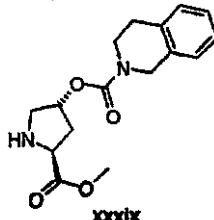
Пример полупродукта 37. Соединение xxxviii.

К DCM раствору (3 мл) соединения xxxvii (370 мг, 0,43 ммоль) добавляют DMP реагент (280 мг, 0,65 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч и затем гасят 10% Na₂SO₃. После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Полученный органический слой сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc), что дает 180 мг (49% для 2 стадий) соединения xxxviii.

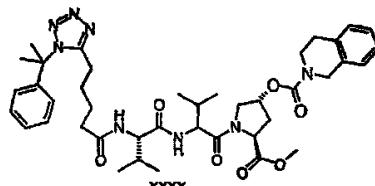


Пример полупродукта 38. Соединение xxxviii.

Соединение xxix (2,5 г, 5 ммоль) растворяют в 40 мл DCM, к раствору добавляют 5,1 мл 1 М раствора DCC в ТГФ. К полученной смеси добавляют 1,08 г (3,53 ммоль) соединения xxxix. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи.

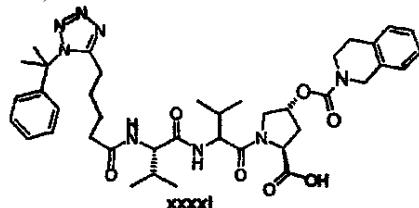


Смесь разбавляют EtOAc до 100 мл, промывают последовательно 1н. HCl, NaHCO₃ и насыщенным раствором соли и затем очищают хроматографией на колонке (80% EtOAc/гексан), получая 2,59 г (95%) соединения xxxx.



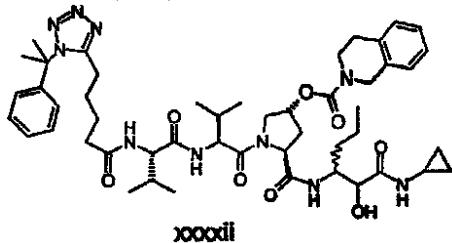
Пример полупродукта 39. Соединение xxxx.

Соединение xxxx (2,59 г, 3,35 ммоль) растворяют в 20 мл MeOH и добавляют 4 мл 1н. водного NaOH. Смесь перемешивают в течение ночи и затем упаривают на роторном испарителе до получения остатка. Остаток растворяют в воде и нейтрализуют 2 мл HCl. Нейтрализованный раствор затем экстрагируют EtOAc, получая 2,49 г (~100%) соединения xxxx*i*.



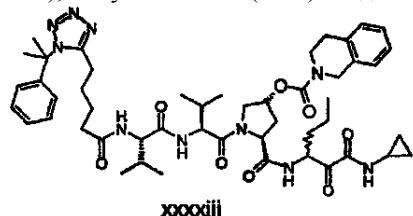
Пример полупродукта 40. Соединение xxxx*ii*.

Соединение xxxx*i* (847 мг, 1,16 ммоль) и 724 мг (1,39 ммоль) PyBOP растворяют в 10 мл DCM. К раствору добавляют соединение xiii (260 мг, 1,39 ммоль) с последующим добавлением DIPEA (209 мкл). Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют затем EtOAc до 100 мл и промывают дважды 1н. HCl, дважды NaHCO₃ и трижды насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат и концентрируют. Остаток очищают хроматографией на колонке (5% этанол/EtOAc), получая 930 мг (86%) соединения xxxx*ii*.



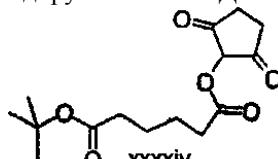
Пример полупродукта 41. Соединение xxxx*iii*.

Соединение xxxii (350 мг, 0,38 ммоль) растворяют в 10 мл DCM и добавляют 242 мг (0,57 ммоль) DMP реагента. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение трех часов. Смесь разбавляют EtOAc до 50 мл и промывают трижды насыщенным раствором соли. Продукт очищают хроматографией на колонке (100% EtOAc), получая 180 мг (51%) соединения xxxiii.

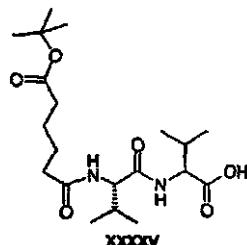


Пример полупродукта 42. Соединение xxxv.

H-Val-Val-OH (5 г, 23 ммоль) суспензируют в 100 мл ДМФ, добавляют соединение xxxiv

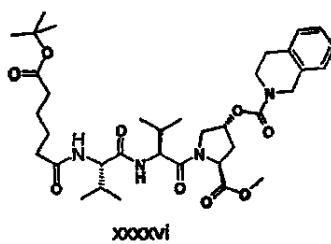


(8,3 г, 27,6 ммоль) и затем добавляют 6,2 мл (35,5 ммоль) DIPEA. Смесь перемешивают при 40° С в течение двух дней. Растворитель удаляют при глубоком вакууме, остаток растворяют в 100 мл EtOAc и промывают трижды 1н. HCl и дважды насыщенным раствором соли. Получают 9,14 г (99%) соединения xxxv.



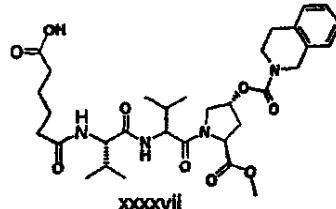
Пример полупродукта 43. Соединение xxxvi.

Соединение xxxv (2,8 г, 7 ммоль) и 954 мг (7 ммоль) HOAt растворяют в 100 мл DCM. Добавляют 7 мл 1 М DCC/DCM. К реакционной смеси добавляют соединение xxxix (2,15 г) и реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Смесь концентрируют досуха и остаток растворяют в EtOAc и очищают хроматографией на колонке (100% EtOAc), получая 4,57 г (95%) соединения xxxvi.



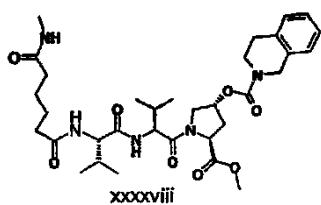
Пример полупродукта 44. Соединение xxxvii.

Соединение xxxvi (4,57 г, 6,65 ммоль) растворяют в 10 мл TFA и 10 мл DCM. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 4 ч. Растворитель удаляют в вакууме и остаток растворяют в 50:50 смеси ацетонитрил/вода и лиофилизируют, получая соединение xxxvii в виде порошка.



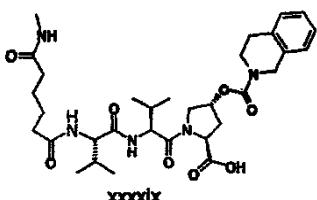
Пример полупродукта 45. Соединение xxxviii.

Соединение xxxvii (1 г, 1,59 ммоль) и 990 мг (2,28 ммоль) PyBor растворяют в 20 мл DCM и добавляют 1,6 мл 1 М метиламина в ТГФ. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляют до 100 мл EtOAc и промывают 1н. HCl, NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Остаток очищают фланш хроматографией на колонке (10% EtOH/EtOAc), получая 1 г (98%) соединения xxxviii.



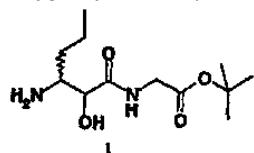
Пример полу продукта 46. Соединение xxxix.

Соединение xxxvii (1 г, 1,55 ммоль) растворяют в 10 мл MeOH и добавляют 2 мл 1н. NaOH. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Растворитель удаляют упариванием. Остаток растворяют в воде, нейтрализуют и экстрагируют EtOAc, получая 960 мг (98%) соединения xxxix.

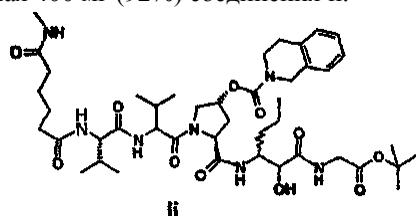


Пример полу продукта 47. Соединение li.

Соединение xxxix (315 мг, 0,5 ммоль) и 312 мг (0,6 ммоль) PyBOP растворяют в 10 мл DCM. Добавляют соединение 1 (56 мг, 0,6 ммоль) и 108 мкл DIPEA.

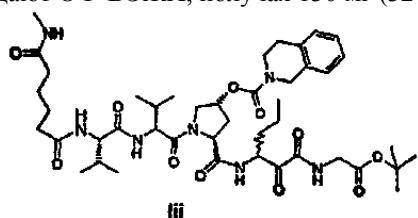


Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи и разбавляют до 100 мл EtOAc и промывают 1н. HCl, NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Очищают хроматографией на колонке (15% EtOH/EtOAc), получая 400 мг (92%) соединения li.



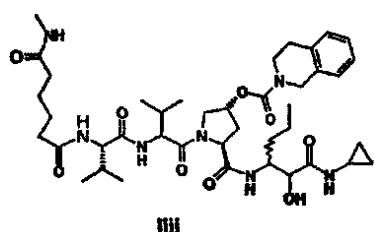
Пример полу продукта 48. Соединение lii.

Соединение li (400 мг, 0,46 ммоль) растворяют в 10 мл DCM и добавляют 292 мг (0,69 ммоль) DMP реагента. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 3 ч. Растворитель удаляют упариванием и продукт очищают ОФ-ВЭЖХ, получая 130 мг (32%) соединения lii.



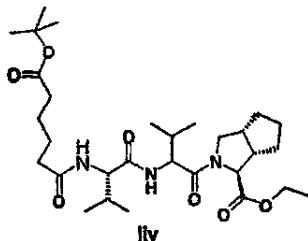
Пример полу продукта 49. Соединение liii.

Соединение xxxix (210 мг, 0,33 ммоль) и 208 мг (0,4 ммоль) PyBOP растворяют в 10 мл DCM. К раствору добавляют соединение xi (154 мг, 0,83 ммоль) с последующим добавлением DIPEA (72 мкл, 0,4 ммоль). Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют до 100 мл с помощью EtOAc, промывают 1н. HCl, NaHCO₃ и насыщенным раствором соли и затем очищают фланш хроматографией на колонке (10% EtOH/EtOAc), получая 250 мг (95%) соединения liii.



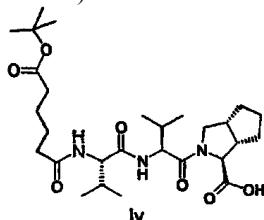
Пример полу продукта 50. Соединение liv.

Соединение xxxv (755 мг, 1,88 ммоль) и 255 мг (1,88 ммоль) HOAt растворяют в 20 мл DCM. Добавляют 1,88 мл 1 М DCC/DCM. К реакционной смеси добавляют соединение v (288 мг) и реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 2 ч. Смесь концентрируют досуха, остаток растворяют в EtOAc и очищают хроматографией на колонке (80% EtOAc/гексан), получая 800 мг (90%) соединения liv.



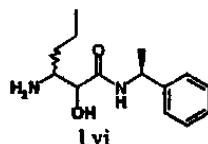
Пример полу продукта 51. Соединение lv.

Соединение liv (800 мг, 1,41 ммоль) растворяют в 10 мл MeOH и добавляют 2 мл NaOH. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Растворитель удаляют в вакууме, остаток растворяют в воде и нейтрализуют 2 мл 1н. HCl. Продукт экстрагируют EtOAc. Упаривание экстракционного растворителя дает 760 мг (~100%) lv.

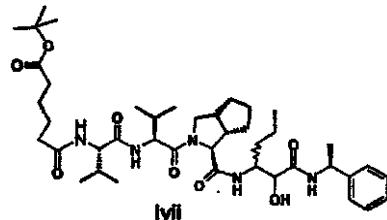


Пример полу продукта 52. Соединение lvii.

Соединение lv (760 мг, 1,41 ммоль) и 880 мг (1,69 ммоль) PyBor растворяют в 5 мл DCM. К раствору добавляют соединение lvi

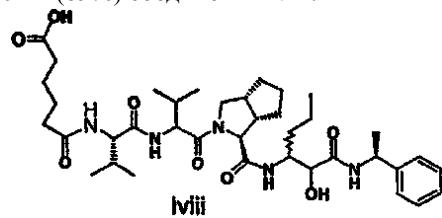


(530 мг, 2,12 ммоль) и затем добавляют 0,31 мг DIPEA. Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют до 100 мл EtOAc, промывают 1н. HCl, NaHCO₃ и насыщенным раствором соли, и затем очищают фланш хроматографией на колонке (100% EtOAc), получая 870 мг (80%) соединения lvii.



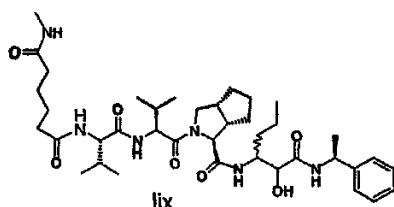
Пример полу продукта 53. Соединение lviii.

Соединение lvii (350 мг, 0,45 ммоль) растворяют в 5 мл TFA и 5 мл DCM и смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 3 ч. Растворитель удаляют упариванием и продукт очищают ОФ-ВЭЖХ, получая 220 мг (69%) соединения lviii.



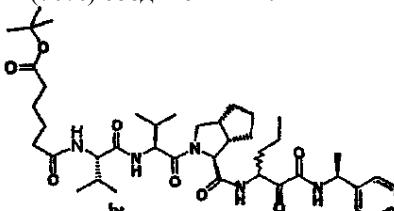
Пример полу продукта 54. Соединение lix.

Соединение lviii (200 мг, 0,28 ммоль) и 218 мг (0,42 ммоль) PyBor растворяют в 5 мл DCM.Добавляют метиламин (0,28 мл 2 М раствора в ТГФ). Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Смесь разбавляют до 100 мл EtOAc, промывают 1н. HCl, NaHCO₃ и насыщенным раствором соли и затем очищают хроматографией на колонке (15% EtOH/EtOAc), получая 168 мг (79%) lix.



Пример полу продукта 55. Соединение Ix.

Соединение Iviii (200 мг, 0,26 ммоль) растворяют в 4 мл DCM и добавляют 165 мг (0,39 ммоль) DMP реагента (реагент). Смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 3 ч. Растворитель удаляют упариванием. Остаток растворяют в смеси 50% ацетонитрил/вода, фильтруют и очищают ОФ-ВЭЖХ, получая 140 мг (70%) соединения 1x.

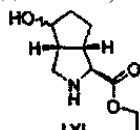


Пример полу продукта 56. Соединение ii.

DCM (30 мл) и раствор соединения i (4 г, 12,1 ммоль) в EtOH (30 мл), в атмосфере N₂, охлаждают до -10° С. Добавляют NaBH₄ (458 мг, 12,1 ммоль) и раствор перемешивают при -10° С в течение 50 мин. Полная конверсия подтверждается появлением на ТСХ (50% EtOAc/гексан) более медленно движущегося пятна. Реакционную смесь осторожно гасят льдом и затем охлажденным насыщенным раствором NH₄Cl (10 мл). Смесь выливают в DCM (300 мл). Органический слой однократно промывают насыщенным раствором NH₄Cl (60 мл) и дважды насыщенным раствором соли (60 мл). Затем органический слой отделяют, сушат над MgSO₄ и концентрируют в вакууме, получая 3,5 г соединения ii (87%).

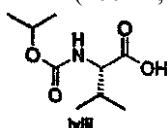
Пример полу продукта 57. Соединение lxi.

В круглодонной колбе на 250 мл, снабженной H₂ баллоном, этанольный раствор (50 мл) соединения ii (3,5 г, 10,5 ммоль) гидрируют в стандартных условиях [20% Pd(OH)₂/C (1,47 г, 2,1 ммоль)] в течение 5 ч при температуре, близкой к комнатной. Катализатор отфильтровывают через целик и промывают DCM. Растворитель удаляют затем при пониженном давлении, получая 2 г (96%) соединения lxi.

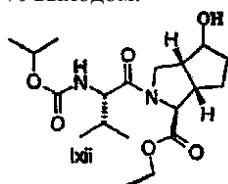


Пример полу продукта 58. Соединение lxii.

В инертной атмосфере раствор соединения lxi (200 мг, 1 ммоль), соединения lxiii.



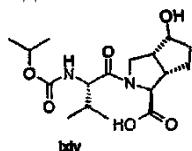
(233 мг, 1,1 ммоль), HOAt (1-гидрокси-7-азабензотриазола) (156 мг, 1,15 ммоль) в безводном ДМФ (6 мл) перемешивают в течение 20 мин. Затем температуру снижают до 0°C с последующим добавлением DIC (0,18 мл, 1,15 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной. Раствор разбавляют EtOAc и затем промывают дважды 1н. HCl, дважды насыщенным водным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над MgSO₄ и растворитель удаляют при пониженном давлении. Остаток очищают хроматографией (силикагель: 70% EtOAc/DCM), получая соединение lxii с 45% выходом.



Пример полу продукта 59. Соединение lxiv.

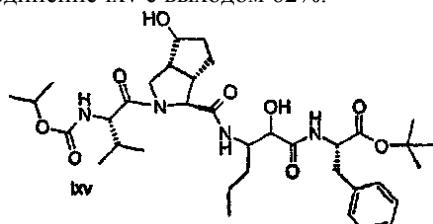
Раствор соединения lxii (777 мг, 2 ммоль) в диоксане (6 мл) и 0,5 М NaOH (6 мл) перемешивают 5 ч при температуре, близкой к комнатной. Анализ ТСХ (100% EtOAc) показывает полноту конверсии до вещества, дающего остающееся на старте пятно. Реакционную смесь охлаждают на ледяной бане с последующим добавлением 1н. HCl (4 мл). Затем добавляют твердый NaCl и всю смесь дважды экстрагируют EtOAc (2×150 мл). Затем органические экстракты объединяют, сушат над MgSO₄ и растворитель

удаляют при пониженном давлении, получая соединение lxiv с выходом 92%.



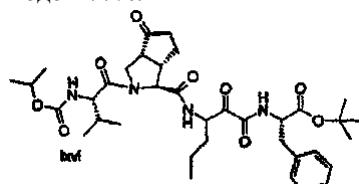
Пример полупродукта 60. Соединение lxv.

В инертной атмосфере раствор соединения x (203 мг, 0,58 ммоль), соединения lxiv (276 мг, 0,775 ммоль), HOAt (1-гидрокси-7-азабензотриазола) (126 мг, 0,93 ммоль) в безводном ДМФ (6 мл) перемешивают в течение 20 мин. Затем температуру снижают до 0°C с последующим добавлением DIC (0,14 мл, 0,93 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной. Раствор разбавляют EtOAc и затем промывают дважды 1н. HCl, дважды насыщенным водным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над MgSO₄ и растворитель удаляют при пониженном давлении. Остаток очищают хроматографией (силикагель: 50% EtOAc/DCM - 80:19:1 EtOAc/DCM/MeOH), получая соединение lxv с выходом 62%.



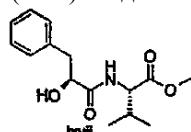
Пример полупродукта 61. Соединение lxvi.

В инертной атмосфере к раствору соединения lxv (287 мг, 0,42 ммоль) в безводном DCM (15 мл) добавляют DMP реагент (605 мг, 1,43 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при температуре, близкой к комнатной. (Примечание: удвоенные количества DMP реагента и реакционное время являются гарантией того, что обе спиртовые группы полностью окисляются до соответствующих кетогрупп). Анализ ТХ (силикагель: 2% MeOH/EtOAc) свидетельствует о полном превращении в более неподвижный продукт. Реакционную смесь разбавляют DCM (150 мл) и затем промывают дважды 10% водным раствором сульфита натрия (2×50 мл), дважды насыщенным водным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над MgSO₄ и растворитель удаляют при пониженном давлении. Остаток очищают хроматографией (силикагель: 50% EtOAc/DCM - 80:19:1 EtOAc/DCM/MeOH), получая соединение lxvi с выходом 77%.



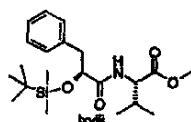
Пример полупродукта 62. Соединение lxvii.

К DCM раствору (60 мл) L-3-фенилмолочной кислоты (2 г, 12 ммоль) добавляют РуBOP (7,5 г, 14,4 ммоль). К указанному раствору добавляют DCM раствор (20 мл), содержащий HCl-метиловый эфир L-валина (2,4 г, 14,4 ммоль) и DIPEA (2,6 мл, 14,4 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной. По прошествии указанного времени, реакционную смесь разбавляют EtOAc (30 мл), промывают NaHCO₃ (30 мл) и насыщенным раствором соли (15 мл). Органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют. Очистка, осуществляющаяся в 50% EtOAc/гексан на силикагеле, дает 2,97 г (89%) соединения lxvii.



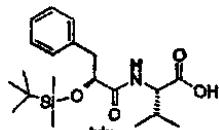
Пример полупродукта 63. Соединение lxviii.

Соединение lxvii (2,97 г, 10,6 ммоль) поглощают DCM (50 мл) и охлаждают на ледяной бане. К указанному раствору добавляют TBSCl (2,1 г, 13,8 ммоль) с последующим добавлением имидазола (0,94 г, 13,8 ммоль). Образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют затем EtOAc (50 мл), промывают NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют. Очистка, осуществляющаяся в 20% EtOAc/гексан на силикагеле, дает 3,79 г (90%) соединения lxviii.



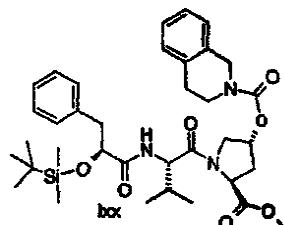
Пример полупродукта 64. Соединение Ixi.

К метанольному (50 мл) раствору соединения Ixvii (3,78 г, 9,6 ммоль) добавляют 1н. водный NaOH (14,4 мл, 14,4 ммоль). Образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи. Растворитель частично удаляют в вакууме. pH реакционной смеси снижают затем до 3, используя водный раствор 1н. HCl. Раствор разбавляют EtOAc и насыщенным раствором соли. Требуемый продукт экстрагируют EtOAc (3×50 мл). Органические слои объединяют, сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют, получая 3,5 г (96%) соединения Ixi.



Пример полупродукта 65. Соединение Ixx.

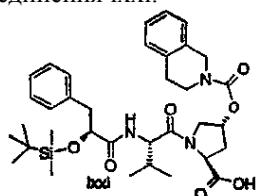
К DCM (15 мл) раствору, содержащему соединение Ixi (1,1 г, 2,9 ммоль), добавляют HOAt (0,44 г, 3,2 ммоль) с последующим добавлением 1 М раствора DCC (3,2 мл, 3,2 ммоль) в DCM. После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 20 мин, добавляют раствор соединения xxxix (970 мг, 3,2 ммоль) в DCM (15 мл). Полученную реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N_2 . Затем реакционную смесь разбавляют EtOAc (30 мл), фильтруют через рыхлый слой силикагеля, промывают 0,1н. HCl, NaHCO_3 и насыщенный раствором соли. Органический слой сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют в вакууме. Очистку осуществляют в 50% EtOAc/гексан на силикагеле, получая 1,5 г (77%) соединения Ixx.



Пример полупродукта 66. Соединение Ixxi.

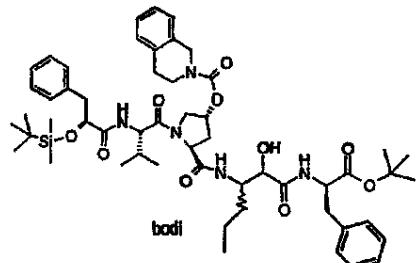
К метанольному раствору (30 мл) соединения xx (1,5 г, 2,4 ммоль) добавляют 1н. водный NaOH (3,6 мл, 3,6 ммоль). Образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи. По прошествии указанного времени растворитель частично удаляют и pH реакционной смеси доводят до 3, используя 1н. водный HCl.

Реакционную смесь затем разбавляют EtOAc (50 мл) и насыщенным раствором соли (20 мл). Водный слой экстрагируют EtOAc (3× 50 мл). Органические слои объединяют, сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют, что дает 1,3 г (92%) соединения Ixxi.



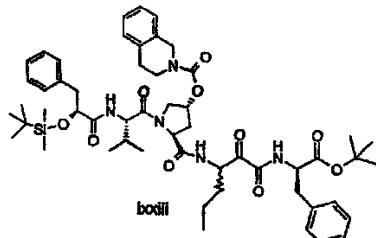
Пример полупродукта 67. Соединение Ixxii.

К раствору DCM (2 мл), содержащему соединение Ixxi (180 мг, 0,28 ммоль), добавляют PyBOP (175 мг, 0,34 ммоль) и DIPEA (0,06 мл, 0,34 ммоль), затем DCM раствор (3 мл) соединения x (150 мг, 0,41 ммоль). Образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи в атмосфере N_2 . Реакционную смесь затем разбавляют EtOAc (30 мл), промывают NaHCO_3 и насыщенным раствором соли. Органический слой сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют. Очистку осуществляют в 100% EtOAc на силикагеле, получая 270 мг (98%) соединения Ixxii.



Пример полупродукта 68. Соединение lxxiii.

К DCM (3 мл) раствору соединения lxxii (27,0 мг, 0,27 ммоль) добавляют DMP реагент (140 мг, 0,33 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 1,5 ч реакционную смесь гасят 10% Na₂SO₄ (10 мл). Реакционную смесь разбавляют EtOAc (30 мл) и перемешивают 10 мин. Органический слой промывают NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют. Очистку осуществляют в 60% EtOAc/гексан, получая 150 мг (56%) соединения lxxiii.

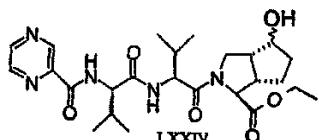


Пример полупродукта 69. Соединение lxi.

К этанольному раствору (50 мл) соединения ii (3,5 г, 10,5 ммоль) добавляют в токе азота Pd(OH)₂C (1,47 г, 20% Pd содержание, 2,1 ммоль). Реакционную смесь гидрируют при давлении 1 атм. По окончанию гидрирования катализаторы фильтруют через рыхлый слой целита и промывают дихлорметаном. Фильтраты концентрируют в вакууме, получая 2 г (96%) соединения lxi.

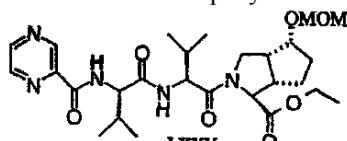
Пример полупродукта 70. Соединение lxxiv.

К ДМФ раствору (60 мл) соединения vii (9,1 г, 28,2 ммоль) добавляют HOAt (4 г, 29,4 ммоль) и 1,3-дииизопропилкарбодимид (3,7 г, 29,4 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 30 мин, к указанному выше раствору добавляют ДМФ раствор (10 мл) соединения lxi (5,1 г, 25,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. По прошествии указанного времени белые твердые вещества отфильтровывают. Фильтраты концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле, получая 9,5 г (67%) соединения lxxiv.



Пример полупродукта 71. Соединение lxxv.

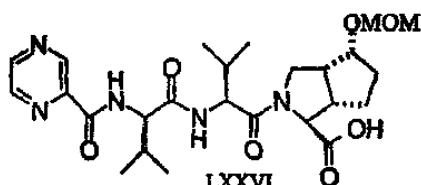
К раствору соединения lxxiv (1,5 г, 3 ммоль) в безводном ТГФ (25 мл) добавляют Et₂Pr₂N (0,78 мл, 4,5 ммоль) при температуре, близкой к комнатной. Смесь охлаждают до 0°C и добавляют по каплям MOMCl (1,5 мл, 19,7 ммоль). Реакционную смесь оставляют нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение ночи. Затем раствор разбавляют диэтиловым эфиром и промывают водой (3 раза). Водные слои дополнительно экстрагируют диэтиловым эфиром и все органические слои сушат над MgSO₄, затем концентрируют, получая желтое масло. Требуемый изомер соединения lxxv



выделяют хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексан 5/2) с 40% выходом при полном разделении диастереомеров.

Пример полупродукта 72. Соединение lxxvi.

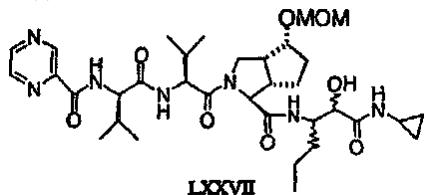
К раствору соединения lxxv (502 мг, 0,9 ммоль) в EtOH (5 мл) добавляют по каплям 2н. водный NaOH (0,9 мл, 1,8 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь оставляют нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение ночи. После завершения омыления раствор подкисляют до pH 3 с помощью Dowex 50W8X-200 кислотной смолы. Твердые вещества отфильтровывают и полученный фильтрат концентрируют в вакууме, получая маслянистый остаток, который лиофилизируют, что дает 370 мг (80 %) соединения lxxvi.



Пример полупродукта 73. Соединение lxxvii.

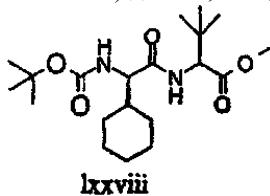
Дихлорметановый раствор (4 мл) соединения lxxvi (110 мг, 0,21 ммоль) обрабатывают PyBOP (200

мг, 0,38 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 30 мин, в реакционную смесь загружают ТГФ раствор (3,2 мл) соединения lxxii (60 мг, 0,32 ммоль) и затем Et*i*Pr₂N. После перемешивания в течение ночи при температуре, близкой к комнатной, реакционную смесь гасят водой и экстрагируют EtOAc. Полученный органический слой промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, затем концентрируют до желтого масла. Очистка хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc) дает 143 мг (100%) соединения lxxvii.



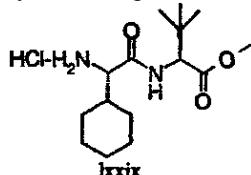
Пример полу продукта 74. Соединение lxxvii.

К ТГФ раствору (50 мл) H-Chg-OH (5 г, 19,4 ммоль) добавляют HOBr (2,63 г, 19,4 ммоль) и EDCI (3,72 г, 19,4 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 20 мин, к указанному выше раствору добавляют ТГФ (19 мл) и ДМФ (10 мл) раствор, содержащий гидрохлорид метилового эфира трет-Л-лейцина (19,4 ммоль) и DIPEA (6,75 мл, 38,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. Стандартная водная обработка и хроматография на силикагеле (15-20% EtOAc/гексаны) дают 2,27 г (30%) соединения lxxvii.



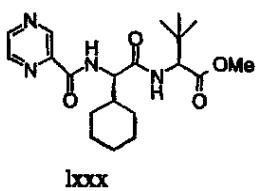
Пример полу продукта 75. Соединение lxxviii.

К ТГФ раствору (12 мл) соединения lxxvii (2,27 г, 5,91 ммоль) добавляют 4н. раствор HCl в диоксане (7,38 мл, 29,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. По прошествии указанного времени растворитель удаляют при пониженном давлении, получая соединение lxxix, которое используют непосредственно в последующей реакции.



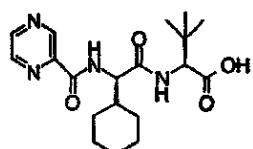
Пример полу продукта 76. Соединение lxxx.

К ТГФ раствору соединения lxxix (5,9 ммоль) добавляют ТГФ (20 мл) раствор, содержащий 2-пиразинкарбоновую кислоту (878 мг, 7,08 ммоль), HOBr (957 мг, 7,08 ммоль) и EDCI (1,36 г, 7,08 ммоль). К образовавшейся смеси затем добавляют DIPEA (2,05 мл, 11,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной, и затем гасят водой. Реакционную смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли и концентрируют в вакууме, что дает остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (40-50% EtOAc/гексаны), получая 1 г (36%) соединения lxxx.



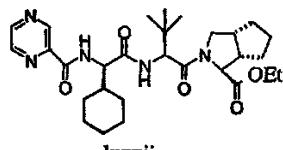
Пример полу продукта 77. Соединение lxxxi.

К метанольному раствору (20 мл) соединения lxxx (1 г, 2,56 ммоль) добавляют 2н. NaOH (3,2 мл, 6,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. По прошествии указанного времени, реакционную смесь подкисляют до pH 3, используя 5н. HCl. Реакционную смесь разбавляют EtOAc (75 мл) и промывают водой и насыщенным раствором соли. Полученный таким образом органический слой сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который растворяют в 1:1 CH₃CN/H₂O для лиофилизации. Всего получают ~1 г (100%) соединения lxxxi.

**Ixxxii**

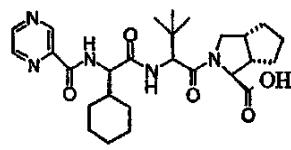
Пример полупродукта 78. Соединение Ixxxii.

Дихлорметановый раствор (10 мл) соединения Ixxxii (2,56 ммоль) обрабатывают HOAt (348 мг, 2,56 ммоль) и DCC (2,56 мл, 1М, 2,56 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь обрабатывают ТГФ раствором (5 мл) соединения v (2,56 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи, белые твердые вещества (мочевину) удаляют фильтрованием. Фильтраты концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле, что дает 1,4 г (100%) соединения Ixxxii.

**Ixxxiii**

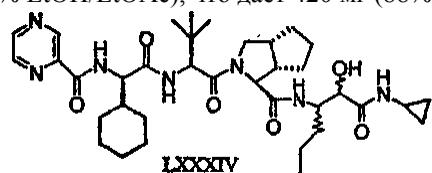
Пример полупродукта 79. Соединение Ixxxiii.

Этанольный раствор (15 мл) соединения Ixxxiii (1,4 г, 2,58 ммоль) обрабатывают 2н. NaOH (2,58 мл, 5,17 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи, реакционную смесь подкисляют до pH 3 с помощью кислотной смолы. Твердые вещества отфильтровывают. Полученные фильтраты концентрируют в вакууме, получая остаток, который лиофилизируют, получая 1,32 г (~100%) соединения Ixxxiii.

**Ixxxiv**

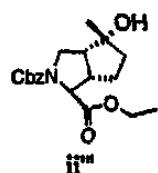
Пример полупродукта 80. Соединение Ixxxiv.

Дихлорметановый раствор (15 мл) соединения Ixxxiv (360 мг, 0,7 ммоль) обрабатывают PyBOP (582 мг, 1,12 ммоль). После перемешивания при температуре, близкой к комнатной, в течение 20 мин, реакционную смесь обрабатывают ТГФ раствором (10 мл) соединения xiii (195,6 мг, 1,05 ммоль) и затем DIPEA (0,25 мл, 1,40 ммоль). После перемешивания в течение ночи при температуре, близкой к комнатной, реакционную смесь гасят водой и экстрагируют EtOAc. Полученный органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (3% EtOH/EtOAc), что дает 420 мг (88%) соединения Ixxxiv.



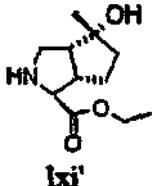
Пример полупродукта 81. Соединение ii'''.

Смесь безводного дихлорметана и диэтилового эфира (20 мл:20 мл) охлаждают до -78°C в атмосфере N₂ (г). К раствору добавляют TiCl₄ (1М в дихлорметане, 10 мл, 10 ммоль) и затем MeLi (1,4 М в диэтиловом эфире, 7,1 мл, 10 ммоль), с последующим дополнительным перемешиванием еще в течение 30 минут при -78°C. Раствор соединения i (2 г, 6 ммоль) в 10 мл дихлорметана по каплям добавляют к смеси при той же температуре, за 15 мин. Раствор медленно нагревают до -40°C в течение 10 мин и затем перемешивают при 0°C в течение 2 ч. Реакционную смесь гасят, выливая в смесь вода/диэтиловый эфир (1:1), и затем дают расслоиться. Водный слой дополнительно дважды экстрагируют диэтиловым эфиром. Все органические слои промывают водой, насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, затем концентрируют до желтого масла. Требуемое соединение ii''' выделяют хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны 2/1) с выходом 83%.



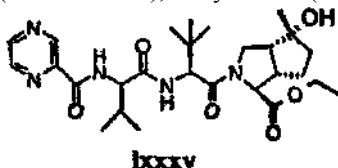
Пример полупродукта 82. Соединение lxi'.

К соединению ii''' (1,7 г, 5 ммоль) добавляют 10 мас.% Pd на C (0,53 г, 0,5 ммоль) с последующим добавлением MeOH (17 мл). Газообразный водород продувают через реакционную смесь и давление газообразного водорода поддерживают во время реакции в течение ночи при 1 атм. Реакционную смесь затем фильтруют и концентрируют, получая 92 9 мг (87%) соединения Ixi' в виде бесцветного масла.



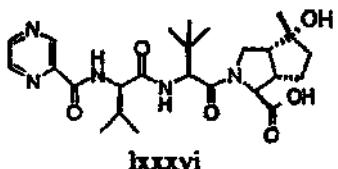
Пример полупродукта 83. Соединение Ixxxv.

К ТГФ раствору (16 мл) соединения xxii (1 г, 3 ммоль) добавляют, при температуре, близкой к комнатной, HOAt (0,41 г, 3 ммоль) и затем 1 M DCC раствор дихлорметана (3 мл, 3 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин при температуре, близкой к комнатной, к полученной HOAt-активированной кислоте добавляют дихлорметановый раствор (6 мл) соединения Ixi'. Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи. По прошествии указанного времени реакционную смесь фильтруют через целин. Фильтрат разбавляют EtOAc (120 мл), промывают водой и затем насыщенным раствором соли. Органический слой сушат и концентрируют до желтого масла, которое очищают хроматографией на силикагеле (100% EtOAc), получая 1 г (65%) соединения Ixxxv.



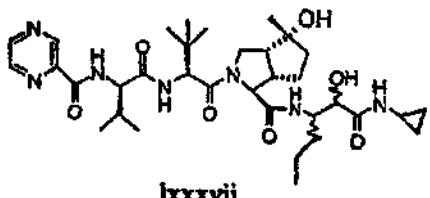
Пример полупродукта 84. Соединение Ixxxvi.

К этанольному раствору (8 мл) соединения Ixxxv (920 мг, 1,7 ммоль) добавляют 2н. водный раствор NaOH (1,7 мл, 3,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при температуре, близкой к комнатной, и затем подкисляют до pH 3 с помощью Dowes кислотной смолы. Твердые вещества отфильтровывают и фильтрат концентрируют, получая бесцветное масло, которое вновь растворяют в 1:1 CH₃CN/H₂O и лиофилизируют, что дает 800 мг (93%) соединения Ixxxvi. ВЭЖХ дает единственный пик продукта.



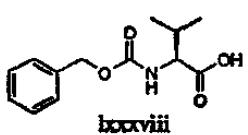
Пример полупродукта 85. Соединение Ixxxvii.

К дихлорметановому раствору (4 мл) соединения Ixxxvi (150 мг, 0,3 ммоль) добавляют PyBOP (250 мг, 0,47 ммоль). Раствор перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение 30 мин. К указанному раствору добавляют раствор соединения xiii (84 мг, 0,45 ммоль) в ТГФ (4,5 мл) с последующим добавлением Et₂Pr₂N (0,1 мл, 0,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре, близкой к комнатной, в течение ночи и затем гасят водой (25 мл) за 30 мин. Смесь затем экстрагируют EtOAc. Полученный органический слой промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, затем концентрируют до желтого масла. Очистка хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc) дает 200 мг (100%) соединения Ixxxvii.



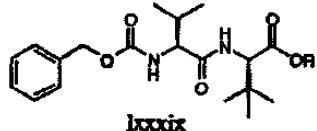
Пример полупродукта 86. Соединение Ixxxix.

Соединение Ixxxviii.



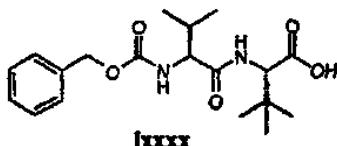
N-Cbz-L-валин, (2,5 г, 9,9 ммоль) поглощают ТГФ (30 мл) EDCI (2,29 г, 11,9 ммоль) и НОВТ (1,62 г, 11,9 ммоль) смешивают и смесь перемешивают пять минут.Добавляют гидрохлорид метилового эфира

L-трет-лейцина (2,17 г, 11,9 ммоль) в ТГФ (23,9 мл) с последующим добавлением DIPEA (2,1 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере азота. Реакционную смесь разбавляют этилацетатом, промывают 1н. HCl, насыщенным бикарбонатом натрия и насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют. Концентрированный остаток очищают в смеси 25% этилацетат/гексан, получая 1,1 г (29%) соединения Ixxxx.



Пример полу продукта 87. Соединение Ixxxx.

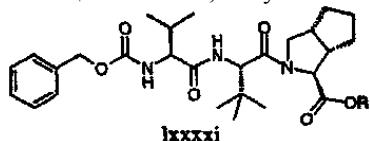
Соединение Ixxxx гидролизуют в стандартных условиях, используя метиловый спирт (0,3 М) и 1н. NaOH (1,5 экв.), получая 1,03 г (95%) соединения Ixxxx.



Пример полу продукта 88. Соединение Ixxxxi.

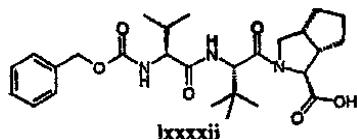
Соединение Ixxxx (385 мг, 1,06 ммоль) поглощают дихлорметаном (3 мл). Добавляют DCC (1,4 ммоль) с последующим добавлением HOAt (190 мг, 1,4 ммоль). Затем добавляют соединение v (260 мг, 1,4 ммоль) в дихлорметане (3 мл). Полученную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере азота. Реакционную смесь разбавляют этилацетатом, фильтруют через силикагель и концентрируют.

Остаток очищают в смеси 50% этилацетат/гексан, получая 440 мг (80%) соединения Ixxxxi.



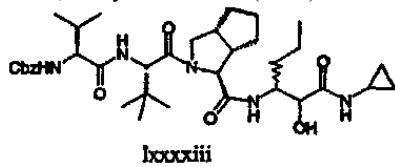
Пример полу продукта 89. Соединение Ixxxxii.

Соединение Ixxxxi гидролизуют в стандартных условиях, используя этиловый спирт (0,3 М) и 1н. NaOH (1,5 экв.), получая 390 мг соединения Ixxxxii.



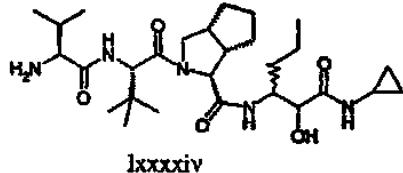
Пример полу продукта 90. Соединение Ixxxxiii.

Соединение Ixxxxii (350 мг, 0,7 ммоль) поглощают дихлорметаном (3 мл). Добавляют PyBOP (480 мг, 0,91 ммоль) с последующим добавлением соединения xi (170 мг, 0,91 ммоль). Добавляют DIPEA (0,16 мл, 0,91 ммоль) и реакционную смесь перемешивают в течение ночи. Реакционную смесь концентрируют и очищают в 100% этилацетате, получая 420 мг (90%) соединения Ixxxxiii.



Пример полу продукта 91. Соединение Ixxxxiv.

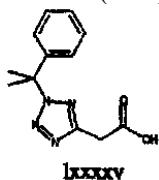
Соединение Ixxxxiii гидрируют, используя 10% Pd/C (1% моль) в метиловом спирте в атмосфере водорода, получая 335 мг (100%) соединения Ixxxxiv.



Пример полу продукта 92. Соединение Ixxxxv.

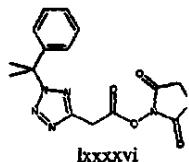
Этил 1Н-тетразол-5-ацетат (5 г, 32 ммоль) поглощают хлороформом (80 мл). Добавляют трихлоруксусную кислоту (12,03 г, 73,65 ммоль) с последующим добавлением альфа-метилстирола (3,78 г, 32 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи. На следующий день раствор разбавляют этилацетатом, промывают 10% KOH и насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют, получая 8 г (96%) соответствующего N-защищенного этил тетразол-5-ацетата. Полученное вещество гидролизуют в стандартных условиях, используя этило-

вый спирт (0,3 М) и 1н. NaOH (3 экв.), и получают 7 г (99%) соединения Ixxxxv.



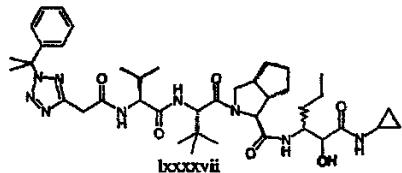
Пример полу продукта 93. Соединение Ixxxxvi.

Соединение Ixxxxv (3,62 г, 14,7 ммоль) поглощают дихлорметаном (50 мл). Добавляют EDCI (4,32 г, 22,1 ммоль) и DIPEA (5,1 мл, 29,4 ммоль) и перемешивают в течение 5 мин. Добавляют N-гидроксисукцинимид (3,38 г, 29,4 ммоль) и перемешивают 3 ч. Реакционную смесь разбавляют дихлорметаном и промывают трижды водой. Органическую фазу сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют получая 3,66 г (73%) соединения Ixxxxvi.



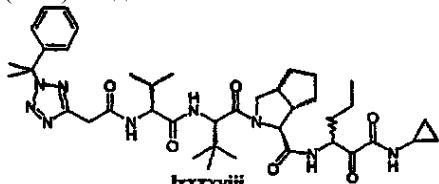
Пример полу продукта 94. Соединение Ixxxxvii.

Соединение Ixxxxiv (335 мг, 0,62 ммоль) и соединение Ixxxxvi (343 мг, 1 ммоль) поглощают дихлорметаном (6 мл). Добавляют DIPEA (0,17 мл, 1 ммоль) и реакционную смесь перемешивают в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют этилацетатом, промывают насыщенным бикарбонатом натрия, насыщенным раствором соли и концентрируют. Остаток очищают в смеси 5% этиловый спирт/етилацетат, получая 80 мг (16%) соединения Ixxxxvii.



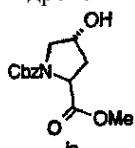
Пример полу продукта 95. Соединение Ixxxxviii.

Соединение Ixxxxvii (80 мг, 0,11 ммоль) поглощают дихлорметаном (3 мл). Добавляют DMP реагент (55 мг, 0,13 ммоль) и перемешивают один час. Реакционную смесь разбавляют этилацетатом и гасят 10% раствором сульфита натрия. Органическую фазу промывают насыщенным бикарбонатом натрия и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют и полученный остаток очищают в 100% этилацетате, получая 40 мг (48%) соединения Ixxxxviii.

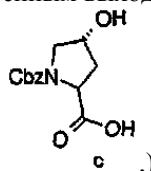


Пример полу продукта 96. Соединение xxxix.

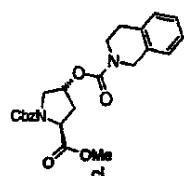
Соединение iс, метиловый эфир N-Cbz-4-гидрокси-Pro,



(2,1 г, 7,9 ммоль), полученное с количественным выходом из соединения с, N-Cbz-4-гидрокси-Pro



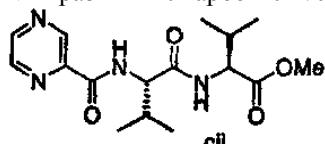
растворяют в DCM (25мл). К раствору добавляют CDI (1,54 г, 9,5 ммоль) и DIPEA (1,7 мл, 9,5 ммоль) и перемешивают в течение 10 мин. К реакционной смеси добавляют по каплям 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (TIQ) (1,2 мл, 9,5 ммоль) и перемешивают 5 ч. Органическую фазу промывают водой, 1н. HCl и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы полученный остаток очишают хроматографией, используя 40% EtOAc/гексаны, получают соединение сi, метиловый эфир N-Cbz-4-TIQкарбонилокси-Pro, (2,5 г, 75%).



Соединение ci (2,5 г, 5,9 ммоль) растворяют в MeOH (75 мл). Раствор продувают N₂ и добавляют Pd/C (10%, 300 мг). Реакционную смесь продувают H₂ и перемешивают в течение ночи. Реакционную смесь фильтруют через целит и концентрируют, получая соединение xxxix, метиловый эфир 4-(TIQ-карбонилокси)-Pro, (1,49 г, 83%).

Пример полу продукта 97. Соединение vii.

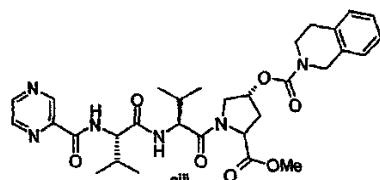
Соединение ci, метиловый эфир N-пиразин-2-илкарбонил-Val-Val, (10,9 г, 32,4 ммоль)



растворяют в ТГФ (80 мл) и затем добавляют водный NaOH (48,6 мл, 48,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают 48 ч и затем добавляют дополнительное количество NaOH (16,3 мл, 16,3 ммоль) и смесь нагревают до 40°C в течение трех часов. Затем pH реакционной смеси снижают до 3 и водную фазу экстрагируют EtOAc и затем концентрируют, получая неочищенное соединение vii, N-пиразин-2-илкарбонил-Val-Val кислоту (10,6 г, 100%).

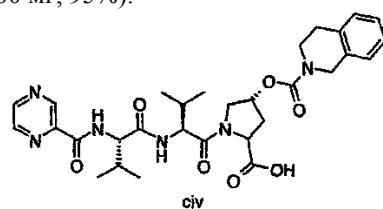
Пример полу продукта 98. Соединение ciii.

Соединение ci (4,1 г, 12,7 ммоль) растворяют в DCM (20 мл). К указанному раствору добавляют HOAt (1,73 г, 12,7 ммоль) и DCC (12,7 ммоль) и раствор перемешивают в течение одного часа. К реакционной смеси добавляют соединение xxxix (3,22 г, 10,6 ммоль) в DCM (10 мл). Полученную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь фильтруют через силикагель и концентрируют. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент 50%-80% смеси EtOAc/гексаны), получая соединение ci, метиловый эфир N-пиразин-2-илкарбонил-Val-Val-4-(TIQ карбонилокси)-Pro, (5,27 г, 81,7%).



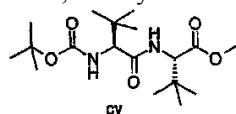
Пример полу продукта 99. Соединение civ.

Соединение ci (650 мг, 1,29 ммоль) растворяют в ТГФ (5 мл). К раствору добавляют водный NaOH (1,42 мл, 1,42 ммоль) и затем перемешивают в течение ночи. Снижают pH раствора до 3 и органическую фазу выделяют и концентрируют, получая остаток. Остаток очищают, используя ВЭЖХ с обращенной фазой в смеси ацетонитрил/вода, и получают соединение civ, N-пиразин-2-илкарбонил-Val-Val-4-(TIQкарбонилокси)-Pro кислоту, (600 мг, 95%).



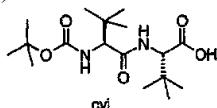
Пример полу продукта 100. Соединение cv.

N-Boc-L-трет-лейцин (2,3 г, 10 ммоль) и гидрохлорид метилового эфира L-трет-лейцина (2 г, 11 ммоль) объединяют в ДМФ (30 мл). Затем к раствору добавляют HOAt (1,6 г, 11,5 ммоль). Полученную смесь перемешивают в течение 20 мин в атмосфере N₂ и затем температуру снижают до 0°C, затем добавляют DIC (1,8 мл, 11,5 ммоль) и 2,4,6-коллидин (1,45 мл, 11 ммоль). Образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи, позволяя нагреться до комнатной температуры. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают 1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы полученный остаток очищают хроматографией, используя градиент 20-30% смеси EtOAc/гексаны, и получают соединение cv (3,3 г, 92%).



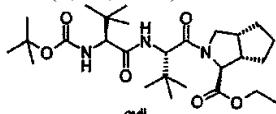
Пример полупродукта 101. Соединение cvi.

Соединение cv (3,3 г, 9,2 ммоль) гидролизуют, используя диоксан (40 мл) и 0,5н NaOH (37 мл, 18,4 ммоль), получая соединение cvi (2,9 г, 92%).



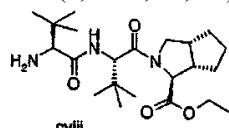
Пример полупродукта 102. Соединение cvii.

Соединение cvi (2 г, 5,8 ммоль) и соединение v (1 г, 5,5 ммоль) растворяют в ДМФ (20 мл). Затем к раствору добавляют HOAt (832 мг, 6,6 ммоль) и DIC (1,1 мл, 6,6 ммоль). Образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают 1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы полученный остаток очищают хроматографией, используя градиент 20-30% смеси EtOAc/гексаны, и получают соединение cvii (2,4 г, 81%).



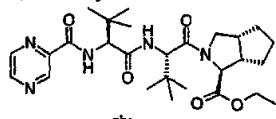
Пример полупродукта 103. Соединение cviii.

Соединение cvii (2,4 г, 4,72 ммоль) растворяют в DCM (10 мл). К раствору добавляют TFA (10 мл). Образовавшийся раствор перемешивают в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрируют, растворяют в EtOAc и затем органическую фазу промывают 1н. NaOH и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют, получая соединение cviii (1,084 г, 56,1%).



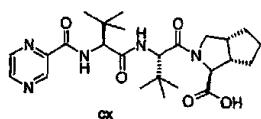
Пример полупродукта 104. Соединение cix.

2-Пиразинкарбоновую кислоту (181 мг, 1,46 ммоль) и соединение cviii (541 мг, 1,325 ммоль) растворяют в ДМФ (15 мл). К раствору добавляют HOAt (207 мг, 1,52 ммоль) и DIC (0,24 мл, 1,52 ммоль). Образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают 1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы полученный остаток очищают хроматографией, используя градиент 20-30-35% смеси EtOAc/гексаны, и получают соединение cix (430 мг, 63%).



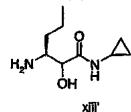
Пример полупродукта 105. Соединение cx.

Соединение cix гидролизуют, используя EtOH (7 мл) и 1н. NaOH (4,7 мл, 4,7 ммоль), и получают соединение cx (700 мг, 91,6%).

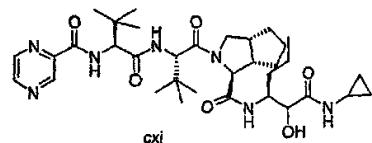


Пример полупродукта 106. Соединение cxii.

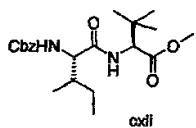
Соединение cx (690 мг, 1,42 ммоль) растворяют в DCM (9 мл). Затем к раствору добавляют PyBOP (890 мг, 1,7 ммоль) с последующим добавлением соединения xiii'



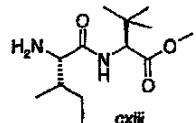
(320 мг, 1,7 ммоль). К полученной смеси добавляют DIPEA (0,3 мл, 1,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют затем EtOAc, промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы полученный остаток очищают хроматографией, используя 100% EtOAc, и получают соединение cxii (490 мг, 52,7%).



Пример полу продукта 107. Соединение cxiv.
Соединение cxii (1,2 г, 3,06 ммоль)

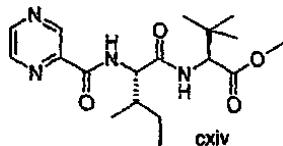


растворяют в MeOH (12 мл). После тщательного продувания N₂ добавляют 10 мас.% Pd(OH)₂ на углероде (0,6 г) и смесь гидрируют в течение ночи, затем полученную реакционную смесь анализируют TCX (30% EtOAc/гексаны). Раствор отделяют от твердого вещества фильтрованием и концентрируют до соответствующего соединения cxiii со снятой защитой, в виде бесцветного масла (100%),



которое используют на следующей стадии без дополнительной очистки.

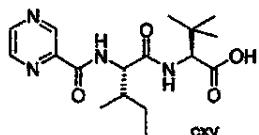
2-Пиразинкарбоновую кислоту (400 мг, 3,2 ммоль, 1,1 экв.) растворяют в DCM/ТТФ (4 мл/4 мл) и затем добавляют HOAt (440 мг, 3,2 ммоль) и DCC (343 мл, 1М в DCM). После перемешивания при комнатной температуре в течение 20 мин соединение cxiii (0,96 г, 3,2 ммоль), полученное ранее, растворяют в DCM (6,4 мл) и добавляют к активированной смеси. После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре реакционную смесь фильтруют через целин и соединение cxiv очищают хроматографией на колонке (30% EtOAc/гексаны)



получая белое твердое вещество (0,8 г, 80%).

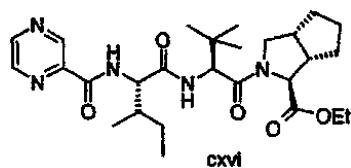
Пример полу продукта 108. Соединение cxv.

Соединение cxiv (0,8 г, 2,2 ммоль) растворяют в MeOH (10 мл) и затем добавляют 2н. NaOH (водн.) (3,3 мл, 6,6 ммоль). Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, затем состав реакционной смеси анализируют TCX (50% EtOAc/гексаны). Подкисливают до pH 3 с помощью 5н. HCl и разбавляют EtOAc с последующей экстракцией органической фазы. Экстрагированную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, получая концентрированием соединение cxv (0,74 г, 95%).



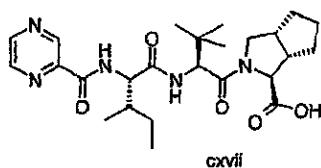
Пример полу продукта 109. Соединение cxvi.

К DCM раствору (6 мл) соединения cxv (0,74 г, 2,1 ммоль) при комнатной температуре добавляют HOAt (290 мг, 2,1 ммоль), с последующим добавлением 1 М раствора DCC в DCM (2,2 мл, 2,2 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре к полученной выше HOAt-активированной кислоте добавляют ТГФ раствор (10,5 мл, 0,2 М) соединения v (2,1 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. По прошествии указанного времени реакционную смесь фильтруют через целин. Фильтрат разбавляют EtOAc (120 мл) и промывают водой и насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат и концентрируют до желтого масла, которое очищают хроматографией на силикагеле (50% EtOAc/гексаны), получая соединение cxvi (0,714 г, 66%).



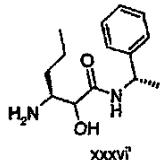
Пример полу продукта 110. Соединение cxvii.

К EtOH раствору соединения cxvi (0,7 г, 1,4 ммоль) добавляют 2н. водный раствор NaOH (2 мл, 4 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре, затем подкисливают до pH 3 с помощью 5н. HCl и разбавляют EtOAc, с последующей экстракцией органической фазы. Экстрагированную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, получая концентрированием соединение cxvii (95%).



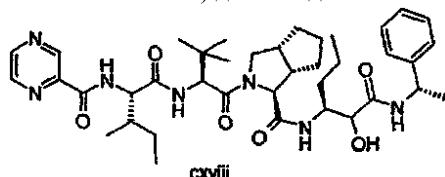
Пример полу продукта 111. Соединение cxvii.

К DCM/TГФ раствору (10 мл/2 мл) соединения cvii (300 мг, 0,6 ммоль) добавляют РуBOP (416 мг, 0,8 ммоль). Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин. К указанному раствору затем добавляют соединение xxxvi' (200 мг, 0,8 ммоль),



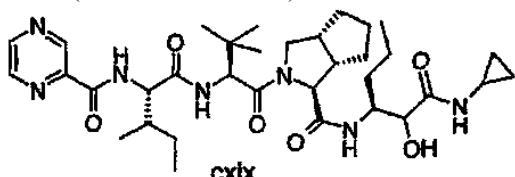
с последующим добавлением DIPEA (0,22 мл, 1,2 ммоль).

Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем гасят водой (25 мл) в течение 30 мин. Затем смесь экстрагируют EtOAc. Полученную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, затем концентрируют, получая желтое масло. Очистка хроматографией на силикагеле (3-5% EtOH/EtOAc) дает соединение cxvii (335 мг, 76%).



Пример полу продукта 112. Соединение cxix.

К DCM раствору (10 мл) соединения cxvii (340 мг, 0,6 ммоль) добавляют РуBOP (470 мг, 0,9 ммоль). Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин. К указанному раствору добавляют затем соединение xii' (170 мг, 0,9 ммоль), с последующим добавлением DIPEA (0,24 мл, 1,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем гасят водой (25 мл) в течение 30 мин. Смесь затем экстрагируют EtOAc. Полученную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, затем концентрируют до желтого масла. Очистка хроматографией на силикагеле (3-5% EtOH/EtOAc) дает соединение cxix (164 мг, 36%).

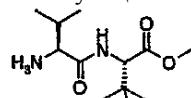


Пример полу продукта 113. Соединение xx.

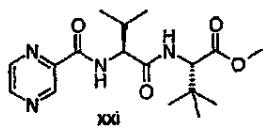
N-Cbz-L-валин (6,28 г, 25 ммоль) растворяют в DCM (30 мл). К указанному раствору добавляют НОВТ (3,38 г, 25 ммоль) и DCC (25 мл, 1 М раствор) и перемешивают 5 мин. К полученной смеси добавляют гидрохлорид метилового эфира L-трет-лейцина (25 мл, 1 М раствор) и перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc, промывают 1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют. Остаток очищают хроматографией, используя 20-30% EtOAc/гексаны, и получают соединение xx (2,96 г, 31%).

Пример полу продукта 114. Соединение xxii.

Соединение xx (2,95 г, 7,8 ммоль) гидрируют, используя 10% Pd/C (800 мг) в MeOH (40 мл) в атмосфере H₂, получают приведенный ниже соответствующий свободный амин (1,9 г, 100%).

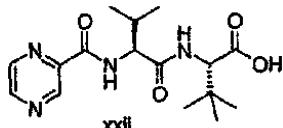


2-Пиразинкарбоновую кислоту (970 мг, 7,8 ммоль) растворяют в DCM (20 мл). К указанному раствору добавляют РуBOP (4,06 г, 7,8 ммоль). К раствору добавляют свободный амин (1,9 г, 7,8 ммоль) в DCM (15 мл) и затем добавляют DIPEA (1,36 мл, 7,8 ммоль). Полученную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы остаток очищают хроматографией, используя 30-40% EtOAc/гексаны, и получают соединение xxii (2,07 г, 75,8%).



Пример полу продукта 115. Соединение xxii.

Соединение xxii гидролизуют, используя MeOH (20 мл) и 1н. NaOH (3 экв.), и получают соединение xxiii (1,82 г, 93,9%).



Пример полу продукта 116. Соединение xxiii.

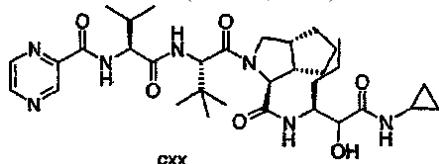
Соединение xxii (895 мг, 2,66 ммоль) растворяют в DCM (10 мл). К раствору добавляют DCC (3,2 ммоль) и затем HOAt (435 мг, 3,2 ммоль). Затем добавляют соединение v (3,2 ммоль) в ТГФ (16 мл). Полученную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc, фильтруют через силикагель и концентрируют. Полученный остаток очищают хроматографией, используя 50% EtOAc/гексаны, и получают соединение xxiii (730 мг, 54,8%).

Пример полу продукта 117. Соединение xxiv.

Соединение xxiii гидролизуют, используя EtOH (5 мл) и 1н. NaOH (1,5 экв.), и получают соединение xxiv (690 мг, 100%).

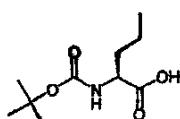
Пример полу продукта 118. Соединение cxx.

Соединение xxiv (245 мг, 0,52 ммоль) растворяют в DCM (3 мл). К раствору добавляют PyBOP (330 мг, 0,62 ммоль) и затем добавляют соединение xiii' (120 мг, 0,62 ммоль). К полученной смеси добавляют DIPEA (0,11 мл, 0,62 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы остаток очищают хроматографией, используя 5% EtOH/EtOAc, и получают соединение cxx (220 мг, 60%).

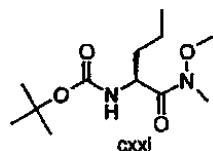


Пример полу продукта 119. Соединение xiii'.

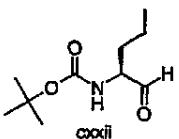
Boc-NVA-OH (24,96 г, 114,9 ммоль)



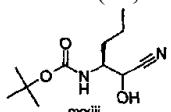
растворяют в ТГФ (200 мл). К раствору порциями добавляют CDI (22,35, 137,8 ммоль) и раствор перемешивают в течение 30 мин. N,O-диметилгидроксиламингидрохлорид (12,33 г, 126,4 ммоль) растворяют в ДМФ (50 мл) и затем к раствору добавляют DIPEA (22 мл, 126,4 ммоль). ДМФ раствор оставляют перемешиваться при комнатной температуре в течение 20 мин и затем добавляют ТГФ раствор. Полученную смесь перемешивают в течение двух выходных дней в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрируют в вакууме до общего объема 100 мл. Полученную органическую фазу промывают 1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют, получая неочищенное соединение cxxi (25,3 г).



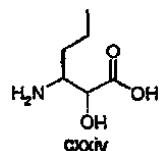
LAH (107,3 ммоль) добавляют в сухую круглодонную колбу на 1 л в атмосфере N₂ в виде 1 М раствора в Et₂O. Полученный раствор охлаждают до 0°C и затем добавляют по каплям соединение cxxi (97,5 ммоль) в Et₂O (100 мл). По завершении добавления полученную смесь перемешивают в течение 30 мин. Реакционную смесь гасят при 0°C медленным добавлением EtOAc (50 мл), с последующим медленным добавлением 5% раствора KHSO₄ (50 мл). Образовавшуюся смесь перемешивают в течение 30 мин. Органическую фазу промывают 1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют, получая неочищенное соединение cxxii (22,28 г).



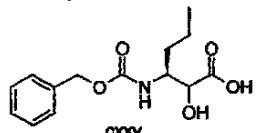
Соединение cxxii растворяют в MeOH (100 мл). Na₂S₂O₄ (16,82 г, 96,6 ммоль) растворяют в воде (100 мл) и затем добавляют к раствору соединения cxxii при 0°C. Полученную смесь хранят в холодильнике (5°C) в течение ночи. К реакционной смеси добавляют KCN (7,53 г, 115,9 ммоль) в воде (100 мл) и перемешивают 1,5 ч при комнатной температуре. Соединение экстрагируют EtOAc (3× 100 мл). Органическую фазу промывают насыщенным раствором соли (3×50 мл), сушат над MgSO₄, фильтруют и концентрируют, получая неочищенное соединение cxxiii (15,86 г).



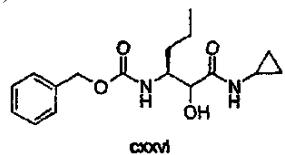
Соединение cxxiii (15,86 г) растворяют в диоксане (100 мл). К указанному раствору добавляют концентрированную HCl (37%, 100 мл) с последующим добавлением анизола (10 мл) и нагревают до температуры кипения с обратным холодильником (110°C). Реакционную смесь перемешивают в течение 1,5 ч. Затем реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и растворитель удаляют в вакууме, получая сухую пасту. Остаток сушат в течение ночи в глубоком вакууме, получая неочищенное соединение cxxiv.



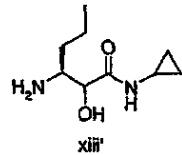
Соединение cxxiv (69,6 ммоль) растворяют в ДМФ (60 мл) и ТГФ (60 мл). К смеси добавляют N-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимид (17,33 г, 69,6 ммоль), с последующим добавлением DIPEA (12,1 мл, 69,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Смесь концентрируют до остаточного объема (50 мл) и разбавляют EtOAc. Органическую фазу промывают 0,1н. HCl (2×100 мл) и насыщенным раствором соли, получая соединение cxxv (17,5 г, 54,2% за пять стадий).



Соединение cxxv (5,66 г, 20,14 ммоль) растворяют в DCM (60 мл). К указанному раствору добавляют PyBOP (12,57 г, 24,2 ммоль) и HOBT (3,27 г, 24,2 ммоль) и перемешивают пять минут. Полученную смесь охлаждают до 0°C и затем добавляют циклопропиламин (1,67 мл, 24,2 ммоль) и DIPEA (4,2 мл, 24,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи, давая нагреться до комнатной температуры. Реакционную смесь промывают 0,1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органическую фазу затем концентрируют и очищают хроматографией, используя 70% EtOAc/гексаны, что дает соединение cxxvi (3,18 г, 49,3%).



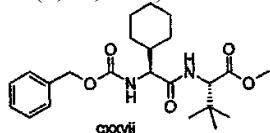
Соединение cxxvi (3,18 г, 9,94 ммоль) гидрируют, используя 10% Pd/C (600 мг) в MeOH (70 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере H₂, фильтруют через целит и концентрируют, получая неочищенное соединение xiii' (2,1 г, 100%).



Пример полупродукта 120. Соединение cxxvii.

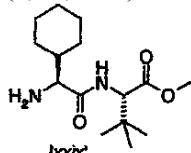
N-Cbz-L-циклогексилглицин (3 г, 10,3 ммоль) растворяют в DCM (36 мл). К указанному раствору добавляют HOAt (1,5 г, 11,28 ммоль) и DCC (11,28 мл, 11,28 ммоль) и перемешивают 5 мин. К полученной смеси добавляют гидрохлорид метилового эфира L-трет-лейцина (103 мл, 1 М раствор, 10,3 ммоль) и перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь фильтруют через целит, промывают EtOAc и концентрируют до остатка, который очищают хроматографией, используя 20-30%

EtOAc/гексаны, что дает соединение схвii (2,2 г, 52%).



Пример полупродукта 121. Соединение lxxxi'.

Соединение схвii (2,2 г, 5,2 ммоль) гидрируют, используя 20% Pd(OH)₂/C (1 г) в MeOH (15 мл) в атмосфере H₂, и получают соединение lxxxi' (1,4 г, 98%).



Пример полупродукта 122. Соединение lxxx.

2-Пиразинкарбоновую кислоту (360 мг, 2,9 ммоль) растворяют в DCM (10 мл). К раствору добавляют PyBOP (1,81 г, 3,5 ммоль). Затем к раствору добавляют соединение lxxxi' (825 мг, 2,9 ммоль) в ТГФ (10 мл), с последующим добавлением DIPEA (0,5 мл, 2,9 ммоль). Полученную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Остаток, полученный от концентрирования органической фазы, очищают хроматографией, используя 30% EtOAc/гексаны, и получают соединение lxxx (780 мг, 69%).

Пример полупродукта 123. Соединение lxxxi.

Соединение lxxx гидролизуют, используя MeOH (10 мл) и 1н. NaOH (3 зкв.), и получают соединение lxxxi (615 мг, 81,8%).

Пример полупродукта 124. Соединение lxxxii.

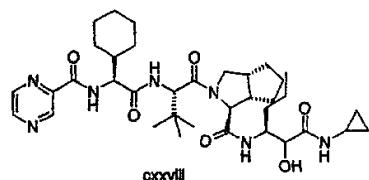
Соединение lxxxi (610 мг, 1,6 ммоль) растворяют в DCM (10 мл). Затем к раствору добавляют DCC (1,94 мл, 1,94 ммоль), с последующим добавлением HOAt (270 мг, 1,94 ммоль). Затем к раствору добавляют соединение v (1,94 ммоль) в ТГФ (19,4 мл). Полученную смесь перемешивают в течение двух ночей в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc, фильтруют через силикагель и концентрируют. Полученный остаток очищают хроматографией, используя 40% EtOAc/гексаны, и получают соединение lxxxii (450 мг, 83,4%).

Пример полупродукта 125. Соединение lxxxiii.

Соединение lxxxi гидролизуют, используя EtOH (10 мл) и 1н. NaOH (3 экв.), и получают соединение lxxxiii (650 мг, 99%).

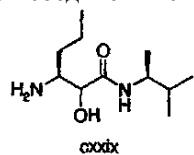
Пример полупродукта 126. Соединение схвii.

Соединение lxxxiii (400 мг, 0,78 ммоль) растворяют в DCM (5 мл). К раствору добавляют PyBOP (610 мг, 1,2 ммоль), с последующим добавлением соединения xiii' (230 мг, 1,2 ммоль). К полученной смеси добавляют DIPEA (0,2, мл, 1,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы остаток очищают хроматографией при градиенте от 100% EtOAc до 5% смеси EtOH/EtOAc, получая соединение схвii (365 мг, 68,7%).

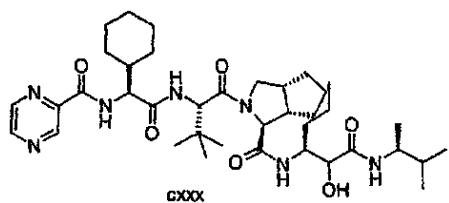


Пример полупродукта 127. Соединение схх.

Соединение lxxxiii (365 мг, 0,7 ммоль) растворяют в DCM (5 мл). К раствору добавляют PyBOP (440 мг, 0,84 ммоль), с последующим добавлением соединения схх

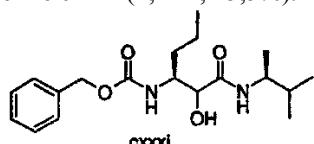


(0,84 ммоль) в ТГФ (8,4 мл). К полученной смеси добавляют DIPEA (0,1 мл, 0,84 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы, полученный остаток очищают хроматографией, используя 100% EtOAc, и получают соединение схх (350 мг, 70%).



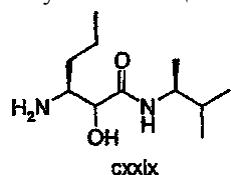
Пример полупродукта 128. Соединение cxxx.

Соединение cxxx (2,54 г, 9,05 ммоль) растворяют в DCM (30 мл). К раствору добавляют PyBOP (5,65 г, 10,9 ммоль) и HOBT (1,47 г, 10,9 ммоль) и перемешивают пять минут. Реакционную смесь охлаждают до 0°C, затем добавляют (S)-(+) -3-метил-2-бутиламин (1,27 мл, 10,9 ммоль) и DIPEA (1,9 мл, 10,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи, позволяя нагреться до комнатной температуры. Органическую фазу промывают 0,1н. HCl, насыщенным NaHCO₃, и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы полученный остаток очищают хроматографией, используя 30% EtOAc/гексан (1,44 г, 45,5%).



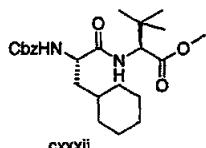
Пример полупродукта 129. Соединение cxxix.

Соединение cxxxi (1,3 г, 3,7 ммоль) гидрируют, используя 10% Pd/C (500 мг) в MeOH (40 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере H₂. Реакционную смесь фильтруют через це-лит и органическую фазу концентрируют, получая неочищенное соединение cxxix (800 мг, 100%).

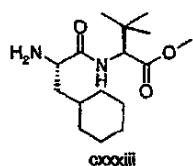


Пример полупродукта 130. Соединение cxxxiv.

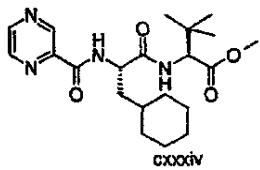
Соединение cxxxii (1,6 г, 3,7 ммоль)



растворяют в MeOH (12 мл). После тщательного продувания N₂ добавляют 10 мас.% Pd(OH)₂ на углероде (0,74 г) и смесь гидрируют в течение ночи, затем полученную реакционную смесь анализируют TCX (30% EtOAc/гексан). Раствор отделяют от твердого вещества фильтрованием и концентрируют, получая соединение cxxxiii



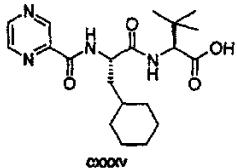
в виде бесцветного масла (100%), которое используют на следующей стадии без дополнительной очистки. 2-Пиразинкарбоновую кислоту (400 мг, 3,2 ммоль, 1,1 экв.) растворяют в DCM/TГФ (4мл/4 мл) и затем добавляют HOAt (440 мг, 3,2 ммоль) и DCC (3,3 мл, 1М в DCM). После перемешивания при ком-натной температуре в течение 20 мин соединение cxxxiii (0,96 г, 3,2 ммоль), полученное выше, растворяют в DCM (6,4 мл) и добавляют к активированной смеси. После перемешивания в течение 2 дней при ком-натной температуре реакционную смесь фильтруют через це-лит и концентрируют до остатка, который очищают хроматографией на колонке (50% EtOAc/гексаны) и получают соединение cxxxiv в виде белого твердого вещества (1,06 г, 83%).



Пример полупродукта 131. Соединение cxxxv.

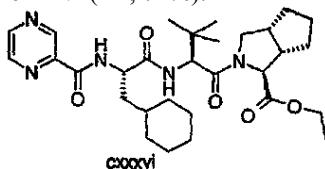
Соединение cxxxiv (1,06 г, 2,6 ммоль) растворяют в MeOH (10 мл) и затем добавляют 2н. NaOH (водн.) (4 мл, 8 ммоль). Раствор перемешивают при ком-натной температуре в течение ночи, затем полно-

ту гидролиза контролируют TCX (50% EtOAc/гексаны). Раствор подкисляют до pH 3 с помощью 5н. HCl, разбавляют EtOAc и затем органическую фазу экстрагируют. Экстрагированную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, получая концентрированием соединение cxxxv (100%).



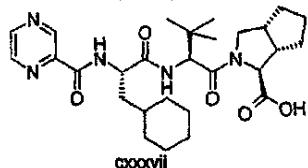
Пример полу продукта 132. Соединение cxxxvi.

К DCM раствору (8 мл) соединения cxxxv (1,44 г, 3,7 ммоль) при комнатной температуре добавляют HOAt (500 мг, 3,7 ммоль) и затем добавляют 1 М раствор DCC в DCM (3,7 мл, 3,7 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре к полученной HOAt-активированной кислоте добавляют ТГФ раствор (18,5 мл, 0,2 М) соединения v (3,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтруют через целин. Фильтраты разбавляют EtOAc (120 мл) и промывают водой и насыщенным раствором соли. Органическую фазу сушат и концентрируют, получая желтое масло, которое очищают хроматографией на силикагеле (70% EtOAc/гексан) и получают соединение cxxxvi (1 г, 71%).

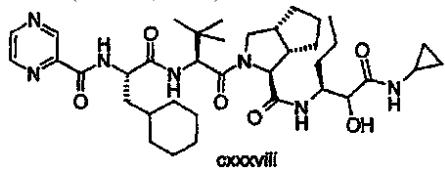


Пример полу продукта 133. Соединение cxxxvii.

К EtOH раствору (8 мл) соединения cxxxvi (1 г, 1,8 ммоль) добавляют 2н. водный раствор NaOH (2,7 мл, 5,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре, затем подкисляют до pH 3 с помощью 5н. HCl, разбавляют EtOAc и затем органическую фазу экстрагируют. Экстрагированную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, получая концентрированием соединение cxxxvii (88%).

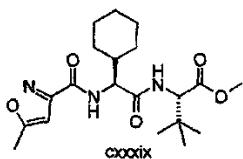


Пример полу продукта 133. Соединение cxxxviii К DCM раствору (10 мл) соединения cxxxvii (350 мг, 0,6 ммоль) добавляют PyBOP (450 мг, 0,86 ммоль). Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин. К указанному раствору затем добавляют соединение xii' (160 мг, 0,86 ммоль) с последующим добавлением DIPEA (0,23 мл, 1,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем гасят водой (25 мл) в течение 30 мин. Смесь экстрагируют затем EtOAc. Экстрагированную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, затем концентрируют, получая желтое масло. Очистка хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc) дает соединение cxxxviii (407 мг, 88%).



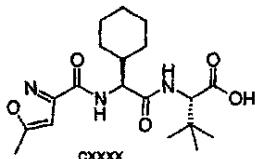
Пример полу продукта 134. Соединение cxxxix.

5-Метилизоксазол-3-карбоновую кислоту (200 мг, 2,05 ммоль) растворяют в DCM (5 мл). К раствору добавляют PyBOP (1,07 г, 2,05 ммоль). К раствору добавляют соединение lxxix' (582 мг, 2,05 ммоль) в DCM (5 мл) с последующим добавлением DIPEA (0,36 мл, 2,05 ммоль). Полученную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют и полученный остаток очищают хроматографией, используя 30% EtOAc/гексаны, что дает соединение cxxxix (495 мг, 61,4%).



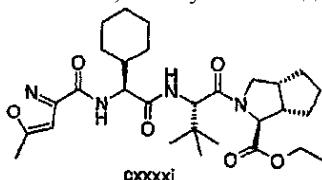
Пример полу продукта 135. Соединение cxxxx.

Соединение cxxxx гидролизуют, используя MeOH (10 мл) и 1н. NaOH (3 экв.), и получают соединение cxxxx (430 мг, 90%).



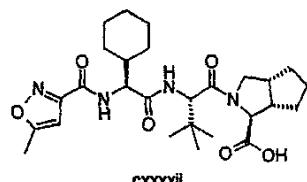
Пример полу продукта 136. Соединение cxxxxi.

Соединение cxxxx (380 мг, 1 ммоль) растворяют в DCM (5 мл). Затем к раствору добавляют DCC (1,2 ммоль), с последующим добавлением HOAt (165 мг, 1,2 ммоль). Затем добавляют соединение v (1,2 ммоль) в ТГФ (12 мл). Полученную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc, фильтруют через силикагель и концентрируют. Полученный остаток очищают хроматографией, используя 35% EtOAc/гексаны, и получают соединение cxxxxi (320 мг, 58%).



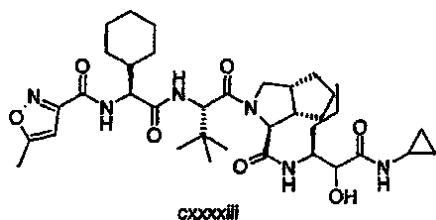
Пример полу продукта 137. Соединение cxxxxii.

Соединение cxxxxi гидролизуют, используя EtOH (10 мл) и 1н. NaOH (3 экв.), и получают соединение cxxxxii (730 мг, 94,3%).



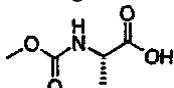
Пример полу продукта 138. Соединение cxxxxiii.

Соединение cxxxxii (240 мг, 0,46 ммоль) растворяют в DCM (5 мл). Затем к раствору добавляют PyBOP (295 мг, 0,56 ммоль) с последующим добавлением соединения xiii' (110 мг, 0,56 ммоль). К полученной смеси добавляют DIPEA (0,1 мл, 0,56 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение двух ночей в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляют EtOAc и органическую фазу промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. После концентрирования органической фазы полученный остаток очищают хроматографией, используя 90% EtOAc/гексаны, и получают соединение cxxxxiii (168 мг, 53%).



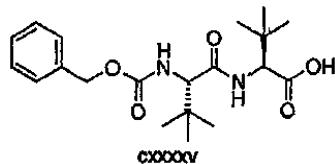
Пример полу продукта 139. Соединение cxxxxiv.

К раствору NaOH (2н, 42,1 мл, 84,2 ммоль) при 5°C добавляют L-аланин (5,00 г, 56,1 ммоль). После перемешивания в течение 10 мин одновременно добавляют по каплям метилхлорформиат (6,5 мл, 84,2 ммоль) и NaOH (2н, 42,1 мл, 84,2 ммоль). Раствор перемешивают на ледяной бане в течение 2 ч, затем при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь промывают Et₂O (2×50 мл), водный слой нейтрализуют до pH ~2 с помощью 5н. HCl и экстрагируют EtOAc (3×50 мл). Экстрагированную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли, сушат MgSO₄ и концентрируют, получая соединение cxxxxiv,

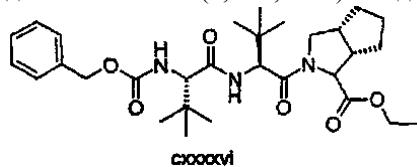


cxxxxiv

N-карбометокси-L-аланин, (4,54 г, 54%) в виде бесцветного масла.
Пример полупродукта 140. Соединение cxxxxvi.
Раствор соединения cxxxxv (3,57 г, 9,44 ммоль)



в ТГФ при 5°C обрабатывают HOAt (1,28 г, 9,44 ммоль) и затем добавляют DCC (9,50 мл, 9,50 ммоль). После перемешивания на ледяной бане в течение 45 мин добавляют раствор соединения v (104 мл, 10,4 ммоль) в ТГФ. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Смесь охлаждают до 5°C и гасят насыщенным NaHCO₃. После фильтрования с целью удаления осажденного DCU смесь растворяют в EtOAc (100 мл), промывают насыщенным NaHCO₃, насыщенным раствором соли, затем сушат MgSO₄ и концентрируют до остатка, очищают хроматографией на колонке с силикагелем (25% EtOAc/гексаны), получая соединение exxxxvi (2,91 г, 57%) в виде смолистой пены.

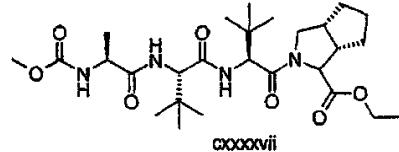


Пример полупродукта 141. Соединение cvii.

К раствору соединения exxxxvi в MeOH (25 мл), охлажденному на ледяной бане, в токе N₂, медленно добавляют Pd/C. Смесь гидрируют при 1 атм в течение ночи. Катализатор удаляют фильтрованием, фильтрат объединяют с 5 мл ДМФ и сушат в вакууме, получая соединение cvii.

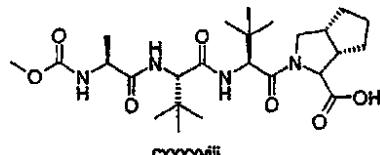
Пример полупродукта 142. Соединение exxxxvii.

Раствор соединения exxxxiv (0,298 г, 2,03 ммоль) и HOAt (0,276 г, 2,03 ммоль) в ТГФ, охлажденный на ледяной бане, обрабатывают DCC (2,05 мл, 2,05 ммоль). После перемешивания на ледяной бане в течение 0,5 ч добавляют раствор соединения cvii в ТГФ и затем добавляют DIPEA (0,39 мл, 2,2 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, затем охлаждают на ледяной бане и гасят насыщенным NaHCO₃. Выпавший в осадок DCU фильтруют и фильтрат растворяют в EtOAc (100 мл). Органическую fazу промывают насыщенным NaHCO₃, насыщенным раствором соли и затем сушат MgSO₄. После удаления органического растворителя остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (60% EtOAc/гексаны), получая соединение cxxxxvii (0,47 г, 48%) в виде смолистой пены.



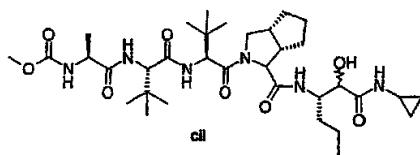
Пример полупродукта 143. Соединение cxxxxviii.

К раствору соединения cxxxxvii (0,47 г, 0,847 ммоль) в EtOH (5 мл) при 5°C добавляют NaOH (2н, 1,31 мл, 2,62 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч. Раствор подкисливают до pH ~2 с помощью HCl (1н) и EtOH удаляют упариванием на роторном испарителе. Смесь экстрагируют EtOAc (3× 30 мл), объединенный экстракт промывают насыщенным раствором соли и затем сушат MgSO₄. Растворитель удаляют и остаток сушат в вакууме, получая соединение cxxxxviii (0,366 г, 82%) в виде смолистой пены.



Пример полупродукта 144. Соединение cil.

Раствор соединения cxxxxviii (0,366 г, 0,718 ммоль) в DCM охлаждают на ледяной бане и обрабатывают PyBop (0,599 г, 1,15 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 0,5 ч смесь охлаждают на ледяной бане и обрабатывают раствором соединения xiii" (0,200 г, 1,08 ммоль) в ТГФ и DIPEA (0,250 мл, 1,44 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем гасят раствором NH₄Cl. Растворитель концентрируют и смесь растворяют в EtOAc (100 мл). Органическую fazу промывают насыщенным NaHCO₃, насыщенным раствором соли и затем сушат MgSO₄. После удаления органического растворителя остаток очищают хроматографией на колонке (5% EtOH/EtOAc), получая соединение cil (0,35 г, 72%).



Пример полупродукта 145. Соединение сххi.

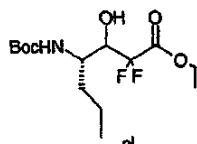
К ТГФ раствору (85 мл) N-Boc-Nva-OH (соединения 1) (8,68 г, 40 ммоль) добавляют CDI (7,79 г, 48 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 мин полученный раствор обрабатывают ДМФ раствором (25 мл), содержащим N,O-диметилгидроксиламингидрохлорид (4,25 г, 44 ммоль) и DIPEA (7,66 мл, 44 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь затем концентрируют в вакууме. Полученный остаток разбавляют EtOAc (300 мл). Полученный раствор последовательно промывают 0,1н. HCl (50 мл), насыщенным NaHCO₃ (3×50 мл) и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (40% EtOAc/гексаны) и получают соединение сххi (9,38 г, 94%).

Пример полупродукта 146. Соединение сххii.

К диэтиловому (Et₂O) раствору (50 мл) соединения сххi (9,38 г, 31,9 ммоль), охлажденному до 0°C добавляют (медленно) LAH (34,7 мл, 1 М, 34,7 ммоль). Во время добавления LAH температуру реакционной колбы поддерживают ниже 5°C. По завершению добавления к реакционной смеси добавляют EtOAc (20 мл), чтобы погасить избыток LAH. Водный KHSCU (5%, 20 мл) добавляют затем каплям, чтобы поддерживать температуру ниже 5°C. Органическую фазу отделяют и затем промывают последовательно 1н. HCl (3×30 мл), насыщенным NaHCO₃ (3×30 мл) и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют и сушат в вакууме, получая неочищенное соединение сххii (5,18 г, 69%).

Пример полупродукта 147. Соединение cl.

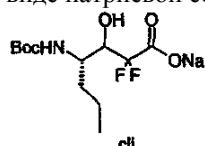
К суспензии Zn (2,75 г, 42 ммоль) в ТГФ (25 мл) добавляют при кипячении с обратным холодильником 0,2 мл EtOC(O)CF₂Br. Затем медленно добавляют ТГФ раствор (25 мл) соединения сххii (3,05 г, 15,0 ммоль) и EtOC(O)CF₂Br (4,84 мл, 37,5 ммоль). По завершении добавления обоих реагентов реакционную смесь дополнительно нагревают до температуры кипения с обратным холодильником еще 30 мин. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и разбавляют DCM (200 мл). Органическую фазу промывают 1н. KHSO₄. Органическую фазу концентрируют и сушат в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (20% EtOAc/гексан), получая соединение cl (2,78 г, 57%).



Данная методика, по существу, та же, что описана Thaisrivongs et al., J. Med. Chem., 29, 2080-2087 (1986).

Пример полупродукта 148. Соединение cli.

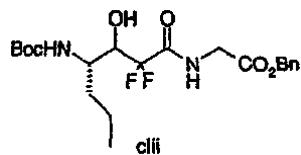
ТГФ раствор (40 мл) соединения cl (2,78 г, 8,53 ммоль) обрабатывают 1н. NaOH (12,8 мл, 12,8 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи растворитель частично удаляют в вакууме. Оставшуюся реакционную смесь разбавляют водой (50 мл) и лиофилизируют, получая неочищенное соединение cli (2,82 г, >100%) в виде натриевой соли.



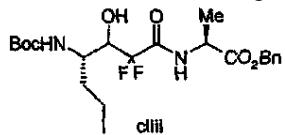
Данная методика, по существу, та же, что описана Thaisrivongs et al., J. Med. Chem.. 29, 2080-2087(1986).

Пример полупродукта 149. Соединение clii.

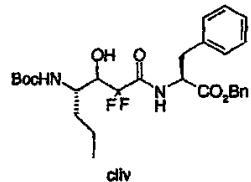
DCM раствор (10 мл) неочищенного соединения cli (516 мг, 1,61 ммоль) обрабатывают HOBT (436 мг, 3,23 ммоль) и DIC (0,328 мл, 2,09 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 мин реакционную смесь обрабатывают DCM раствором (5 мл), содержащим TsOH-соль бензилового эфира глицина (815 мг, 2,42 ммоль) и DIPEA (0,422 мл, 2,42 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 12 ч реакционную смесь гасят водой и экстрагируют EtOAc. Органическую фазу сушат, концентрируют в вакууме и очищают хроматографией на силикагеле (40% EtOAc/гексаны), получая соединение clii (495 мг, 69%). ¹H ЯМР соединения clii (400 МГц, CDCl₃): δ 7,29-7,21 (м, 5H), 5,16 (ущ.с, 2H), 4,89 (ущ.с, 1H), 4,20-3,90 (м, 4H), 3,80 (ущ.с, 1H), 1,75-1,42 (м, 4H), 1,38 (с, 9H), 0,87 (м, 3H).



Исходя из неочищенного соединения clii, соединения cliii (83%) и cliv (50%) получают способом, идентичным описанному для соединения clii. ^1H ЯМР соединения cliii (400 МГц, CDCl_3): δ 7,49 (уш.с, 1H), 7,34-7,24 (м, 5H), 5,13 (AB кв, $J=12,2$ Гц, $J'=23,9$ Гц, 2H), 4,88 (уш.д, $J=8,8$ Гц, 1H), 4,53 (м, 1H), 3,98-3,91 (м, 2H), 3,82 (м, 1H), 1,65-1,20 [м, 16H, включая синглет при 1,37 (9H)], 0,86 (т, $J=7,3$ Гц, 3H).

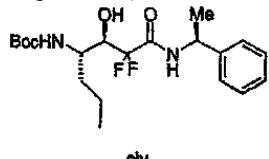


^1H ЯМР соединения cliv (400 МГц, CDCl_3): δ 7,60-7,0 (м, 10H), 5,30-5,0 (м, 2H), 5,00-4,75 (м, 2H), 4,15-3,70 (м, 3H), 3,30-3,00 (м, 2H), 1,75-1,20 [м, 13H, включая синглет при 1,37 (9H)], 0,86 (уш.с, 3H).



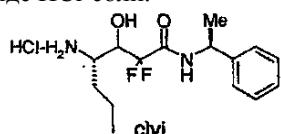
Пример полу продукта 150. Соединение clv.

К DCM (10 мл) и ТГФ (5 мл) раствору неочищенного соединения clii (1 г, 3,13 ммоль) добавляют НОВТ (634 мг, 4,69 ммоль) и EDCI (781 мг, 4,07 ммоль), и затем (s)- α -метилбензиламин (0,604 мл, 4,69 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре и затем гасят водой. Реакционную смесь экстрагируют EtOAc. Органическую фазу промывают насыщенным раствором соли и сушат Na_2SO_4 . Органическую фазу концентрируют в вакууме, получая остаток, который очишают хроматографией на силикагеле (20% EtOAc/гексаны) и получают соединение clv (459 мг, 37%). ^1H ЯМР соединения clv (400 МГц, CDCl_3): δ 7,32-7,21 (м, 6H), 5,0 (м, 1H), 4,75 (м, 1H), 3,94 (м, 2H), 3,70 (м, 1H), 1,65-1,15 [м, 16H, включая дублет при 1,51 ($J=6,8$ Гц, 3H), синглет при 1,39 (9H)], 0,82 (м, 3H).

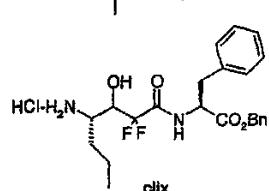
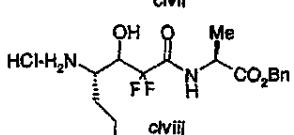
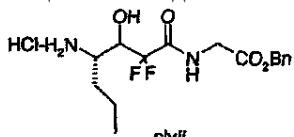


Пример полу продукта 151. Соединение clvi.

Соединение clv (220 мг, 0,55 ммоль) растворяют в 4н. HCl в диоксане (10 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч и затем концентрируют в вакууме, получая неочищенное соединение clvi (~100%) в виде HCl-соли.

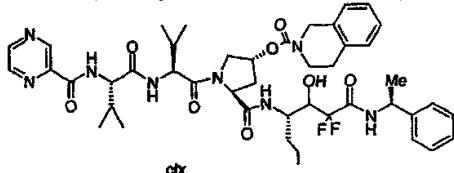


Следуя методике, описанной для получения соединения clvi, соединения clvii, clviii и clix получают с почти количественным выходом из неочищенного соединения clii.



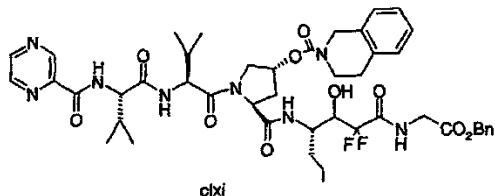
Пример полупродукта 152. Соединение clx.

DCM раствор (4 мл) HCl-соли соединения vii (96 мг, 0,144 ммоль) обрабатывают PyBOP (120 мг, 0,23 ммоль) и DIPEA (0,1 мл, 0,576 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 мин раствор обрабатывают ТГФ раствором (4 мл), содержащим соединение clv (0,288 ммоль) и DIPEA (0,2 мл, 1,152 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют EtOAc (50 мл) и органическую фазу промывают затем NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органическую фазу концентрируют в вакууме и остаток очищают хроматографией на силикагеле (80% EtOAc/гексаны), получая соединение clx (113 мг, 89%).



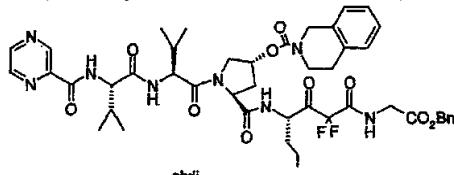
Пример полупродукта 153. Соединение clxi.

DCM раствор (6 мл) соединения vii (140 мг, 0,235 ммоль) обрабатывают PyBOP (196 мг, 0,376 ммоль) в течение 30 мин. Затем к полученному раствору добавляют ТГФ раствор (6 мл) соединения clvii (~0,47 ммоль) и DIPEA (0,327 мл, 1,88 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и гасят водой (30 мин). Реакционную смесь экстрагируют EtOAc (50 мл). Органическую фазу промывают NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Объединенные водные слои вновь экстрагируют EtOAc (50 мл). Объединенные органические фазы сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (80-100 смесь EtOAc/гексаны) и получают соединение clxi (104 мг, 48%).



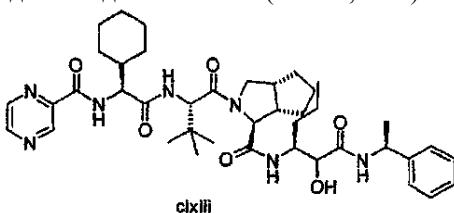
Пример полупродукта 154. Соединение clxii.

К DCM раствору (10 мл) соединения clxi (280 мг, 0,304 ммоль) добавляют DMP реагент (193 мг, 0,456 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч и гасят 10% Na₂SO₃. Органическую фазу промывают NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Полученную органическую фазу сушат и концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (80-100% EtOAc/гексаны) и получают соединение clxii (271 мг, 97%).



Пример полупродукта 155. Соединение clxiii.

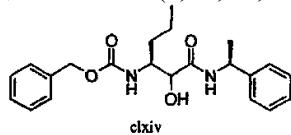
Соединение lxxxvii (220 мг, 0,43 ммоль) поглощают DCM (5 мл). К DCM раствору добавляют PyBOP (270 мг, 0,51 ммоль) и перемешивают 5 мин. К указанному раствору добавляют по каплям соединение xxxvi' (0,51 ммоль) в ТГФ (5,1 мл). К реакционной смеси добавляют DIPEA (0,09 мл, 0,51 ммоль) и перемешивают в течение ночи в атмосфере N₂. На следующий день реакционную смесь разбавляют EtOAc, промывают насыщенным NaHCO₃, промывают насыщенным раствором соли. Очистка при градиенте смеси 70-90% EtOAc/гексан дает соединение clxiii (180 мг, 56%).



Пример полупродукта 156. Соединение clxiv.

Соединение cxxv (2,09 г, 7,4 ммоль) поглощают DCM (20 мл). К указанному раствору добавляют PyBOP (4,64 г, 8,9 ммоль) и HOBr (1,2 г, 8,9 ммоль) и перемешивают 5 мин. Полученную смесь охлаждают до 0°C и затем добавляют S(-)-α-метилбензиламин (1,15 мл, 8,9 ммоль) и DIPEA (1,55 мл, 8,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи, давая нагреться до комнатной температуры. Реакционную смесь промывают 0,1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Очист-

ка смесью 30% EtOAc/гексаны дает соединение clxiv (1,6 г, 56,3%).

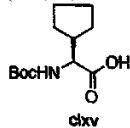


Пример полупродукта 157. Соединение xxxvi¹.

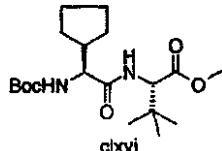
Соединение clxiv (1,48 г, 3,8 ммоль) гидрируют, используя 10% Pd/C (300 мг) в MeOH (50 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере H₂. Реакционную смесь фильтруют через целин и концентрируют, получая соединение xxxvi¹ (895 мг, 94,2%).

Пример полупродукта 158. Соединение clxvi.

К DCM раствору (15 мл) соединения clxv (2 г, 8,2 ммоль)

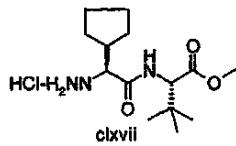


добавляют HOAt (1,34 г, 9,84 ммоль) и DCC (9,84 мл, 1 М, 9,84 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 20 мин к полученному выше раствору добавляют ТГФ раствор (9,84 мл), содержащий гидрохлорид метилового эфира трет-L-лейцина (9,84 ммоль) и DIPEA (1,72 мл, 9,84 ммоль). Затем добавляют при комнатной температуре DMAP (1 г, 8,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Последующие стандартная водная обработка и хроматография на силикагеле (20% EtOAc/гексаны) приводят к получению соединения clxvi (1,75 г, 58%).



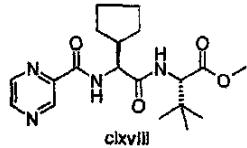
Пример полупродукта 159. Соединение clxvii.

К ТГФ раствору (35 мл) соединения clxvi (1,75 г, 4,73 ммоль) добавляют 4н. раствор HCl в диоксане (11,8 мл, 47,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. По прошествии указанного времени растворитель удаляют при пониженном давлении, получая неочищенное соединение clxvii (~100%), которое вновь растворяют в DMF и используют непосредственно в последующей реакции.



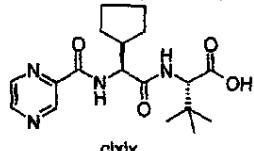
Пример полупродукта 160. Соединение clxviii.

К DCM раствору (15 мл), содержащему 2-пиразинкарбоновую кислоту (447 мг, 3,6 ммоль), РуВОР (1,87 г, 3,6 ммоль) добавляют DMF раствор (15 мл) соединения clxvii (811 мг, 3 ммоль). К образовавшейся смеси затем добавляют DIPEA (0,63 мл, 3,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре и затем гасят водой. Реакционную смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой промывают насыщенным раствором соли и концентрируют в вакууме, что дает остаток, который очищают хроматографией на силикагеле (40% EtOAc/гексаны) и получают соединение clxviii (0,93 г, 82%).



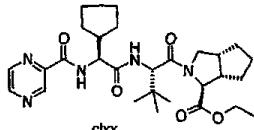
Пример полупродукта 161. Соединение clxix.

К MeOH раствору (10 мл) соединения clxviii (0,93 г, 2,47 ммоль) добавляют 2н. NaOH (3,71 мл, 7,41 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Затем реакционную смесь подкисляют до pH 3, используя 1н. HCl. Реакционную смесь разбавляют EtOAc (75 мл) и промывают водой и насыщенным раствором соли. Полученный таким образом органический слой сушат и концентрируют в вакууме, получая соединение clxix (~100%).



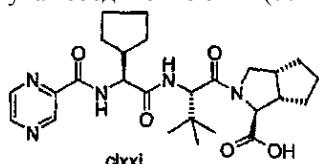
Пример полупродукта 162. Соединение clxx.

DCM раствор (10 мл) соединения clxix (2,47 ммоль) обрабатывают HOAt (436 мг, 3,21 ммоль) и DCC (3,2 мл, 1 М, 3,2 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь обрабатывают ТГФ раствором (13,6 мл) соединения v (499 мг, 2,72 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи белые твердые вещества (мочевину) фильтруют. Фильтраты концентрируют в вакууме, получая остаток, который очищают хроматографией на силикагеле, получая соединение clxx (0,99 г, 76%).



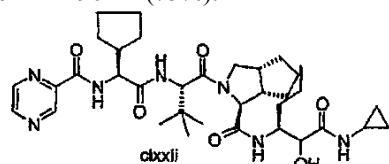
Пример полупродукта 163. Соединение clxxi.

EtOH раствор (20 мл) соединения clxx (0,99 г, 1,88 ммоль) обрабатывают 2н. NaOH (2,81 мл, 5,63 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакционную смесь подкисливают до pH 3 с помощью 1н. HCl. Реакционную смесь экстрагируют EtOAc (75 мл). Органический слой сушат и концентрируют в вакууме, получая соединение clxxi (772 мг, 82%).



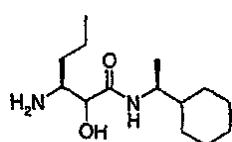
Пример полупродукта 164. Соединение clxxii.

DCM раствор (10 мл) соединения clxxi (290 мг, 0,58 ммоль) обрабатывают PyBOP (484 мг, 0,93 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 20 мин реакционную смесь обрабатывают ТГФ раствором (7,5 мл) соединения xiii' (140 мг, 0,75 ммоль), затем DIPEA (0,13 мл, 0,75 ммоль). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре реакционную смесь гасят водой и экстрагируют EtOAc. Полученный органический слой промывают насыщенным раствором соли, сушат и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле (5% EtOH/EtOAc), получая соединение clxxii 290 мг (75%).

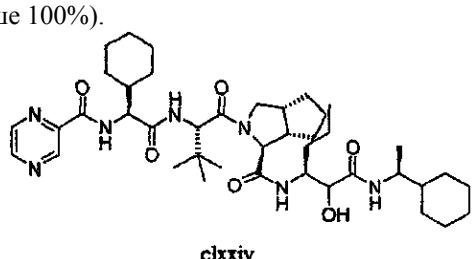


Пример полупродукта 165. Соединение clxxiv.

Соединение lxxxiii (600 мг, 1,17 ммоль) поглощают DCM (4 мл). Добавляют PyBOP (670 мг, 1,3 ммоль), перемешивают пять минут и охлаждают до 0°C. К указанному раствору добавляют по каплям соединение clxxiii



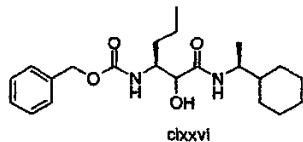
(333 мг, 1,3 ммоль) в ТГФ (13 мл). К реакционной смеси добавляют DIPEA (0,23 мл, 1,3 ммоль) и дают нагреться до температуры окружающей среды, перемешивая в течение двух ночей. На следующий день реакционную смесь концентрируют и очищают, используя 2% EtOH/EtOAc, что дает неочищенное соединение clxxiv (900 мг, свыше 100%).



Пример полупродукта 166. Соединение clxxvi.

Соединение cxxv (3,01 г, 10,7 ммоль) поглощают DCM (30 мл) и температуру снижают до -78°C. К указанному раствору добавляют PyBOP (6,1 г, 11,7 ммоль) и HOBT (1,58 г, 11,7 ммоль) с последующим добавлением (S)-(+)-1-циклогексилэтиламина, соединения clxxv, (1,74 мл, 11,7 ммоль) и DIPEA (2,1 мл, 11,7 ммоль). Полученную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. На следую-

ший день реакционную смесь разбавляют EtOAc, промывают 0,1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Продукт очищают, используя 40% EtOAc/гексан, и получают 2 г (47,8%) соединения clxxvi.

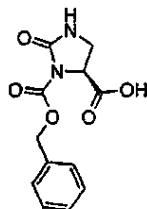


Пример полу продукта 167. Соединение clxxiii.

Соединение clxxvi (2 г, 5,13 ммоль) гидрируют, используя 10% Pd/C (500 мг) в MeOH (40 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере H₂. Реакционную смесь фильтруют через це ллит и концентрируют, получая соединение clxxiii (1,31 г, 99,8%).

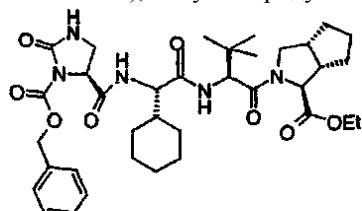
Пример полу продукта 168. Соединение clxxix.

В круглодонной колбе в инертной атмосфере соединение clxxvii [1-бензиловый эфир (S)-(-)-2-оксо-1,5-имидазолинкарбоновой кислоты]



clxxvii

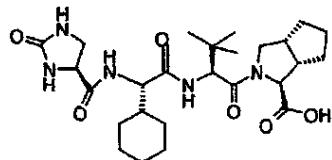
(290 мг, 1,1 ммоль) растворяют в безводном ДМФ (6 мл). Добавляют HOAt (151 мг, 1,2 ммоль) и ре акционную смесь перемешивают при комнатной температуре 25 мин. Реакционную смесь охлаждают на ледяной бане. Затем добавляют DIC (0,2 мл, 0,16 г, 1,2 ммоль) с последующим добавлением соединения clxxviii (1 ммоль, 435 мг) в безводном ДМФ (4 мл). Реакционную смесь оставляют медленно нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение 2 дней. Затем реакционную смесь переносят в делительную воронку, содержащую 120 мл EtOAc, и промывают 2x 1н. HCl (50 мл) и 1X насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над MgSO₄. Растворитель упаривают при пониженном давлении и остаток очищают хроматографией на силикагеле (загружают в DCM и элюируют 30%, затем 50% EtOAc/DCM, затем 2% MeOH/EtOAc), получая продукт clxxix (434 мг, 64%).



clxxix

Пример полу продукта 169. Соединение clxxx.

Исходное вещество clxxix (434 мг, 0,64 ммоль) растворяют в диоксане (6 мл) и 0,5 М водном рас творе NaOH (4 мл, 3 экв.). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи. TCX в 100% EtOAc (ис пользуют пятно PMA) показывает в дополнение к кислотному продукту на старте продукт с более быст рой фракцией. Реакционную смесь подкисляют до pH 2 с помощью 1н. HCl и затем экстрагируют 2x EtOAc. К водному раствору добавляют твердый NaCl для усиления экстракции. Органические экстракты затем объединяют, сушат над MgSO₄ и упаривают при пониженном давлении. МС показывает, что CBZ группа удаляется путем гидролиза. Полученное соединение clxxx (количественный выход) используют на следующей стадии как таковое.

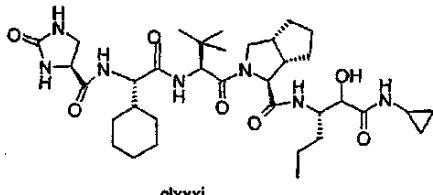


clxxx

Пример полу продукта 170. Соединение clxxxi.

В круглодонной колбе в инертной атмосфере соединение clxxx (279 мг, 0,54 ммоль) растворяют в безводном ДМФ (6 мл). Добавляют HOAt (82 мг, 0,65 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при комната ной температуре в течение 25 мин. Реакционную смесь охлаждают затем на ледяной бане. Затем добавляют DIC (0,11 мл, 0,65 ммоль) с последующим добавлением соединения xii' (0,7 ммоль) в безвод-

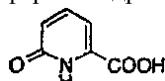
ном ДМФ (4 мл). Реакционную смесь оставляют медленно нагреваться до комнатной температуры и перемешивают 21 ч. Реакционную смесь затем выгружают в делительную воронку, содержащую 120 мл EtOAc, и промывают 2x 1н. HCl (50 мл) и 1X насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над MgSO₄. Растворитель упаривают при пониженном давлении и продукт очищают хроматографией на силикагеле (загружают в DCM и элюируют 50% EtOAc/DCM, затем 3% MeOH/EtOAc и затем 20% EtOH/EtOAc). После удаления растворителя остаток повторно растворяют в Dri Solv ТГФ и фильтруют для удаления силикагеля. Последующее удаление растворителя дает соединение clxxxii (434 мг, 64% выход).



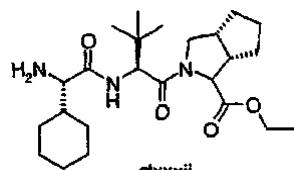
clxxxii

Пример полупродукта 171. Соединение clxxxii.

В круглодонной колбе в инертной атмосфере 6-гидроксипиколиновую кислоту

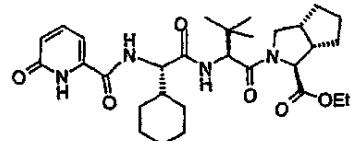


(153 мг, 1,1 ммоль) растворяют в безводном ДМФ (6 мл).Добавляют HOAt (151 мг, 1,2 ммоль) и затем реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 25 мин. Реакционную смесь охлаждают затем на ледяной бане.Добавляют DIC (0,2 мл, 0,16 г, 1,2 ммоль) с последующим добавлением соединения clxxxii



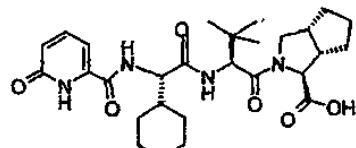
clxxxiii

(1,0 ммоль, 435 мг) в безводном ДМФ (4 мл). Реакционную смесь оставляют медленно нагреваться до комнатной температуры и перемешивают 2 дня. Реакционную смесь затем выгружают в делительную воронку, содержащую 120 мл EtOAc, и промывают 2x 1н. HCl (50 мл) и 1X насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над MgSO₄. Растворитель упаривают при пониженном давлении и продукт очищают хроматографией на силикагеле (загружают в DCM, элюируют 30%, затем 50% EtOAc/DCM и затем 2% MeOH/EtOAc), что позволяет собрать образовавшееся соединение clxxxiii (314 мг, 56%).



Пример полупродукта 172. Соединение clxxxiv.

Исходное вещество clxxxiii (314 мг, 0,56 ммоль) растворяют в диоксане (5 мл) и 0,5 M NaOH (3,4 мл, 3 экв.). Реакцию осуществляют в течение ночи. TCX в 100% EtOAc (с применением УФ) свидетельствует о полной конверсии до кислотного продукта на старте с медленной фракцией. Реакционную смесь подкисляют до pH 2 с помощью 1н. HCl и затем экстрагируют 2x EtOAc. К водной фазе добавляют твердый NaCl для усиления экстракции. Органические экстракты затем объединяют, сушат над MgSO₄ и затем упаривают при пониженном давлении, получая соединение clxxxiv (0,5 ммоль, 89%), которое используют на следующей стадии как таковое.

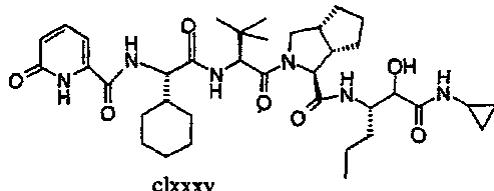


clxxxiv

Пример полупродукта 173. Соединение clxxxv.

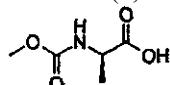
В круглодонной колбе в инертной атмосфере кислотное соединение clxxxiv (265мг, 0,5 ммоль) растворяют в безводном ДМФ (6 мл).Добавляют HOAT (75,6 мг, 0,6 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре 25 мин. Реакционную смесь охлаждают на ледяной бане. Затем добавляют DIC (0,1 мл, 0,6 ммоль) с последующим добавлением соединения xiii' (0,65 ммоль) в безводном ДМФ (4мл). Реакционную смесь оставляют медленно нагреваться до комнатной температуры и переме-

шивают в течение 21 ч. Реакционную смесь затем выгружают в делительную воронку, содержащую EtOAc (120 мл), и промывают 2x 1н. HCl (50 мл) и 1х насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над MgSO₄. Растворитель упаривают при пониженном давлении и продукт очищают хроматографией на силикагеле (загружают в DCM, элюируют 50% EtOAc/гексан, затем чистым EtOAc и затем 4% MeOH/EtOAc), получая продукт, соединение clxxxv (185 мг, 52%).



Пример полупродукта 174. Соединение cxxxxiv'.

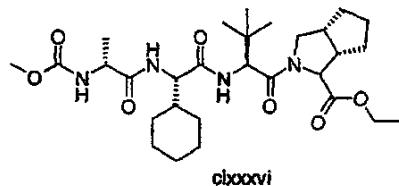
К раствору D-аланина (5 г, 56,1 ммоль) в 1н. NaOH (152 мл, 152 ммоль) при 0°C добавляют раствор MeOC(O)Cl (6,5 мл, 84,2 ммоль) в диэтиловом эфире (30 мл). Смесь перемешивают на ледяной бане в течение 3 ч и затем доводят до pH 9 с помощью 1н. NaOH. После перемешивания при комнатной температуре в течение 1 ч смесь промывают диэтиловым эфиром (3×50 мл), подкисляют до pH ~2 с помощью 5н. HCl, экстрагируют EtOAc (5×50 мл). Органический экстракт промывают водой, насыщенным раствором соли и затем сушат (MgSO₄). Растворитель удаляют, получая соединение cxxxxiv, N-метоксикарбонил-D-аланин, в виде бесцветного масла (6,48 г, 79%).



cxxxxiv

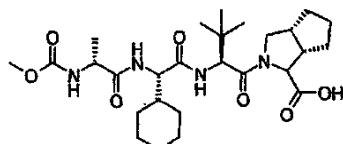
Пример полупродукта 175. Соединение clxxxvi.

Раствор N-метоксикарбонил-D-аланина (0,193 г, 1,31 ммоль) и HOAt (0,177 г, 1,31 ммоль) в DCM (10 мл), охлажденный на ледяной бане, обрабатывают DCC (1,31 мл, 1,31 ммоль). После перемешивания на ледяной бане в течение 0,5 ч добавляют раствор полученного соединения clxxxii (0,88 ммоль) ТГФ (8,8 мл). Смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение ночи, затем охлаждают на ледяной бане и гасят насыщенным раствором NaHCO₃. Выпавшие осадки фильтруют и фильтрат поглощают EtOAc (100 мл). Органический слой промывают насыщенным раствором NaHCO₃, насыщенным раствором соли и затем сушат (MgSO₄). После удаления растворителя остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (60% EtOAc/гексан), получая соединение clxxxvi в виде смолистой пены (0,321 г, 68%).



Пример полупродукта 176. Соединение clxxxvii.

К раствору соединения clxxxvi (0,321 г, 0,597 ммоль) в EtOH (5 мл) при 5°C добавляют 2н. NaOH (1,05 мл, 2,1 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч. Раствор подкисляют до pH ~2 с помощью 1н. HCl и EtOH удаляют упариванием на роторном испарителе. Смесь экстрагируют EtOAc (3×30 мл) и объединенный экстракт промывают насыщенным раствором соли и затем сушат (MgSO₄). Растворитель удаляют и остаток сушат в вакууме, получая соединение clxxxvii в виде смолистой пены (0,235 г, 77%).



clxxxvii

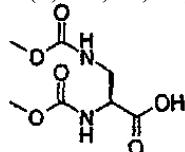
Пример полупродукта 177. Соединение clxxxviii.

Раствор соединения clxxxvii (0,363 г, 0,712 ммоль) в DCM (10 мл) охлаждают на ледяной бане и обрабатывают PyBOP (0,594 г, 1,14 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 0,5 ч смесь охлаждают на ледяной бане и обрабатывают раствором соединения xiii' (1,1 ммоль) в ТГФ (11 мл) и DIPEA (0,249 мл, 1,42 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и гасят раствором TPC1. Растворитель концентрируют и смесь поглощают EtOAc (100 мл). Органический слой промывают насыщенным раствором NaHCO₃, насыщенным раствором соли и затем сушат (MgSO₄). После удаления растворителя остаток очищают хроматографией на колонке (5% EtOH/EtOAc), получая

clxxxviii (0,341 г, 71%).

Пример полупродукта 178. Соединение clxxxix.

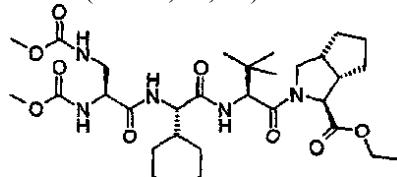
Диаминопропионовую кислоту (3 г, 28,7 ммоль) поглощают 1М NaOH (86,2 мл, 86,2 ммоль), охлаждают до 0°C и затем добавляют MeOC(O)Cl (5,54 мл, 71,75 ммоль) в Et₂O (25 мл). Полученную смесь перемешивают в течение ночи при нагревании до комнатной температуры. Снижают pH реакционной смеси до 2 и водный слой экстрагируют 3х EtOAc. Экстракты объединяют, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют, получая соединение clxxxix (3,09 г, 48,9%).



clxxxix

Пример полупродукта 179. Соединение cc.

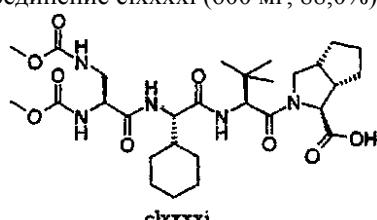
Соединение clxxxix (340 мг, 1,55 ммоль) поглощают DCM (4 мл).Добавляют DCC (1,7 ммоль) и HOAt (235 мг, 1,7 ммоль) с последующим добавлением соединения clxxxii (1,7 ммоль) в DCM (3,4 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи. На следующий день реакционную смесь фильтруют через рыхлый слой диоксида кремния и концентрируют. Очистку осуществляют в смеси 75% EtOAc/тексан, получая соединение clxxxx (715 мг, 72,4%).



clxxxx

Пример полупродукта 180. Соединение clxxxxi.

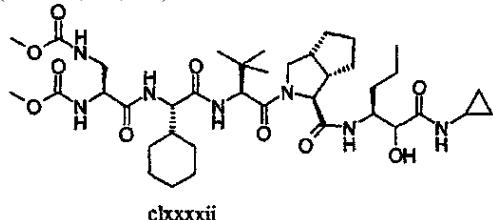
Соединение clxxxx (715 мг, 1,12 ммоль) гидролизуют в стандартных условиях, используя EtOH (4 мл) и 1н NaOH (3 экв.), получают соединение clxxxxi (600 мг, 88,0%).



clxxxxi

Пример полупродукта 181. Соединение clxxxxii.

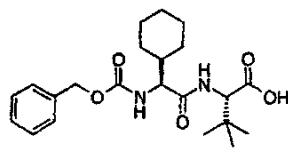
Соединение clxxxxi (550 мг, 0,9 ммоль) поглощают DCM (8 мл).Добавляют PyBOP (675 мг, 1,3 ммоль) с последующим добавлением соединения xiii' (1,3 ммоль) в ТГФ (1,3 мл).Добавляют DIPEA (0,23 мл, 1,3 ммоль) и образовавшийся раствор перемешивают в течение ночи. На следующий день реакционную смесь разбавляют EtOAc, промывают насыщенным NaHCO₃ и затем насыщенным раствором соли, затем концентрируют, получая остаток. Полученный остаток очищают, используя 5% EtOH/EtOAc, и получают соединение clxxxxii (290 мг, 41,5%).



clxxxxii

Пример полупродукта 182. Соединение clxxxxiii.

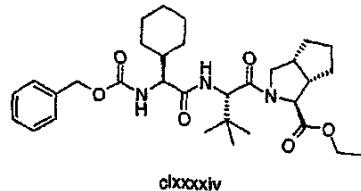
Метиловый эфир Cbz-циклогексилглицин-трет-лейцина (7,36 г, 17,6 ммоль) гидролизуют в стандартных условиях, используя MeOH (60 мл) и 1н. NaOH (52,8 мл, 3 экв.), и получают промежуточное соединение clxxxxiii (92%).



clxxxxiii

Пример полу продукта 183. Соединение clxxxxiv.

Соединение clxxxxiii (3,82 г, 9,46 ммоль) поглощают DCM (30 мл). Добавляют DCC (11,35 ммоль) в DCM (11,35 мл), с последующим добавлением HOAt (1,54 г, 11,35 ммоль). Полученную смесь перемешивают 5 мин и добавляют соединение v (9,46 ммоль) в ТГФ (40 мл). Полученную смесь перемешивают в течение ночи. На следующий день реакционную смесь разбавляют EtOAc, промывают 1н. HCl, насыщенным NaHCO₃ и затем насыщенным раствором соли, затем концентрируют, получая остаток. Полученный остаток очищают на силикагеле при градиенте 20-30%, получая соединение clxxxxiv (3,03 г, 56,3%).



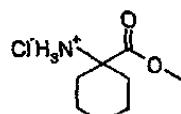
clxxxxiv

Пример полу продукта 183. Соединение clxxxii.

Соединение clxxxxiv (3,03 г, 5,33 ммоль) гидрируют, используя 10% Pd/C (500 мг) в MeOH (30 мл), в атмосфере H₂ в течение 4 ч, получая соединение clxxxii (2,3 г, 99%).

Пример полу продукта 184. Соединение clxxxxv.

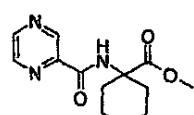
К раствору 1-амино-1-циклогексанкарбоновой кислоты (2,86 г, 20 ммоль) в MeOH (40 мл) добавляют по каплям SOCl₂ (3 мл) при 0°C. Смесь медленно нагревают до комнатной температуры и затем кипятят с обратным холодильником в течение 5 ч. Затем к прозрачному раствору добавляют Et₂O и отделяют осадок. Твердый продукт дополнительно сушат в вакууме, получая соединение clxxxxv (95%) в виде белого порошка.



clxxxxv

Пример полу продукта 185. Соединение clxxxxvi.

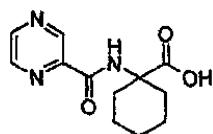
2-Пиразинкарбоновую кислоту (1 г, 8 ммоль, 1 экв.) растворяют в DCM (15 мл), добавляя HOAt (1,1 г, 8 ммоль) и DCC (8 мл, 1 М) в DCM. После перемешивания при комнатной температуре в течение 20 мин к активированной смеси добавляют соединение clxxxxv (1,3 г, 8 ммоль). Затем добавляют DIPEA (2 мл, 12 ммоль) с последующим добавлением DMAP (1,5 г, 12 ммоль). После перемешивания в течение 3 дней при комнатной температуре реакционную смесь фильтруют через целик, концентрируют и очищают хроматографией на колонке (50% EtOAc/гексан), получая требуемый продукт clxxxxvi в виде желтого масла (2,1 г, 100%).



clxxxxvi

Пример полу продукта 186. Соединение clxxxxvii.

Соединение clxxxxvi (1,06 г, 2,6 ммоль) растворяют в MeOH (30 мл) с добавлением 2н. NaOH (водн.) (12 мл, 24 ммоль). Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, до тех пор пока TCX (50% EtOAc/гексан) не укажет на полноту гидролиза. Затем раствор подкисляют до pH 3 с помощью 5н. HCl, разбавляют EtOAc и затем экстрагируют органический слой. Органический слой промывают затем насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, получая концентрированием соединение clxxxxvii (84%).

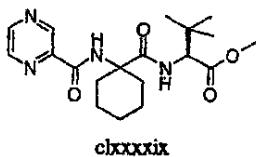


clxxxxvii

Пример полу продукта 187. Соединение clxxxxviii.

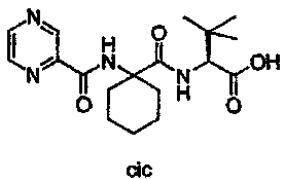
Соединение clxxxxvii (1,6 г, 6,4 ммоль) растворяют в DCM (18 мл) и затем последовательно добавляют HOAt (0,96 г, 7 ммоль) и DCC (7 мл, 1М в DCM) при комнатной температуре. После перемешивания при комнатной температуре в течение 20 мин к активированной смеси добавляют гидрохлорид метилового эфира L-трет-лейцина (7 мл, 1М в ТГФ). Затем добавляют DIPEA (1,2 мл, 7 ммоль) с последующим добавлением DMAP (1,2 г, 9,8 ммоль). После перемешивания в течение 3 дней при комнатной температуре реакционную смесь фильтруют через целик, очищают хроматографией на колонке и концен-

тириуют, получая соединение clxxxviii (60% EtOAc/гексан) в виде белого твердого вещества (1,74 г, 72%).



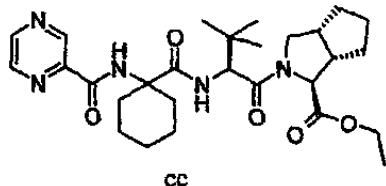
Пример полупродукта 188. Соединение cис.

Соединение clxxxviii (1,74 г, 4,6 ммоль) растворяют в MeOH (22 мл) с добавлением 2н NaOH (водн.) (7 мл, 14 ммоль). Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, до тех пор пока TCX (50% EtOAc/гексан) не укажет на полноту гидролиза. Раствор подкисляют до pH 3 с помощью 5н. HCl, разбавляют EtOAc и затем органический слой экстрагируют. Органический слой промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄ и затем концентрируют, получая соединение cис (100%).



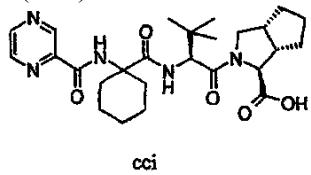
Пример полупродукта 189. Соединение сес.

К DCM раствору (15 мл) соединения cis (1,5 г, 4,1 ммоль) при комнатной температуре добавляют HOAt (610 мг, 4,5 ммоль), с последующим добавлением 1 М раствора DCC в DCM (4,5 мл, 4,5 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре добавляют ТГФ раствор (20 мл, 0,2 М) соединения v (4 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Затем реакционную смесь фильтруют через целит. Фильтрат концентрируют до желтого масла, которое очищают хроматографией на силикагеле (50% EtOAc/гексан), получая соединение cес (660 мг, 32%).



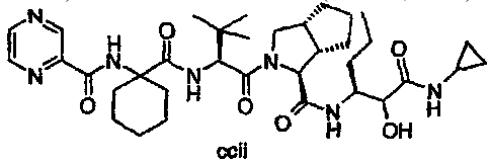
Пример полупродукта 190. Соединение cси.

К EtOH раствору (6 мл) соединения cес (600 мг, 1,13 ммоль) добавляют 2н. NaOH (1,7 мл, 3,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре, затем подкисляют до pH 3 с помощью 5н. HCl. Затем смесь разбавляют EtOAc с последующей экстракцией органического слоя. Затем органический слой промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₃, получая после концентрирования соединение cси (92%).



Пример полупродукта 191. Соединение cсii.

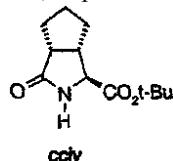
К DCM раствору (8 мл) cси (310 мг, 0,62 ммоль) добавляют PyBOP (420 мг, 0,8 ммоль). Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин. К указанному раствору затем добавляют соединение xii' (8 мл, 0,1 М) в ТГФ, с последующим добавлением DIPEA (0,23 мл, 1,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем гасят водой (25 мл) в течение 30 мин. Затем смесь экстрагируют EtOAc. Полученный органический слой промывают насыщенным раствором соли и сушат над MgSO₄, затем концентрируют, получая желтое масло. Очистка хроматографией на силикагеле (3% EtOH/EtOAc) дает соединение cсii (140 мг, 33%).



Пример полупродукта 192. Соединение cсxiiv.

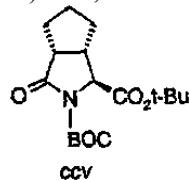
К раствору соединения cсii, трет-бутилового эфира (N-дифенилметилен)глицина, (6 г, 0,0206 ммоль) и хирального РТС (1,08 г, 0,00206 ммоль) в сухом DCM (48 мл), в атмосфере N₂, при -60°C, до-

бавляют CsOH·H₂O (6,9 г, 0,0412 ммоль). К реакционной смеси добавляют по каплям метиловый эфир 1-карбокси-1-цикlopентена (5,2 мл, 0,0412 ммоль) в 10 мл DCM. Смесь перемешивают в течение 4 дней при -60°C, затем разбавляют 200 мл Et₂O и добавляют 15 мл насыщенного водного раствора NH₄Cl. Фазы разделяют и органическую фазу промывают 15 мл воды и 15 мл насыщенного раствора соли. Водные фазы экстрагируют 100 мл Et₂O. Органические фазы объединяют и сушат над Na₂SO₄. Неочищенный продукт, полученный удалением растворителя, растворяют в 100 мл EtOH и затем добавляют NH₂OH·HCl (1,43 г, 0,0206 ммоль) и NaOAc (1,68 г, 0,0206 ммоль). Смесь нагревают до температуры кипения с обратным холодильником в течение 48 ч. Затем растворитель удаляют и полученный неочищенный остаток непосредственно очищают фланш хроматографией, элюируя смесью 30-50% EtOAc/гексан, получая соединение cciv (65%) в виде белого твердого вещества. C₁₂H₁₉NO₃ (MM=225,29); MC: m/z (M⁺)=226,5. Энантиомерный избыток: 18% ee, определен хиральной ВЭЖХ.



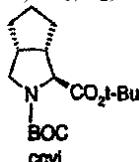
Пример полупродукта 193. Соединение ccv.

К раствору соединения cciv (2 г, 0,0088 ммоль) в 60 мл ACN добавляют катализическое количество DMAP (0,216 г, 0,0017 ммоль) и раствор ди-трет-бутилдикарбоната (2,49 г, 0,011 ммоль) в 30 мл ACN. Смесь перемешивают в течение 14 ч при комнатной температуре, затем разбавляют 100 мл DCM и промывают насыщенным NaHCO₃ (10 мл) и насыщенным раствором соли (10 мл). Органическую фазу сушат над Na₂SO₄. Упаривание растворителя дает неочищенный продукт, который очищают на колонке с силикагелем, элюируя смесью 15% EtOAc/гексан, что дает соединение ccv (86%) в виде белого твердого вещества. C₁₇H₂₇NO₅ MM=325,40 MC: m/z (M⁺)=326,2



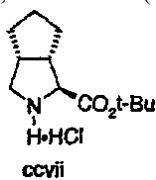
Пример полупродукта 194. Соединение ccvi.

К раствору соединения ccv (1,7 г, 0,0052 ммоль) в 50 мл ТГФ (0,14 М) при -78°C добавляют DIBAL-H (7,8 мл, 0,0078 ммоль). Смесь перемешивают в течение 1 ч, затем добавляют 10 мл MeOH. Смесь разбавляют 25 мл EtOAc и 25 мл насыщенного водного раствора тартрата натрия и затем перемешивают при комнатной температуре один час. Фазы разделяют и водную фазу однократно экстрагируют 50 мл EtOAc. Органические фазы объединяют и сушат над Na₂SO₄. Упаривание растворителя дает неочищенный остаток, который используют без очистки. Неочищенный продукт растворяют в 25 мл DCM, добавляют Et₃Si (0,84 мл, 0,0052 ммоль) и смесь охлаждают до -78°C, затем добавляют по каплям BF₃OEt₂ (0,71 мл, 0,0061 ммоль). Спустя 30 мин добавляют Et₃Si (0,84 мл) и BF₃OEt₂ (0,71 мл) и смесь перемешивают в течение 2 ч при -78°C. Реакционную смесь гасят насыщенным водным NaHCO₃ (10 мл) и экстрагируют DCM (2×20 мл). Органические фазы объединяют и сушат над Na₂SO₄. Упаривание растворителя дает неочищенный остаток, который очищают фланш хроматографией, элюируя 13% смесью EtOAc/гексан, и получают соединение ccvi (87%). C₁₇H₂₉NO₄ MM=311,42 MC: m/z (M⁺)=312,6.



Пример полупродукта 195. Соединение ccvii.

Соединение ccvi (0,5 г, 0,0016 ммоль) растворяют в 8 мл раствора 1н. HCl в EtOAc (получен барботированием HCl через сухой EtOAc с последующим разбавлением до 1н добавлением EtOAc). Смесь перемешивают 6 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляют в вакууме и полученный осадок растворяют в Et₂O. После перемешивания смеси в течение 15 мин растворитель удаляют при пониженном давлении. Полученное белое твердое вещество промывают Et₂O и соединение ccvii (0,27 г, 80% выход) отделяют фильтрованием. C₁₂H₂₁NO₂ MM 211,15 MC: m/z (M⁺)=212,6.

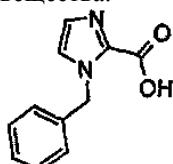


Пример полупродукта 196. Соединение v.

К раствору соединения ccxvi (0,230 г, 0,74 ммоль) в DCM (3,7 мл) добавляют TFA (2,85 мл). Смесь перемешивают в течение ночи, затем растворитель удаляют в вакууме досуха и остаток растворяют в EtOH (7,5 мл). Смесь охлаждают до 0°C, добавляют по каплям SOCl₂ (0,22 мл, 2,96 ммоль) и затем кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч. EtOH удаляют при пониженном давлении и остаток растворяют в DCM (10 мл). Образовавшийся раствор промывают дважды насыщенным водным раствором NaHCO₃ (5 мл). Фазы разделяют, органическую фазу сушат над Na₂SO₄ и растворитель удаляют в вакууме, получая соединение v (80 %) в виде масла. C₁₀H₁₁NO₂ MM : 183,25, MC: m/z (M⁺+1)=184,2.

Пример полупродукта 197. Соединение cd.

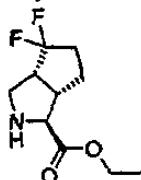
1-Бензилимидазол (6 г, 37,9 ммоль) поглощают Et₂O (180 мл). Образовавшийся раствор охлаждают до -60°C и обрабатывают n-BuLi (1,6 М, 24 мл). Реакционную смесь перемешивают 30 мин и затем через смесь барботируют CO₂ в течение 15 мин. Осадок фильтруют, промывают Et₂O и затем поглощают H₂O. Полученный водный раствор подкисляют до pH 3 с помощью 5н. HCl. Требуемый продукт, cd, выделяют после лиофилизации в виде белого твердого вещества.



cd

Пример полупродукта 198. Соединение cdi.

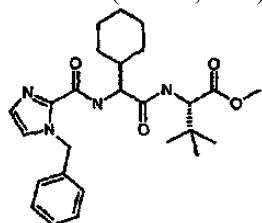
DCM раствор (100 мл) соединения i (9,25 г, 27,9 ммоль) обрабатывают при 0°C DAST (9,2 мл, 69,8 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакционную смесь резко охлаждают льдом и экстрагируют DCM (200 мл). Органический слой промывают насыщенным раствором соли и концентрируют в вакууме. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (30% EtOAc/гексан) и получают 8,5 г (86%) требуемого фторированного промежуточного соединения. Часть полученного промежуточного соединения (4,5 г, 14,2 ммоль) растворяют в EtOH (75 мл). Образовавшийся раствор гидрируют в стандартных условиях, используя Pd(OH)₂/C (2,98 г, 20% Pd содержание, 4,26 ммоль). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре реакционную смесь фильтруют через целин. Фильтраты концентрируют в вакууме, получая соединение cdi (2,5 г, 96%).



cdi

Пример полупродукта 199. Соединение cdii.

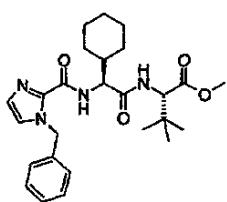
Раствор соединения cd (890 мг, 4,4 ммоль) поглощают DCM (15 мл). Добавляют НОВТ (595 мг, 4,4 ммоль) и DCC (4,4 ммоль, 1 М в DCM) и перемешивают в течение 20 мин. К указанной смеси добавляют DCM раствор (15 мл) lxxix' (990 мг, 3,5 ммоль). Полученную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере азота. Реакционную смесь разбавляют EtOAc, промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Органический слой концентрируют в вакууме, получая остаток, который очишают в смеси 30% EtOAc/гексан, получая соединение cdii (666 мг, 41%).



cdii

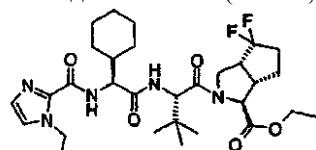
Пример полупродукта 200. Соединение cdiii.

Соединение cdiii получают из соединения cdii в стандартных условиях гидролиза, используя метиловый спирт (10 мл) и 1н. NaOH (3 экв.). Выделяют 565 мг соединения cdiii (88%).



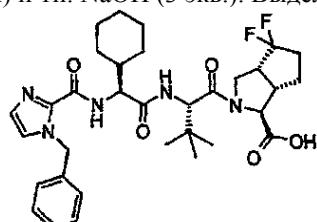
Пример полупродукта 201. Соединение cdiv.

Соединение cdiii (1,24 ммоль) поглощают DCM (5 мл). Добавляют DCC (1,6 ммоль, 1 М DCM) с последующим добавлением HOAT (1,6 ммоль). Полученную смесь перемешивают 20 мин и добавляют по каплям соединение cdi (1,6 ммоль) в ТГФ (8 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи. Реакционную смесь фильтруют и промывают EtOAc. Объединенный органический слой промывают насыщенным NaHCO₃, насыщенным раствором соли, сушат над MgSO₄ и концентрируют. Очистку осуществляют в смеси 30% EtOAc/гексан, получая соединение cdv (565 мг, 70%).



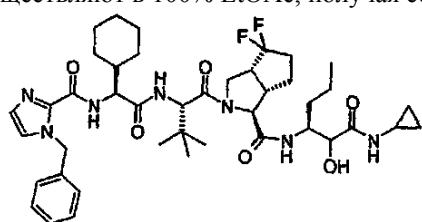
Пример полупродукта 202. Соединение cdv.

Соединение cdv (565 мг, 0,86 ммоль) получают из соединения cdiii в стандартных условиях гидролиза, используя этиловый спирт (10 мл) и 1н. NaOH (3 экв.). Выделяют 490 мг (91%) соединения cdv.



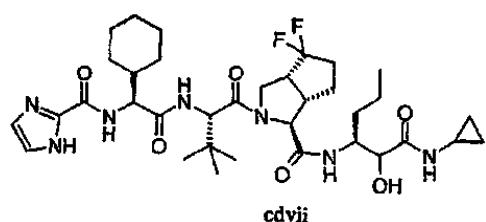
Пример полупродукта 203. Соединение cdvi.

Соединение cdv (490 мг, 0,78 ммоль) поглощают DCM (10 мл). К DCM раствору добавляют PyBOP (520 мг, 1 ммоль) с последующим добавлением ТГФ раствора (10 мл) xiii (186 мг, 1 ммоль). К реакционной смеси добавляют DIEA (0,18 мл, 1 ммоль) и перемешивают в течение ночи в атмосфере азота. На следующий день реакционную смесь разбавляют EtOAc, промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Очистку осуществляют в 100% EtOAc, получая соединение cdvi (478 мг, 77%).



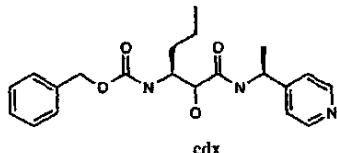
Пример полупродукта 204. Соединение cdvii.

Соединение cdvi (478 мг, 0,6 ммоль) гидрируют, используя Pd(OH)₂/C (20% сухая основа, 100 мг), в MeOH (40 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере водорода. По прошествии указанного времени реакционную смесь фильтруют через целик и концентрируют, получая соединение cdvii (417 мг, 98%).



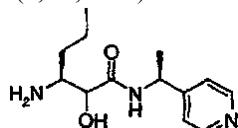
Пример полу продукта 205. Соединение cdx.

Соединение cxxv (поставляемое Albany Molecular Research Inc., 1,5 г, 5,2 ммоль) поглощают DCM (15 мл). К указанному раствору добавляют РуВОР (2,7 г, 5,2 ммоль) и HOST (700 мг, 5,2 ммоль). К указанному выше раствору добавляют ТГФ раствор (15 мл) (-)-альфа-(4-пиридилил)этиламина (640 мг, 5,2 ммоль) с последующим добавлением DIEA (0,93 мл, 5,2 ммоль). [(-)-альфа-(4-пиридилил)этиламин получают из соли, тартрата (-)-альфа-(4-пиридилил)этиламина (Aldrich), перемешиванием с 1н. NaOH (2 экв.) в течение 1 ч и последующей экстракцией EtOAc (3x), 70% извлечение]. Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь промывают насыщенным NaHCO₃ и насыщенным раствором соли. Продукт очищают в 5% смеси EtOH/EtOAc, получая 2 г (99%) промежуточного соединения cdx.



Пример полу продукта 206. Соединение cdviii.

Соединение cdx (2 г, 5,2 ммоль) гидрируют, используя 10% Pd/C (500 мг) в MeOH (50 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи в атмосфере водорода. Продукт фильтруют через целик и концентрируют, получая соединение cdviii (1,3 г, 98%).



Фармакология

Как указано в данном описании, соединения по изобретению полезны благодаря их способности ингибировать протеазу HCV, а следовательно, полезны также для ингибирования репликации HCV.

Следовательно, изобретение касается способа ингибирования протеазы HCV, включающего контактирование анти-HCV-протеаза-ингибиторного количества соединения формулы 1 с композицией, содержащей протеазу HCV.

Кроме того, изобретение касается способа ингибирования репликации HCV, включающего контактирование HCV с эффективным количеством соединения формулы 1.

Далее, изобретение касается способа лечения пациента, страдающего от инфекции HCV или подвергающегося воздействию инфекции HCV, включающего введение пациенту фармацевтически эффективного количества соединения формулы 1. Следует понимать, что ссылки на лечение инфекции HCV включают профилактическую терапию для подавления или остановки инфекции, а также лечение установленного острого или хронического инфекционного заболевания HCV или физиологических состояний, вызванных инфекцией HCV, обеспечивающие, по существу, излечивание пациента от инфекции, сдерживание степени (объема) заражения или улучшение связанных с ним физиологических состояний. Подразумевается, что "эффективное количество" определяет количество соединения по настоящему изобретению, эффективное по разумной биологической оценке, пригодное для использования в контакте с клетками человека или других млекопитающих, не являясь излишне токсичным, не вызывая раздражения, аллергической реакции и тому подобное, и соответствующее разумному соотношению польза/риска при лечении инфекции HCV и, таким образом, обеспечивающее требуемый терапевтический эффект.

Рассматриваемые физиологические состояния включают некоторые, но не все из возможных клинических состояний, при которых анти-HCV лечение является оправданным. Специалистам в данной области хорошо известны обстоятельства, определяющие требуется ли анти-HCV лечение.

Особый аспект изобретения составляет соединение по изобретению для введения в форме фармацевтической композиции, хотя соединение может быть введено и само по себе. "Фармацевтическая композиция" означает композицию, содержащую соединение формулы 1 и по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, включающей: фармацевтически приемлемые носители, разбавители, создающие покрывающие оболочки средства, вспомогательные средства, эксципиенты или средства доставки, такие как консерванты, наполнители, дезинтеграторы, смачивающие средства, эмульгирующие средства, средства стабилизации эмульсии, супенсирующие средства, изотонические агенты, подсладители, корригенты, отдушки, красители, антибактериальные средства, противогрибковые средства, другие терапевтические средства, смазывающие средства, замедлители или промоторы адсорбции и средств доставки, в зависимости от способа введения и дозированных форм. Композиции могут быть представлены в форме таблеток, пилюль, гранул, порошков, водных растворов или супензий, растворов для инъекций, эликсиров или сиропов. Характерные примеры супенсирующих средств включают этоксилированные

изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные сорбитановые эфиры, микрокристаллическую целлюлозу, алюминийметагидроксид, бентонит, агар-агар и трагакант, или смеси указанных веществ. Примеры антибактериальных и противогрибковых средств для предотвращения действия микроорганизмов включают парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту и тому подобное. Характерные примеры изотонических средств включают сахара, хлорид натрия и тому подобное. Характерные примеры замедлителей адсорбции для пролонгирования всасывания включают моностеарат алюминия и желатин. Характерные примеры промоторов адсорбции для усиления всасывания включают диметилсульфоксид и родственные аналоги. Характерные примеры носителей, разбавителей, растворителей, средств доставки, солюбилизирующих средств, эмульгаторов и стабилизаторов эмульсии включают воду, хлороформ, сахарозу, этанол, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, тетрагидрофуриловый спирт, бензилбензоат, полиолы, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, глицерин, полиэтиленгликоли, диметилформамид, Tween® 60, Span® 80, цетостеариловый спирт, миристиловый спирт, моностеарат глицерина и натрийлаурильсульфат, сложные эфиры сорбита и жирных кислот, растительные масла (такие как хлопковое масло, арахисовое масло, кукурузное масло, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло) и пригодные для инъекции органические сложные эфиры, такие как этилолеат и тому подобное, или подходящие смеси указанных веществ. Характерные примеры эксципиентов включают лактозу, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат кальция, дикальцийфосфат. Характерные примеры дезинтеграторов включают крахмал, альгиновые кислоты и некоторые комплексные силикаты. Характерные примеры смазывающих средств включают стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк, а также полиэтиленгликоли высокой молекулярной массы.

В комбинации с соединением по настоящему изобретению можно использовать другие терапевтические средства, включая другие анти-HCV средства. Некоторые характерные примеры известных анти-HCV средств включают иммуномодуляторные средства, такие как α -, β - или γ -интерфероны; ПЭГилированные производные соединения интерферона- α , другие противовирусные средства, такие как рибавирин и амантадин; другие ингибиторы протеазы гепатита С; ингибиторы других мишений жизненного цикла HCV, включающих геликазу, полимеразу, металлопротеазу, рибосомы внутреннего проникновения, или противовирусные соединения широкого спектра действия, такие как VX-497, ингибитор клеточной инозинмонофосфатдегидрогеназы, IMPDH, описанные в патенте Соединенных штатов № 5807876; либо их комбинации. Терапевтические средства, используемые в комбинации с соединением по настоящему изобретению, могут быть введены раздельно, одновременно или последовательно.

Выбор материала в фармацевтической композиции, отличного от соединения формулы 1, обычно обусловлен химическими свойствами активного соединения, такими как растворимость, конкретным способом введения и мерами предосторожности, соблюдаемыми в фармацевтической практике. Например, эксципиенты, такие как лактоза, цитрат натрия, карбонат кальция, дикальцийфосфат, и дезинтеграторы, такие как крахмал, альгиновые кислоты и некоторые комплексные силикаты, объединенные со смазывающими средствами, такими как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк, могут быть использованы для получения таблеток.

Фармацевтические композиции могут быть представлены ассортиментом форм, таких как таблетки, пилюли, гранулы, порошки, водные растворы или суспензии, растворы для инъекции, эликсиры и сиропы.

"Жидкая дозированная форма" означает дозу активного соединения, предназначенную для введения пациенту в жидкой форме, например фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как растворители, солюбилизирующие агенты и эмульгаторы.

Твердые композиции могут также быть использованы для заполнения мягких и твердых наполняемых желатиновых капсул с применением таких эксципиентов, как лактоза или молочный сахар, а также полиэтиленгликоли высокой молекулярной массы и тому подобных.

Когда используют водные суспензии, они могут содержать эмульгирующие средства или агенты, способствующие образованию суспензий.

Масляная фаза эмульсионной фармацевтической композиции может быть составлена из известных ингредиентов известными способами. Хотя фаза может включать только вещество, способствующее эмульгированию (иначе называемое эмульгатором), предпочтительно фаза включает смесь из, по меньшей мере, одного эмульгатора с жиром или маслом, либо как с жиром, так и с маслом. Предпочтительно, гидрофильный эмульгатор включают вместе с липофильным эмульгатором, действующим как стабилизатор. Предпочтительно также включать как масло, так и жир. Вместе эмульгатор (эмультгаторы) и стабилизатор (стабилизаторы) составляют пластичный материал, который вместе с маслом и жиром составляет эмульгирующую основу мази, образующую масляную дисперсную фазу композиций в виде крема.

По желанию, водная фаза основы крема может включать, например по меньшей мере 30% мас./мас. многоатомного спирта, т.е. спирта с двумя или более гидроксильными группами, такого как пропиленгликоль, бутан-1,3-диол, маннит, сорбит, глицерин и полиэтиленгликоль (включая ПЭГ 400) и их смеси.

Композиции местного применения предпочтительно включают соединение, которое усиливает всасывание или проникновение активного ингредиента через кожу или другие пораженные участки.

Выбор подходящих масел или жиров для композиции основан на достижении требуемых косметических свойств. Так, крем должен предпочтительно быть не жирным, не оставляющим пятна и смыываемым продуктом с подходящей консистенцией, не допускающей вытекания из тюбиков или других контейнеров. Могут быть использованы линейные или разветвленные моно- или двухосновные сложные алкиловые эфиры, такие как дизопропилмиристат, децилолеат, изопропилпальмитат, бутилстеарат, 2-этилгексилпальмитат или смесь разветвленных сложных эфиров, известная как Crodamol CAP. Указанные соединения могут быть использованы по отдельности или в комбинации, в зависимости от требуемых характеристик. Альтернативно, могут быть использованы липиды с высокой температурой плавления, такие как вазелиновое масло и/или вазелин, либо другие минеральные масла.

На практике, соединение/фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены в подходящей композиции человеку или животным путем местного или системного введения, включающего пероральное, ингаляционное, ректальное, назальное, буккальное, подъязычное, вагинальное, введение в толстую кишку, парентеральное (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное, внутрикожное, подоболочечное и эпидуральное), внутриполостное и внутрибрюшинное. Очевидно, что предпочтительный способ введения может меняться в зависимости, например, от состояния реципиента.

"Фармацевтически приемлемые дозированные формы" означают дозированные формы соединения по изобретению и включают, например, таблетки, драже, порошки, эликсиры, сиропы, жидкие препараты, включая супспензии, спреи, таблетки для ингаляции, лепешки, эмульсии, растворы, гранулы, капсулы и суппозитории, а также жидкие препараты для инъекций, включая липосомные препараты. Методики и рецептура могут обычно быть взяты из Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition.

"Композиции, подходящие для перорального введения" могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, облатки или таблетки, каждая из которых содержит заранее рассчитанное количество активного ингредиента; как порошок или гранулы; как раствор или супспензия в водной жидкости или неводной жидкости; или как жидккая эмульсия по типу масло-в-воде или жидккая эмульсия по типу вода-в-масле. Активный ингредиент может также быть представлен в виде болюса, электуария или пасты.

Таблетка может быть получена прессованием или формованием, необязательно, с одним или более вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены прессованием в подходящей машине активного ингредиента в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанного со связующим, смазывающим агентом, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным или диспергирующим агентом. Формованные таблетки могут быть получены формированием в подходящей машине смеси порошкообразных соединений, увлажненных инертным жидким разбавителем. Таблетки могут быть, необязательно, покрыты оболочкой или разделены бороздками и могут быть составлены так, чтобы обеспечивалось замедленное или регулируемое высвобождение активного ингредиента.

Твердые композиции для ректального введения включают суппозитории, составленные известными способами и содержащие по меньшей мере одно соединение по изобретению.

По желанию и для более эффективного распределения соединения могут быть микроКапсулированы в системах доставки замедленного высвобождения или мишененаправленных системах доставки, либо соединены с указанными системами, такими как биосовместимые биоразлагаемые полимерные матрицы (например, поли(d,l-лактид со-гликолид)), липосомы и микросфера, подкожно или внутримышечно впрыскиваемые способом, называемым подкожное или внутримышечное депо, обеспечивающим непрерывное замедленное высвобождение соединения (соединений) в течение 2 недель или дольше. Соединения могут быть стерилизованы, например, путем фильтрования через бактериальный фильтр или путем включения стерилизующих средств в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены в стерильной воде или некоторой другой стерильной, пригодной для инъекции среде непосредственно перед применением.

"Композиции, подходящие для назального введения или введения путем ингаляции" означают композиции, находящиеся в форме, пригодной для введения пациенту через нос или путем ингаляции. Композиция может содержать носитель, в форме порошка, с размером частиц, например, в пределах 1-500 микрон (включая размеры частиц в пределах 20-500 мкм с приращением в 5 мкм, такие как 30 мкм, 35 мкм и т.д.). Подходящие композиции, где носитель является жидким, для введения в качестве, например, назального спрея или капель для носа, включают водные или масляные растворы активного ингредиента. Композиции, подходящие для аэрозольного введения, могут быть получены общепринятыми способами и могут доставляться с другими терапевтическими средствами. Ингаляционную терапию легко осуществлять с помощью ингаляторов с отмеряемыми дозами.

"Композиции, подходящие для перорального введения" означают композиции, находящиеся в форме, пригодной для введения пациенту через рот. Композиции могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, лепешки или таблетки, каждая из которых содержит заранее рассчитан-

ное количество активного ингредиента; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной жидкости или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или жидкой эмульсии вода-в-масле. Активный ингредиент может также быть представлен в виде болюса, электуария или пасты.

"Композиции, подходящие для парентального введения" означают композиции, находящиеся в форме, пригодной для введения пациенту, минуя пищеварительный тракт. Композиции являются стерильными и включают эмульсии, суспензии, водные и неводные растворы для инъекций, которые могут содержать супендирующие средства и загустители, а также антиоксиданты, буферные растворы, бактериостатические факторы и растворенные вещества, делающие композицию изотонической и имеющие pH, приведенный в соответствие с кровью предполагаемого реципиента.

"Композиции, подходящие для ректального или вагинального введения" означают композиции, находящиеся в форме, пригодной для введения пациенту прямокишечно или через влагалище. Композиция предпочтительно находится в форме суппозиториев, которые могут быть получены смешиванием соединений по настоящему изобретению с подходящими, не вызывающими раздражение эксципientами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или воск для суппозиториев, являющихся твердыми при обычной температуре, но жидкими при температуре тела, и, поэтому, плавящимися в прямой кишке или влагалище и высвобождающими активный компонент.

"Композиции, подходящие для системного введения" означают композиции, находящиеся в форме, пригодной для общего введения в организм пациента. Композицию предпочтительно вводят путем инъекции, включая внутримышечную, внутривенную, внутрибрюшинную и подкожную. Для инъекции соединения по изобретению составляют в жидкие растворы, предпочтительно в физиологически совместимые буферные растворы, такие как раствор Хенке или раствор Рингера. В дополнение, соединения могут быть составлены в твердой форме и повторно растворены или супензированы непосредственно перед применением. Включаются также лиофилизованные формы. Системное введение может также быть выполнено введением трансмукозальным или трансдермальным способами, либо соединение может быть введено перорально. Для введения через слизистую оболочку или через кожу в композиции используют пенетранты, способствующие проникновению через барьер вещества. Такие пенетранты обычно известны в данной области и включают, например, соли желчной кислоты и производные фусидовой кислоты для введения через слизистую оболочку. В дополнение, для усиления проникновения могут быть использованы детергенты. Трансмукозальное введение может быть произведено, например, путем применения спреев для носа или суппозиториев. Для перорального введения соединения составляют в общепринятые для перорального введения формы, такие как капсулы, таблетки и тоники.

"Композиции, подходящие для местного применения" означают составы, находящиеся в форме, пригодной для местного введения пациенту. Композиция для местного применения может быть представлена в виде мази, бальзамов, порошков, спреев и ингаляций, гелей (на водной и спиртовой основе), кремов, в том виде, как они известны в данной области, либо включенных в матриксную основу для нанесения на пластырь, что позволяет регулируемое высвобождение соединения через трансдермальный барьер. При составлении мази активные ингредиенты могут быть использованы с мазевой основой, либо парафиновой, либо смешиваемой с водой. Альтернативно, активные ингредиенты могут быть составлены в крем с основой для крема по типу масло-в-воде. Композиции, подходящие для местного введения в глаз, включают глазные капли, где активный ингредиент растворен или супензирован в подходящем носителе, в особенности, водном растворителе для активного ингредиента. Композиции, подходящие для местного введения через рот, включают лепешки, содержащие активный ингредиент в ароматизированных основах, обычно сахаре и аравийской камеди или трагаканте; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин, или сахароза и аравийская камедь; и полоскания для рта, включающие активный ингредиент в подходящем жидким носителе.

"Твердая дозированная форма" означает, что дозированная форма соединения по изобретению является твердой, например капсулы, таблетки, пилюли, порошки, драже или гранулы. В таких твердых дозированных формах соединение по изобретению является смешанным по меньшей мере с одним обычным инертным эксципientом (или носителем), таким как цитрат натрия или дикальцийфосфат, или (a) наполнителями или сухими разбавителями, как, например, крахмал, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, (b) связующими веществами, например, карбоксиметилцеллюлозой, альгинатами, желатином, поливинилпирролидоном, сахарозой или аравийской камедью, (c) увлажнятелями, как например, глицерин, (d) дезинтегрирующими средствами, как, например, агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или тапиока, альгиновая кислота, некоторые комплексные силикаты и карбонат натрия, замедлителями растворения, как, например, парафин, (f) ускорителями всасывания, как, например, четвертичные аммониевые соединения, (g) смачивающими средствами, как например, цетиловый спирт и глицеринмоностеарат, (h) адсорбентами, как например, каолин и бентонит, (i) смазывающими средствами, как например, тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, (j) веществами, делающими материал непрозрачным, (k) буферными агентами и агентами, высвобождающими соединение (соединения) по изобретению на определенном участке желудочно-кишечного тракта отсроченным способом.

Фактические уровни дозы активного ингредиента (ингредиентов) в композициях по изобретению можно варьировать так, чтобы было получено количество активного ингредиента (ингредиентов), эффективное для получения требуемого терапевтического ответа для отдельного пациента при данной композиции и конкретном способе введения. Следовательно, выбранный для конкретного пациента уровень дозы зависит от ряда факторов, включающих требуемый терапевтический эффект, способ введения, требуемую длительность лечения, этиологию и тяжесть заболевания, состояние пациента, массу, пол, диету и возраст, тип и эффективность каждого активного ингредиента, скорость всасывания, метаболизм и экскрецию, и другие факторы.

Суммарная суточная доза соединений по данному изобретению, вводимая пациенту в виде разовых или разделенных доз, может составлять, например, приблизительно от 0,001 до 100 мг/кг массы тела ежедневно и предпочтительно 0,01-10 мг/кг/день. Например, для взрослого, дозы обычно составляют приблизительно от 0,01 до 100, предпочтительно приблизительно 0,01-10 мг/кг массы тела в день при ингаляции, приблизительно от 0,01 до 100, предпочтительно приблизительно 0,1-70, в особенности 0,5-10 мг/кг массы тела в день при пероральном введении и приблизительно от 0,01 до 50, предпочтительно приблизительно 0,01-10 мг/кг массы тела в день при внутривенном введении. Процент активного ингредиента в композиции может меняться, считается, что он должен составлять такую долю, чтобы можно было получить подходящую дозу. Дозированные единичные композиции могут содержать такое количество дозированных единиц, какое может быть использовано для получения суточной дозы. Обычно несколько единичных дозированных форм может быть введено почти одновременно. Дозу можно вводить так часто, как это необходимо для получения требуемого терапевтического эффекта. Некоторые пациенты могут реагировать быстро на большую или меньшую дозу, и следует выбрать значительно более слабые достаточные поддерживающие дозы. Для других пациентов может быть необходимо долговременное лечение при норме 1-4 дозы в день, согласно физиологическим потребностям каждого отдельного пациента. Само собой разумеется, что иным пациентам потребуется прописать не более одной или двух доз в день.

Композиции могут быть получены в единичной дозированной форме любым из хорошо известных в области фармации способов. Такие способы включают стадию объединения активного ингредиента с носителем, состоящим из одного или более вспомогательных ингредиентов. Обычно составы получают равномерным и однородным смешиванием активного ингредиента с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями, либо с тем и другим, а затем, при необходимости, формированием продукта.

Композиции могут быть представлены в контейнерах с единичной или многократной дозой, например, запаянных ампулах или пузырьках с резиновыми крышками, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекции, непосредственно перед применением. Приготовленные для немедленной инъекции растворы или суспензии могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток указанного выше типа.

Соединения, охватываемые объемом настоящего изобретения, обладают значительной фармакологической активностью согласно испытаниям, описанным в литературе и приведенным ниже, причем результаты испытаний считаются коррелируемыми с фармакологической активностью в организмах человека и других млекопитающих.

Методика ферментного анализа *in vitro*

Ингибиование NS3 сериновой протеазы HCV

Домен NS3 протеазы HCV экспрессируют и очищают как описано ранее (Vertex, опубликованная РСТ заявка WO 98/17679; включенная в данное описание в качестве ссылки). Хромогенный пептидный субстрат, EDWAbuC-п-нитроанилид, и фрагмент кофактора NS4A (-KKGSWIVGRIVLSK-) для NS3 протеазы синтезированы на заказ American Peptide Com (Ca). Соединения по изобретению исследуют на их способность ингибиовать активность NS3 протеазы HCV, используя спектрофотометрический анализ и EDWAbuC-п-нитроанилид в качестве субстрата. Испытание проводят в 96-луночном планшете для микротитрования, используя SpectraMax 250 считающее устройство (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), обеспечивающее возможность измерения кинетических параметров. Расщепление EDWAbuC-п-нитроанилидного (500 мкМ) субстрата с помощью очищенной NS3 протеазы HCV (0,5 мкМ) проводят при 30°C в буферном растворе, содержащем 30 мкМ фрагмента NS4A, 46 мМ Hepes, pH 8,0, 92 мМ NaCl, 18% глицерина, 5 мМ DTT и 7,5% ДМСО, в отсутствии или в присутствии испытуемого соединения. Реакцию контролируют по высвобождению pNA (п-нитроанилина) при 405 нм.

Определение кинетических параметров, включающих V_{max} , K_m и V_{max}/K_m , проводят в указанных выше условиях. Значения K_i рассчитывают из графика зависимости скорости от концентрации ингибитора, при фиксированных концентрациях фермента и субстрата, путем нелинейной подгонки данных методом наименьших квадратов по уравнению Моррисона для конкурентного ингибиования сильного связывания [J. F. Morrison, Biochim. Biophys. Acta., 185, 269-286 (1969)]. Для этой цели используют Prism программу (GraphPad Software, Inc.).

Описываемые ингибиторы сериновой протеазы HCV могут быть использованы в комбинации с дру-

гими молекулами, которые непосредственно обладают анти-HCV активностью или опосредованно проявляют анти-HCV активность, либо для профилактического лечения пациентов при риске заражения инфекцией HCV, либо для лечения уже заразившихся пациентов. Термин "анти-HCV активность" означает способность молекулы, в случае наличия, полностью ингибиовать или снижать накопление вирионов HCV по сравнению с накоплением вирионов HCV в отсутствии такой молекулы, и/или способность молекулы облегчать состояния или уменьшать интенсивность симптомов, связанных с инфекцией HCV или патогенезом у пациентов. Молекулы, обладающие анти-HCV активностью, включают такие молекулы, которые нарушают одну или более стадий развития инфекции HCV или репликации, а также такие, которые вызывают иммуномодулирующие и антипролиферативные эффекты в клетках "хозяина". Молекулы, обладающие анти-HCV активностью, могут ингибиовать HCV-специфические репликативные события, такие как, но, не ограничиваясь ими, HCV-направленный синтез нуклеиновой кислоты или белка. Стадии репликации HCV, на которых могут действовать молекулы, обладающие анти-HCV активностью, могут включать проникновение в клетку (например, прикрепление, проникновение); декапсидацию и высвобождение генома HCV; репликацию генома HCV (например, репликацию вирусного генома РНК или цепи вирусного генома РНК; транскрипцию вирусной информационной РНК); трансляцию белков HCV; посттрансляционную модификацию протеинов HCV (например, протеолитическое расщепление; гликозилирование); внутриклеточный транспорт вирусных протеинов; сборку компонентов вириона и высвобождение вирусных частиц (например, отделение дочерней клетки). Классы молекул, обладающих противовирусной активностью, включают, но, не ограничиваясь ими, растворимые рецепторные ловушки и противорецепторные антитела; блокаторы ионных каналов, стабилизаторы капсидов и ингибиторы слитого белка; ингибиторы вирусных полимераз, обратной транскриптазы, геликазы, примазы или интегразы; антисенсорные олигонуклеотиды и рибозимы; иммуномодулирующие и иммуностимулирующие агенты, включающие цитокины, такие как интерфероны, а также белковые агонисты, стероиды и классические лекарства, такие как левамизол; ингибиторы регуляторных белков; ингибиторы протеазы; ингибиторы составного белка; и вируснейтрализующие антитела и цитотоксические лимфоциты. Термин "анти-HCV эффективное количество" или "фармацевтически эффективное количество" означает количество соединения или комбинации указанных выше соединений, эффективное для нормализации или улучшения состояний или уменьшения интенсивности симптомов, вызванных инфекцией HCV или сопутствующим патогенезом у пациентов, или снижения уровней вируса *in vitro* или *in vivo*. Применения *in vitro* включают систему анализа репликона, описанную ниже, где такие количества эффективны для снижения аккумуляции РНК репликона HCV и/или накопления белков, кодируемых составляющими их генами.

Соединения, обладающие анти-HCV активностью, предусмотренные для применения в композициях и способах комбинированной терапии, описываемых в данной заявке, включают, но, не ограничиваясь ими, иммуномодуляторные молекулы, включающие иммуномодулирующие цитокины и другие известные соединения, обладающие противовирусной активностью в отношении HCV, такие как различные противовирусные нуклеозиды и нуклеотиды.

Иммуномодулирующие молекулы, предусмотренные для применения в комбинации с описываемыми ингибиторами сериновой протеазы HCV, включают, но, не ограничиваясь ими, интерферон-альфа 2B (Intron A, Schering Plough); ребатрон (Schering Plough, интерферон-альфа 2B + рибавирин); ПЭГилированный интерферон альфа (Reddy, K.R. et al. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. Hepatology 33, 433-438 (2001)); согласованный интерферон (Kao, J.H., Chen, P.J., Lai, M.Y. & Chen, D.S. Efficacy of consensus interferon in the treatment of chronic hepatitis C. J. Gastroenterol. Hepatol. 15, 1418-1423 (2000)); интерферон-альфа 2A (Roferon A; Roche); лимфобластоидный или "природный" интерферон; интерферон tau (Clayette, P. et al. IFN-tau, a new interferon type I with antiretroviral activity. Pathol. Biol. (Paris) 47, 553-559 (1999)); интерлейкин 2 (Davis, G.L., Nelson, D.R. & Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19, 103-112 (1999)); интерлейкин 6 (Davis, G.L., Nelson, D.R. & Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19, 103-112 (1999)); интерлейкин 12 (Davis, G.L., Nelson, D.R. & Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19, 103-112 (1999)); рибавирин и соединения, усиливающие развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток (Davis, G.L., Nelson, D.R. & Reyes, G.R. Future options for the management of hepatitis C. Seminars in Liver Disease 19, 103-112 (1999)). Интерфероны могут снижать интенсивность вирусных инфекций, оказывая прямые антивирусные действия и/или модифицируя иммунный ответ на инфекцию. Антивирусные действия интерферонов часто опосредованы ингибицией проникновения и декапсидации, синтеза вирусной РНК, трансляции вирусных белков и/или вирусной сборки и высвобождения. Композиции, стимулирующие синтез интерферона в клетках (Tazulakhova, E.B., Parshina, O.V., Gusev, T.S. & Ershov, F.I. Russian Experience in Screening, Analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers. J. Interferon Cytokine Res. 21, 65-73)) включают, но, не ограничиваясь ими, двунитевую РНК, отдельно или в сочетании с тобрамицином, и имиквимод (3M Pharmaceuticals) (Sauder, D.N. Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod. J. Am. Acad. Dermatol. 43, S6-11 (2000)).

Другие известные соединения, обладающие или способные обладать антивирусной активностью в отношении HCV, обусловленной неиммуномодулирующими механизмами, включают, но, не ограничи-

ваясь ими, рибавирин (ICN Pharmaceuticals); ингибиторы инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы (VX-497, разработанные Vertex Pharmaceuticals); амантадин и римантадин (Younossi, A.M. and Perillo, R.P. The roles of amantadine, rimantadine, ursodeoxycholic acid, NSATOs, alone or in combination with alpha interferons, in the treatment of chronic hepatitis C Seminars in Liver Disease 19, 95-102 (1999)); LY217896 (патент США 4835168) (Colacino, J.M. et al Evaluation of the anti-influenza virus activities of 1,3,4-thiadiazol-2-ylcyanamide (LY217896) and its sodium salt. Antimicrobial Agents & Chemotherapy 34, 2156-2163 (1990)) и метиловый эфир 9-гидроксимино-6-метокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоновой кислоты; гидрохлорид метилового эфира 6-метокси-1,4а-диметил-9-(4-метилпиперазин-1-илимино)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоновой кислоты; 1-(2-хлорфенил)-3-(2,2-дифенилэтил)мочевина (патент США 6127422).

Составы, дозировка и способы введения указанных выше молекул либо представлены в приведенных ниже ссылках, либо хорошо известны в данной области, как, например, описано F.G. Hayden, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, Hardman et al., Eds., McGraw-Hill, New York (1996), Chapter 50, pp. 1191-1223 и приведенных там ссылках. Альтернативно, если соединение, обладающее HCV-антивирусной активностью идентифицировано, фармацевтически активное количество такого соединения может быть определено на основании методик, хорошо известных специалисту в данной области. См., например, Benet et al., in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, Hardman et al., Eds., McGraw-Hill, New York (1996), Chapter 1, pp. 3-27 и приведенные там ссылки. Таким образом, подходящие композиции, пределы доз и схемы приема лекарственного средства для таких соединений легко могут быть определены стандартными способами.

Комбинации лекарственных средств по настоящему изобретению могут выпускаться для воздействия на клетку или клетки, или на организм в целом, либо в виде отдельных фармацевтически приемлемых композиций, вводимых одновременно или последовательно, либо композиций, содержащих более одного терапевтического средства, либо в виде набора из отдельного средства и композиций из ряда агентов. Независимо от введения такие комбинации лекарственных средств создают анти-HCV эффективное количество компонентов.

Целый ряд других иммуномодуляторов и иммуностимуляторов, которые могут быть использованы в способе по настоящему изобретению, поступает в настоящее время в продажу и включает препараты под названием: AA-2G; адамантиламиддипептид; аденоzinдеаминаза, Enzon; адьюванты, Alliance; адьюванты, Ribi; адьюванты, Vaxcel; Adjuvax; агеласфин-11; СПИД терапия, Chiron; алгалглюкан, SRI; алгаммулин, Anutech; Anginlyc; антиклеточные факторы, Yeda; Anticort; антигастрин-17 иммуноген, Ap; система доставки антигена, Vac; антигенсодержащий состав, IDBC; анти-GnRH-иммуноген, Aphtron; Antiherpin; Arbidol; азарол; Bay-q-8939; Bay-r-1005; BCH-1393; Betafectin; Biostim; BL-001; BL-009; Broncostat; Cantastim; CDRI-84-246; цефодизим; ингибиторы хемокина, ICOS; CMV белки, City of Hope; CN-5888; цитокинвызывающий агент, St; DHEAS, Paradigm; DISC TA-HSV; J07B; I01A; I01Z; натрий дитиокарб; ECA-10-142; ELS-1; эндотоксин, Novartis; FCE-20696; FCE-24089; FCE-24578; FLT-3 лиганд, Immunex; FR-900483; FR-900494; FR-901235; FTS-Zn; G-протеины, Cadus; глудапсин; глутаурин; гликофосфопептикал; GM-2; GM-53; GMDP; вакцина фактора роста, EntreM; H-BIG, NABI; H-CIG, NABI; HAB-439; вакцина Helicobacter pylori; герпес-специфический иммунный фактор; HTV терапия, United Biomed; HyperGAM+CF; ImmuMax; Immun BCG; иммунная терапия, Connective; иммуномодулятор, Evans; иммуномодулятор, Novacell; imreg-1; mreg-2; Indomune; инозин пранобекс; интерферон, Dong-A (альфа2); интерферон, Genentech (гамма); интерферон, Novartis (альфа); интерлейкин-12, Genetics Ins; интерлейкин-15, Immunex; интерлейкин-16, Research Cor; ISCAR-1; J005X; L-644257; licomarasmic кислота; LipoTher; LK-409; LK-410; LP-2307; LT (R1926); LW-50020; MAP, Shionogi; MDP производные, Merck; метенкефалин, TNI; метилфурилбутиrolактоны; MIMP; мириостим; ассоциированная бактериальная вакцина, Tern; MM-1; монилиастат; MPLA, Ribi; MS-705; мурабутид; мурабутид, Vacsyn; мурамидипептидные производные; мурамилпептидные производные миелопид; -563; NACOS-6; NH-765; NISV, Proteus; NPT-16416; NT-002; PA-485; PEFA-814; белки, Scios; пептиодигликан, Pliva; Perthon, Advanced Plant; PGM производное, Pliva; заявки на регистрацию фармпрепаратов №. 1099; №. 1426; №. 1549; №. 1585; №. 1607; №. 1710; №. 1779; №. 2002; №. 2060; №. 2795; №. 3088; №. 3111; №. 3345; №. 3467; №. 3668; №. 3998; №. 3999; №. 4089; №. 4188; №. 4451; №. 4500; №. 4689; №. 4833; №. 494; №. 5217; №. 530; пидотимод; пимелаутид; пинафид; PMD-58 9; подофиллотоксин, Conpharm; POL-509; poly-ICLC; poly-ICLC, Yamasa Shouy; PolyA-PolyU; полисахарид А; протеин А, Berlox Bioscience; PS34WO; Pseudomonas MAbs, Teijin; псомаглобин; PTL-78419; пиексол; пириферон; ретроген; ретропеп; RG-003; риностат; рифамаксил; RM-06; роллин; ромуртид; RU-40555; RU-41821; Rvbella антитела, ResCo; S-27609; SB-73; SDZ-280-636; SDZ-MRL-953; SK&F-107647; SL04; SL05; SM-4333; солютейн; SRI-62-834; SRL-172; ST-570; ST-789; стафаджлизат; стимулон; супрессии; T-150R1; T-LCEF; табилаутид; темуртид; Theradigm-HBV; Theradigm-HPV; Theradigm-HSV; THF, Pharm & Upjohn; THF, Yeda; тималфазин; фракции тимусного гормона; тимокартин; тимолимфотропин; тимопентин; тимопентинаналоги; тимопентин, Peptech; тимозин фракция 5, альфа; тимостимулин; тимотринан; TMD-232; TO-115; фактор переноса, Viragen; туфтин, Selavo; убенимекс; Ulsastat; ANGG-; CD-4+; Collag+; COLSF+; COM+; DA-A+; GAST-; GF-TH+; GP-120-; IF+; IF-A+; IF-A-2+; IF-B+; IF-G+; IF-G-1B+; IL-2+; IL-12+;

BL-15+; IM+; LHRH-; LIPCOR+L LYM-B+; LYM-NK+; LYM-T+; OPI+; PEP+; PHG-MA+; RNA-SYN-; SY-CW-; TH-A-1+; TH-5+; TNF+; UN.

Характерные примеры нуклеозидных и нуклеотидных соединений, полезных по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваясь ими:

(+)-цис-5-фтор-1-[2-(гидроксиметил)]-[1,3-оксатиолан-5-ил]цитозин;
 (-)-2'-дезокси-3'-тиоцитидин-5'-трифосфат (3TC);
 (-)-цис-5-фтор-1-[2-(гидроксиметил)]-[1,3-оксатиолан-5-ил]цитозин (FTC);
 (-)-2',3'-дидеокси-3'-тиацитидин[(-)-SddC];
 1-(2'-дезокси-2'-фтор-бета-D-арабинофуранозил)-5-иодцитозин (FLAG);
 1-(2'-дезокси-2'-фтор-бета-D-арабинофуранозил)-5-иодцитозинтрифосфат (FIACTP);
 1-(2'-дезокси-2'-фтор-бета-B-арабинофуранозил)-5-метилурацил (FMAU);
 1-бета-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид;
 2',3'-дидезокси-3'-фтор-5-метилдексоцитидин (FddMeCyt);
 2',3'-дидезокси-3'-хлор-5-метилдексоцитидин (ClddMeCyt);
 2',3'-дидезокси-3'-амино-5-метилдексоцитидин (AddMeCyt);
 2',3'-дидезокси-3'-фтор-5-метилцитидин (FddMeCyt);
 2',3'-дидезокси-3'-хлор-5-метилцитидин (ClddMeCyt);
 2',3'-дидезокси-3'-амино-5-метилцитидин (AddMeCyt);
 2',3'-дидезокси-3'-фортимидин (FddThd);
 2',3'-дидезокси-бета-L-5-фторцитидин (бета-L-FddC);
 2',3'-дидезокси-бета-L-5-тиацитидин;
 2',3'-дидезокси-бета-L-5-цитидин (бета-L-ddC);
 9-(1,3-дигидрокси-2-пропоксиметил)гуанин;
 2'-деокси-3'-тиа-5-фторцитозин;
 3'-амино-5-метилдексоцитидин (AddMeCyt);
 2-амино-1,9-[(2-гидроксиметил-1-(гидроксиметил)этокси]метил]-6Н-пурин-6-он(ганцикловир);
 2-[2-(2-амино-9Н-пурин-9ил)этил]-1,3-пропандилдиацетат(фамцикловир);
 2-амино-1,9-дигидро-9-[(2-гидроксизетокси)метил]-6Н-пурин-6-он (ацикловир);
 9-(4-гидрокси-3-гидроксиметилбут-1-ил)гуанин (пенцикловир);
 9-(4-гидрокси-3-гидроксиметилбут-1-ил)-6-дезоксигуаниндиацетат (фамцикловир);
 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT);
 3'-хлор-5-метилдексоцитидин (ClddMeCyt);
 9-(2-fosfonilmetoksiethyl)-2',6'-диаминопурин-2',3'-дидезоксирибозид;
 9-(2-фосфонилметоксиэтил)аденин (PMEA);
 ацикловиртрифосфат (ACVTP);
 D-карбоциклик-2'-дезоксигуанозин (CdG);
 дидезоксицитидин; дидезоксицитозин (ddC);
 дидезоксигуанин (ddG); дидезоксиинозин(ddI);
 Е-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксиуридинтрифосфат;
 фторарабинофуранозилиодурацил;
 1-(2'-деокси-2'-фтор-1-бета-D-арабинофуранозил)-5-иодурацил (FIAU); ставудин;
 9-бета-D-арабинофуранозил-9Н-пурин-6-аминомоногидрат (Ara-A);
 9-бета-D-арабинофуранозил-9Н-пурин-6-амин-5'-монофосфатмоногидрат (Ara-AMP);
 2-дезокси-3'-тиа-5-фторцитидин;
 2',3'-дидезоксигуанин и 2',3'-дидезоксигуанозин.

Синтетические способы получения нуклеозидов и нуклеотидов, полезных в настоящем изобретении, хорошо известны в данной области и описаны в Acta Biochim. Pol., 43, 25-36 (1996); Swed. Nucleosides Nucleotides 15, 361-378 (1996); Synthesis 12, 1465-1479 (1995); Carbohydr. Chem. 27, 242-276 (1995); Chem. Nucleosides Nucleotides 3, 421-535 (1994); All. Reports in Med. Chem., Academic Press и Exp. Opin. Invest. Drugs 4, 95-115 (1995).

Химические реакции, описанные в приведенных выше ссылках, в целом обсуждаются в самом широком смысле их применения к синтезу соединений по данному изобретению. Иногда для некоторых из числа рассматриваемых в данном описании соединений данные реакции могут оказаться не применимы в том виде, как они описаны. Специалисты в данной области легко могут определить соединения, для которых возникает эта проблема. Во всех таких случаях либо реакции могут быть успешно осуществлены за счет обычных модификаций, известных специалисту в данной области, например, путем подходящей защиты мешающих групп, путем замены обычных реагентов на альтернативные, путем стандартного изменения реакционных условий и тому подобное, либо другие, описываемые или, наоборот, общепринятые реакции могут быть применимы для получения соответствующих соединений по данному изобретению. Во всех preparatивных способах все исходные вещества являются известными или их легко получить из известных исходных соединений.

Хотя нуклеозидные аналоги обычно используют в качестве антивирусных агентов как таковые,

нуклеотиды (нуклеозидфосфаты) иногда должны быть превращены в нуклеозиды для облегчения их транспорта через клеточные мембранны. Примером химически модифицированного нуклеотида, способного к проникновению в клетки, является 3-1-3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропилцитозин (HPMPC, Gilead Sciences). Нуклеозидные и нуклеотидные соединения по настоящему изобретению, являющиеся кислотами, могут образовывать соли. Примеры включают соли с щелочными металлами или щелочно-земельными металлами, такими как натрий, калий, кальций или магний, или с органическими основаниями или основные соли четвертичного аммония.

Иммуномодуляторы и иммуностимуляторы, используемые в способах комбинированной терапии по настоящему изобретению могут быть введены в количествах, меньших, чем обычно принято в данной области. Например, интерферон альфа обычно вводят пациентам для лечения инфекции HCV в количестве приблизительно от 1×10^6 единиц/пациент три раза в неделю до 10×10^6 единиц/пациент три раза в неделю (Simon et al., Hepatology 25: 445-448 (1997)). В способах и композициях по настоящему изобретению эта доза может быть в пределах приблизительно от $0,1 \times 10^6$ единиц/пациент три раза в неделю до $7,5 \times 10^6$ единиц/пациент три раза в неделю; более предпочтительно, приблизительно от $0,5 \times 10^6$ единиц/пациент три раза в неделю до 5×10^6 единиц/пациент три раза в неделю; наилучше предпочтительно, приблизительно от 1×10^6 единиц/пациент три раза в неделю до 3×10^6 единиц/пациент три раза в неделю. Благодаря повышенной антивирусной эффективности в отношении вируса гепатита С иммуномодуляторов и иммуностимуляторов в присутствии ингибиторов сериновой протеазы HCV по настоящему изобретению, могут быть использованы меньшие количества таких иммуномодуляторов/иммуностимуляторов в описываемых способах и композициях. Подобным образом, благодаря повышенной антивирусной эффективности в отношении вируса гепатита С данных ингибиторов сериновой протеазы HCV по настоящему изобретению в присутствии иммуномодуляторов и иммуностимуляторов, могут быть использованы меньшие количества ингибиторов сериновой протеазы HCV в описываемых способах и композициях. Такие уменьшенные количества могут быть определены стандартным контролем за титрами вируса гепатита С проходящих лечение больных. Это может быть выполнено, например, контролем за РНК HCV в сыворотке пациентов по методикам слот-блоттинг, дот-блоттинг или ОТ-ПЦР, или путем определения поверхностных или других антигенов HCV. Подобным образом можно проводить мониторинг пациентов во время комбинированной терапии с использованием описываемых ингибиторов сериновой протеазы HCV и других соединений, обладающих анти-HCV активностью, например, нуклеозидных и/или нуклеотидных антивирусных агентов, для определения наименьших эффективных доз для каждого из используемых в комбинации соединений.

В описываемых способах комбинированной терапии нуклеозидные и/или нуклеотидные антивирусные соединения или их смеси могут быть введены пациенту в количестве в пределах приблизительно от 0,1 до 500 мг/пациент/день; предпочтительно от 10 до 300 мг/пациент/день; более предпочтительно приблизительно от 25 до 200 мг/пациент/день; еще более предпочтительно приблизительно от 50 до 150 мг/пациент/день и наилучше предпочтительно в пределах приблизительно от 1 до 50 мг/пациент/день.

Соединения могут быть введены пациенту в виде разовой дозы или пропорциональных многократных разделенных доз. В последнем случае дозированные единичные композиции могут содержать такое количество разделенных доз, которое может составлять суточную дозу. Общая суточная доза может также быть увеличена по усмотрению прописывающего лекарство врача за счет кратности приема доз в день.

Схему лечения зараженного инфекцией HCV пациента с помощью соединений и/или композиций по настоящему изобретению выбирают с учетом различных факторов, включающих возраст, массу, пол, диету и состояние пациента, тяжесть заболевания, способ введения, исходя из фармакологических соображений, таких как активность, эффективность, фармакокинетика и токсилогические профили конкретных используемых соединений и в зависимости от того, какая именно система доставки лекарственного средства используется. Введение описываемых лекарственных комбинаций обычно должно продолжаться в течение периода от нескольких недель до нескольких месяцев или лет, пока титры вируса не достигнут приемлемых уровней, указывающих, что инфекция контролируется или уничтожена. За пациентами, проходящими лечение описываемыми лекарственными комбинациями, может осуществляться стандартный контроль путем определения РНК вирусного гепатита в сыворотке пациентов по методикам слот-блоттинг, дот-блоттинг или ОТ-ПЦР, или путем определения антигенов вируса гепатита С, таких как поверхностные антигены в сыворотке для установления эффективности лечения. Постоянный анализ полученных указанными способами данных позволяет изменять схемы приема лекарственных средств в ходе лечения с целью введения в комбинацию оптимальных количеств каждого из компонентов, так что за счет этого может быть сокращена длительность лечения. Таким образом, схему лечения/приема лекарства можно рационально изменять по ходу курса терапии с тем, чтобы вводить наименьшие количества каждого из используемых в комбинации антивирусных соединений, которые вместе обладают достаточной эффективностью против вируса гепатита С, и так, чтобы введение таких антивирусных соединений в комбинации продолжалось так долго, как это необходимо для успешного лечения инфекции.

Настоящее изобретение касается применения описываемых ингибиторов сериновой протеазы HCV

в различных комбинациях с вышеуказанными соединениями и соединениями подобных типов, обладающих анти-HCV активностью, для лечения или предотвращения инфекций HCV у пациентов. Например, один или более ингибиторов сериновой протеазы HCV могут быть использованы в сочетании с одним или более интерферонами или производными интерферона, обладающими анти-HCV активностью; одним или более соединениями, не относящимися к классу интерферона, обладающими анти-HCV активностью; или одним или более интерферонами или производными интерферона, обладающими анти-HCV активностью и одним или более соединениями, не относящимися к классу интерферона, обладающими анти-HCV активностью. При использовании в комбинации для лечения или профилактики инфекций HCV у пациентов любой из описанных сейчас ингибиторов сериновой протеазы HCV и указанных выше соединений, обладающих анти-HCV активностью, может присутствовать в фармацевтически или анти-HCV эффективном количестве. В силу аддитивных или синергических эффектов при использовании в указанных выше комбинациях каждое соединение может также присутствовать в субклиническом фармацевтически эффективном или анти-HCV эффективном количестве, т.е. количестве, которое, если используется отдельно, обеспечивает пониженную фармацевтическую эффективность, недостаточную для полного ингибирования или снижения аккумуляции вирионов HCV и/или облегчения состояния или уменьшения интенсивности симптомов, связанных с инфекцией HCV или патогенезом у пациентов, по сравнению со случаем использования таких ингибиторов сериновой протеазы HCV и соединений, обладающих анти-HCV активностью, в фармацевтически эффективных количествах. В дополнение, настоящее изобретение касается применения комбинаций ингибиторов сериновой протеазы HCV и соединений, обладающих анти-HCV активностью, как указано выше, для лечения или профилактики инфекций HCV, где один или более из указанных ингибиторов или соединений присутствуют в фармацевтически эффективном количестве, а другой (другие) присутствуют в субклиническом фармацевтически эффективном количестве или анти-HCV эффективном количестве (количествах) в силу их аддитивных или синергических эффектов. Как используется в данном описании, термин "аддитивный эффект" описывает комбинированный эффект двух (или более) фармацевтически активных агентов, который равен сумме эффектов каждого отдельно взятого агента. Синергический эффект означает случай, при котором комбинированный эффект двух (или более) фармацевтически активных агентов выше, чем сумма эффектов каждого отдельно взятого агента.

Пример 42. Стандартным способом лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита C (HCV), в настоящее время является лечение иммуномодулятором, альфа-интерфероном (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Указанный способ лечения неэффективен для большинства пациентов с HCV, у которых либо не наблюдается ответа, либо наблюдается рецидив даже после продолжительного лечения интерфероном. Кроме того, существуют тяжелые побочные эффекты, связанные с лечением интерфероном.

Ввиду настоятельной потребности в новых, более эффективных антивирусных лекарственных средствах для лечения инфицированных HCV пациентов авторы данного изобретения разработали серию соединений, которые ингибируют сериновую протеазу HCV (комплекс белков NS3 и NS4A вируса HCV). Указанные соединения можно использовать отдельно или совместно друг с другом и в комбинации с соединениями других классов для лечения или профилактики HCV-инфекции. В данном примере описано тестирование трех представителей ингибиторов сериновой протеазы HCV, т.е. соединения CU, соединения EP и соединения EC по отдельности и в комбинации с отдельными представителями группы интерферонов (интерфероном альфа-2 (Schering-Plough), интерфероном альфа-2A (PEL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ), интерфероном бета (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ) интерфероном овцы tau (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ)) на основе анализа субгеномного РНК-репликона HCV (анализ репликонов) для определения того, согласованно ли действуют два соединения, снижая накопление РНК HCV. При анализе репликонов измеряют количество субгеномной РНК HCV (РНК репликона), остающееся в клетках, несущих репликон (Lohmann et al. Science 285:110-113 (1999)), после двух дней обработки лекарственным средством по сравнению с количеством РНК репликона в необработанных клетках. В данном анализе эффективность соединений в качестве антивирусных лекарственных средств против HCV прямо пропорциональна уровню ингибирования накопления РНК репликона.

Два лекарственных средства тестируют в комбинациях в системе анализа репликонов *in vitro* с целью определения того, проявляют ли они при совместном использовании аддитивную или синергическую активность, направленную против HCV. Анализ репликонов используют в качестве модели, заменяющей инфекцию HCV *in vitro*, для оценки комбинированных воздействий иммуномодулятора, например, интерферона-альфа 2B ((инtron A); Schering Plough), и ингибитора сериновой протеазы HCV, например, соединения CU. Как показано ниже, результаты свидетельствуют, что имеет место четкое синергическое действие указанных двух типов лекарственных средств, направленное против HCV, которое измеряли с использованием формального математического анализа синергизма, исследуя их способность снижать уровни РНК HCV в анализе репликонов.

Анализ репликонов

Анализ репликонов с использованием линии клеток, содержащих самореплицирующуюся субгеномную РНК HCV (репликон), описан Lohmann et al. Science 285:110-113 (1999). Инвентарный номер в

Genbank последовательности репликона, используемого в описанных в данной заявке экспериментах, указан в приведенном источнике информации как AJ242654. В данной статье описаны способы транскрипции *in vitro* РНК из кДНК репликона, трансфекции в клетки HuH7 РНК репликона путем электропорации и селекции клеток, содержащих РНК репликона, с использованием антибиотика G418. Клетки HuH7 являются линией клеток гепатомы, полученной Dr. William Mason в Fox Chase Cancer Research Center (Philadelphia). Указанные клетки общедоступны из Fox Chase и всесторонне описаны в научной литературе (Nakabayashi et al. Cancer Res. 42:3858-3863 (1982)). В описанных в данной заявке экспериментах всю матричную ДНК удаляют из транскрибированного *in vitro* препарата РНК репликона перед электропорацией указанной РНК в клетки HuH7 путем многократной обработки ДНКазой (три последовательных обработки).

Анализ репликонов выполняют, как подробно описано ниже. Коротко, клетки, несущие репликон, помещают в 96-луночные планшеты при плотности 10000 клеток на лунку и инкубируют при 37°C. Клетки инкубируют в DMEM (минимальной основной среде Дульбекко), с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка, глутамина, заменимых аминокислот и антибиотика G418 (0,25 мг/мл). После инкубации в течение ночи среду заменят DMEM, содержащей 2% фетальную сыворотку теленка и различные концентрации ингибитора сериновой протеазы, такого как соединение CU, и/или интерферона, такого как интерферон-альфа 2B (инtron A, Schering Plough). Каждое соединение тестируют при шести-восьми различных концентрациях. В качестве предельного значения концентраций выбирают высокие концентрации соединений, приводящие почти к полному ингибированию накопления РНК репликона РНК после двух дней обработки. Исходя из этих начальных концентраций, проводят серийные разведения так, чтобы пределы концентраций, исследуемых при анализе репликона включали концентрации, при которых соединения являются высокоэффективными, а также концентрации, при которых эффект незначителен. Каждую концентрацию ингибитора сериновой протеазы HCV исследуют в отсутствии интерферона, а также с добавлением шести-восьми различных доз интерферона. Подобным образом интерферон исследуют в отсутствии каких-либо добавок ингибитора сериновой протеазы HCV. После 48-часовой инкубации с соединениями среду удаляют из планшетов и суммарную клеточную РНК экстрагируют из клеток, используя набор RNeasy-96, выпускаемый Qiagen Inc. (Valencia, CA). Затем полученную РНК анализируют посредством количественной ОТ-ПЦР или TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City CA). Мишенью TaqMan® ОТ-ПЦР является ген устойчивости к неомицину в РНК репликона. Планшеты готовят так, чтобы получить 5 повторов каждого образца обработки лекарственным средством и 16 повторов необработанных образцов. Это обеспечивает высокую статистическую доверительность количественных данных ОТ-ПЦР.

Анализ результатов исследования репликона дает две величины, полезных для оценки эффективности потенциальных антивирусных агентов против HCV. При каждой исследуемой концентрации соединения определяют уровень ингибирования накопления РНК репликона, вызванный соединением за два дня обработки, относительно количества РНК репликона в необработанных клетках. Результаты представляют как процент ингибирования. После получения серии результатов, определенных при обработке клеток в интервале концентраций, определяют значения IC₅₀, т.е., концентрацию соединения, при которой соединение снижает накопление РНК репликона на 50%. Путем повторных исследований ингибиторов сериновых протеаз HCV в анализе репликонов установлено, что IC₅₀ имеет коэффициент вариации в процентах (%CV или 100% × стандартное отклонение в IC₅₀/среднее IC₅₀) приблизительно 20%. IC₅₀ является значением, используемым для ранжирования отдельных соединений, исследуемых в данном анализе, на основании их эффективности в качестве антивирусных средств против HCV. Простые определения IC₅₀ являются неадекватными для оценки полезности соединений, используемых в комбинации. Наиболее эффективный анализ совокупных данных, полученных с использованием всех комбинаций различных интерферонов и ингибиторов сериновой протеазы, требует оценки ингибирования в процентах, как показано в табл. 7, с использованием описанных ниже математических способов, предназначенных для определения того, является ли характер комбинированных обработок агонистическим, аддитивным или синергическим.

Подробности проведения анализа репликонов следующие.

Методика количественного анализа РНК репликона HCV при анализе репликона HCV с использованием ОТ-ПЦР TaqMan®

Анализ репликонов используют для оценки способности потенциальных антивирусных соединений, направленных против HCV, ингибировать накопление молекул субгеномной РНК репликона HCV в клетках линии HuH7 (Lohmann et al. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285, 110-113 (1999)). Указанный анализ включает три технологических этапа: (1) поддержание клеток, несущих репликон, подготовка планшетов для анализа и внесение соединений; (2) экстракцию суммарной клеточной РНК из клеток, несущих репликон, и (3) ОТ-ПЦР в режиме реального времени (TaqMan®) для измерения количества РНК репликона в каждом образце. Для выполнения анализа репликонов требуется, по меньшей мере, 4 дня; однако процесс можно прерывать и образцы между стадиями хранить замороженными. Каждый этап анализа описан ниже.

1. Поддержание клеток, несущих репликон, подготовка планшетов для анализа и внесение соединений.

1.1. Поддержание линии клеток, несущей репликон.

Линию клеток, используемую в анализе репликонов, получают, как описано Lohmann et al. (Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285, 110-113 (1999)). После инкубирования флаконов для культивирования клеток размером 150 см² (Costar), содержащих клетки, несущие репликон, при 37°C и 5% CO₂ и образования слитого монослоя, клетки разводят 1:10, об./об., в новых флаконах для культивирования клеток размером 150 см². Средой является DMEM, содержащая 10% фетальной сыворотки теленка (FBS), 1X заменимых аминокислот (NEAA), 1X глутамина (Glu) и 0,25 мг/мл G418. Проводят три серийных посева, каждый раз давая возможность клеткам образовать монослои, с последующим разведением клеток в новых флаконах для культивирования клеток размеров 150 см². Затем полученные клетки, называемые «исходными клетками» делят на аликвотные пробы и хранят для последующего использования в анализе репликонов. Анализ, основанный на TaqMan®, выполняют для определения числа геномов репликона HCV на клетку, который обнаруживает наличие ~150 копий репликона на клетку. Результат основан на отношении количества копий РНК репликона к двукратному количеству копий гена ароВ человека (число гаплоидных геномов).

1.1.1. Исходные клетки хранят в жидком N₂. Что касается клеток, используемых в анализе репликонов, после 20 последовательных пассажей клетки отбрасывают и оживляют новую партию после хранения в жидком N₂.

1.2. Посев клеток в 96-луночные планшеты для анализа репликонов.

1.2.1. Для подготовки 96-луночных планшетов флаконы размером 75 см² на 75% занятые монослоем из содержащих репликон клеток, обрабатывают трипсином и клетки ресусцидируют в 10 мл среды А. Трипсинизацию проводят, удаляя среду, добавляя 1 мл смеси трипсин-EDTA 0,25%, мас./об. и затем удаляя трипсин-EDTA. Спустя 5-10 мин клетки снимаются со стенок флакона и их ресусцидируют в среде.

1.2.2. Клетки подсчитывают, используя гемоцитометр, и концентрацию клеток доводят до 10⁵ клеток/мл.

1.2.3. Каждую лунку засевают 100 мкл супензии клеток, используя многоканальную пипетку Impact2 (Matrix), никогда не засевая более четырех 96-луночных планшетов одной клеточной супензией.

1.2.4. 96-луночные планшеты инкубируют при 37°C в течение ночи.

1.3. Разведения соединений и внесение в планшеты с клетками, содержащими репликон.

1.3.1. Соединения-ингибиторы сериновой протеазы HCV растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) до конечной концентрации 20 мМ. Интерфероны суспендируют в забуференном фосфатом солевом растворе, содержащем 0,1% мас./об. бычьего сывороточного альбумина.

1.3.2. 20 мМ раствор соединения разбавляют до 1 мМ с помощью ДМСО.

1.3.3. 50 мкл соединения, растворенного в ДМСО, добавляют к 10 мл среды В (концентрация соединения равна 5 мМ и концентрация ДМСО равна теперь 0,5%), или 20 мкл из 1 мМ раствора соединения и 30 мкл ДМСО добавляют к 10 мл среды В (концентрация соединения составляет 2 мкМ).

1.3.4. Разбавление соединения до конечной концентрации завершают, смешивая раствор соединение/среда В со средой С (содержащей 0,5% ДМСО). Серийные (одно-пять) разведения соединения выполняют с помощью среды С в полипропиленовом 96-луночном блоке объемом 2 мл, получая требуемые конечные концентрации соединения.

1.3.5. Планшет с клетками вынимают из инкубатора с температурой 37°C и метят в верхнем правом углу крышки и на правой стороне основания. Среду сливают из 96-луночных планшетов.

1.3.6. 100 мкл растворов соединение/среда из каждой лунки 96-луночного блока для разбавлений добавляют к 96-луночному планшету для клеток, используя пипетку Impact2.

1.3.7. 100 мкл среды С добавляют во все необработанные лунки согласно табл. 3 для тестирования соединений в 1, 3 или 6 различных концентрациях. «Untx» означает холостую обработку клеток (добавляют ДМСО в тех же концентрациях, как и в обработанные клетки); «Con.» означает концентрацию соединения.

Таблица 3
2 соединения, 6 концентраций,
5 повторов

Соединение 1												Соединение 2											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	untx	D	con.1																				
C	con.2	E	con.4																				
D	con.3	F	con.5																				
G	con.6	H	untx																				

4 соединения, 3 концентрации,
5 повторов

Соединение 1												Соединение 2											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	untx	D	con.1																				
C	con.2	E	con.1																				
D	con.3	F	con.2																				
G	con.3	H	untx																				

16 соединений, 1 концентрация, 4 повтора

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	untx	cpd 1	cpd 2	cpd 3	cpd 4	cpd 5	cpd 6	cpd 7	cpd 8	cpd 9	cpd 10
D	untx	cpd 1	cpd 2	cpd 3	cpd 4	cpd 5	cpd 6	cpd 7	cpd 8	cpd 9	cpd 10
C	untx	cpd 1	cpd 2	cpd 3	cpd 4	cpd 5	cpd 6	cpd 7	cpd 8	cpd 9	cpd 10
D	untx	cpd 1	cpd 2	cpd 3	cpd 4	cpd 5	cpd 6	cpd 7	cpd 8	cpd 9	cpd 10
E	untx	cpd 9	cpd 10	cpd 11	cpd 12	cpd 13	cpd 14	cpd 15	cpd 16	cpd 17	cpd 18
F	untx	cpd 9	cpd 10	cpd 11	cpd 12	cpd 13	cpd 14	cpd 15	cpd 16	cpd 17	cpd 18
G	untx	cpd 9	cpd 10	cpd 11	cpd 12	cpd 13	cpd 14	cpd 15	cpd 16	cpd 17	cpd 18
H	untx	cpd 9	cpd 10	cpd 11	cpd 12	cpd 13	cpd 14	cpd 15	cpd 16	cpd 17	cpd 18

12 соединений, 1 концентрация, 5 повтора

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	untx										
D	cpd 1										
C	cpd 2										
D	cpd 3										
E	cpd 4										
F	cpd 5										
G	cpd 6										
H	untx										

1.4. Планшеты инкубируют в течение 48 ч при 37°C и затем подвергают экстракции РНК.

Таблица 4. Сводные данные по оборудованию и вспомогательным материалам, используемым для культивирования клеток и подготовки соединений

8-канальная пипетка Impact2, 1250 мкл	Кат. № 2004	Matrix
Полипропиленовая форма с глубокими лунками, объемом 2 мл, 96-луночная, стерильная	Кат. № 4222	Matrix
Емкости для реагентов объемом 25 мл, стерильные	Кат. № 8096	Matrix
Длинные наконечники для пипеток X-tra, 1250 мкл	Кат. № 8255	Matrix
96-луночный планшет	Кат. № 3595	Costar
Гемацитометр	Neubauer усовершенствованный с яркими линиями глубиной 0,1 мм	Reichert
DMEM	Кат. № 51444-79Р	JRH
L-глутамин (Glu)	Кат. № 12403-010	GIBCO-BRL
Заменимые аминокислоты (NEAA)	Кат. № 11140-050	GIBCO-BRL
Фетальная сыворотка теленка (FBS)	Кат. № 16250-078	GIBCO-BRL
G418	Кат. № 55-0273	Invitrogen
ДМСО	Кат. № D-2650	Sigma
Среда А	DMEM, 10% FBS, 1X NEAA, 1X Glu, 0,25 мг/мл G418	
Среда В	DMEM, 2% FBS, 1X NEAA, 1X Glu	
Среда С	DMEM, 2% FBS, 1X NEAA, 1X Glu, 0,5% ДМСО	
Трипсин-EDTA 0,25%	GIBCO-BRL	

2. Экстракция суммарной клеточной РНК из клеток, несущих репликон.

2.1 Введение.

Целью методики является экстракция РНК из образцов культур тканей *in vitro*, таким образом, чтобы количественно извлечь вирусную или клеточную РНК, очищенную в достаточной степени для количественного анализа посредством ОТ-ПЦР HCV.

Для того чтобы выявить разброс в эффективности экстракции РНК к каждому образцу клеток перед экстракцией РНК добавляли стандартное количество вируса вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV), РНК-вируса, обладающего некоторым сходством с HCV. Таким образом, уровень РНК BVDV, выявленный в конечной реакции многократной ОТ-ПЦР должен быть сходным во всех лунках в пределах вариабельности, связанной с анализом репликонов. Указанный внутренний контроль эффективности экстракции РНК обсуждается далее в приведенном ниже разделе TaqMan®.

Используемым способом экстракции РНК является способ RNeasy-96 производства Qiagen Inc. (Valencia, CA). В указанном способе используют 96 миниколонок на основе диоксида кремния, которые располагают в порядке, совместимом с операциями, проводимыми на культурах ткани в 96 лунках. Способ экстракции РНК представляет собой модификацию способа Бума, при котором все клеточные белки и нуклеиновую кислоту, включая нуклеазы, сначала денатурируют сильной хаотропной солью (гуанидинтиоцианат). В такой среде нуклеиновые кислоты обладают высоким сродством к диоксиду кремния, материалу на дисках миниколонок; однако белки и другие загрязнители не связываются с диоксидом кремния и проходят через колонки. После промывки колонок растворами хаотропного агента/этанола образцы подсушиваются и затем высвобождают нуклеиновую кислоту с колонки небольшим объемом воды.

Чтобы уменьшить вариабельность извлечения РНК HCV, соблюдают осторожность при промывке колонок и выборе условий подсушивания. Присутствие небольшого количества этанола на колонке будет загрязнять конечную РНК и мешать в системе регистрации ОТ-ПЦР. Требуется осторожность на всех стадиях данной процедуры, поскольку исходные образцы могут быть биологически опасными, хаотропная соль может быть очень едкой и как в случае тиоцианата может образовывать ядовитый цианидный газ при возможности контактирования с кислой средой.

Таблица 5. Сводные данные по оборудованию и вспомогательным материалам, используемым в методике экстракции РНК HCV

Набор RNeasy 96 (24)	Кат. № 74183	Qiagen
Коллектор QIAvac 96	Кат. № 19504	Qiagen
Центрифуга 4-15С для планшетов 2x96, 6000 x g	Кат. № 81010	Qiagen
Тарельчатый ротор для планшетов 2x96	Кат. № 81031	Qiagen
Этиловый спирт Proof 200		
8-канальная пипетка Impact2, 250 мкл	Кат. № 2002	Matrix
8-канальная пипетка Impact2, 1250 мкл	Кат. № 2004	Matrix
Чопилпропиленовый блок с глубокими лунками объемом 2 мл, 96-луночный, стерильный	Кат. № 4222	Matrix
Емкости для реагентов объемом 25 мл, стерильные	Кат. № 8096	Matrix
Длинные наконечники для пипеток X-tra, 1250 мкл	Кат. № 8255	Matrix
Наконечники для пипеток, 200 мкл	Кат. № 7275	Matrix
Среда МЕМ без сыворотки	Кат. № 11095-80	GIBCOBRL

2.2. Методика.

2.2.1. Лизис клеток.

2.2.1.1. Готовят лизирующий буфер: для одного 96-луночного планшета добавляют 150 мкл β-меркаптоэтанола (β-ME) и 1 мкл культуры BVDV (культуру перед добавлением встраивают) к 15 мл буфера RLT (компонент набора RNeasy, Qiagen). Указанную культуру получают инфицированием клеток MDBK (клетки почки быка, #CCL-22, доступные из Американской коллекции типов культур Manassas VA) вирусом BVDV и сбором культуры при достижении пика цитопатического действия (ЦПД). Полученная культура имеет инфекционный титр примерно равный 1×10^7 БОЭ/мл. Это дает пороговый цикл BVDV (C_t) примерно 22 в анализе TaqMan®. Культуру BVDV хранят в морозилке при -80°C.

2.2.1.2. Клетки промывают 150 мкл среды МЕМ без сыворотки (программа 4 для 8-канальной электронной пипетки P1250: Наполнение 1250, распределение 150×8). В каждую лунку добавляют 150 мкл лизирующего буфера (программа та же).

2.2.1.3. РНК экстрагируют сразу же или клетки замораживают при -80°C.

2.2.2. Подготовка реагентов и материалов для экстракции РНК.

2.2.2.1. Отмечают № партии RPE и набора RNeasy 96.

2.2.2.2. RPE: 720 мл 100% этанола добавляют к одному флакону RPE (Qiagen) и тщательно перемешивают; флаконы с RPE всегда хорошо встраивают перед использованием.

2.2.2.3. 70% этанол: 150 мл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC), добавляют к 350 мл 100% этанола и тщательно перемешивают.

2.2.3. Получение РНК с помощью набора RNeasy 96.

2.2.3.1. Замороженные образцы размораживают при комнатной температуре в течение 40 мин. Одновременно для каждого планшета размораживают одну колонку для контролей экстракции (контроли экстракции: контроли экстракции RNeasy представляют собой набор из 8 пробирок, соединенных друг с другом. Внутри каждой пробирки находится 170 мкл лизата клеток с определенным соотношением позитивных и негативных по отношению к HCV клеток. Сверху вниз соответственно располагаются по два контроля с низким, средним, высоким и нулевым количеством (см. раздел протокола 2.3 ниже)).

2.2.3.2. Образцы перемешивают пипетированием 100 мкл вверх и вниз пять раз. Образец целиком переносят в колонки 1-10 формы с квадратными лунками объемом 2 мл Matrix (программа 1 на P250: перемешивание 100×5, наполнение 170, очистка).

2.2.3.3. 150 мкл стандарта репликона переносят в колонку 11 (в колонке 12 нет образцов).

2.2.3.4. К каждому образцу добавляют 150 мкл 70% этанола (EtOH) (программа 4 на P1250: наполнение 1250, распределение 150).

2.2.3.5. Планшет RNeasy 96, помеченный соответствующим номером планшета, помещают в вакуумный коллектор. Перемешивают и переносят смесь лизат/EtOH на планшет RNeasy 96 (программа 1 на P1250: перемешивание 200, 5 раз, наполнение 330 и очистка). Любые неиспользуемые лунки заклеиваются прозрачной лентой (поставляется Qiagen), обычно колонку 12.

2.2.3.6. Применяют вакуум (примерно 800 мбар) для нанесения образца на миниколонки.

2.2.3.7. Планшет RNeasy-96 промывают 1000 мкл буфера RW1 (Qiagen)/лунку (программа 2 на

P1250: наполнение 1000, распределение 1000).

2.2.3.8. Применяют вакуум для того, чтобы буфер RW1 пошел сквозь фильтр до прекращения прохождения потока.

2.2.3.9. Планшет RNeasy-96 промывают 1000 мкл буфера RPE/лунка (программа 2 на P1250).

2.2.3.10. Применяют вакуум для того, чтобы буфер RPE прошел через фильтр.

2.2.3.11. Повторяют стадию 2.2.3.9.

2.2.3.12. Применяют вакуум для того, чтобы буфер RPE прошел через фильтр, выдерживая под вакуумом в течение 3 мин.

2.2.3.13. Сушат планшет RNeasy 96: планшет RNeasy-96 помещают в многоместный держатель для микропробирок (поставляемый Qiagen), покрывают пленкой AirPore, которая прилагается, и полученный блок центрифицируют в течение 10 мин при 6000×g (центрифуга Qiagen Sigma; 4-15°C).

2.2.3.15. Элюируют РНК из 96-луночного планшета RNeasy: планшет RNeasy-96 переносят на верх нового многоместного держателя для микропробирок. В середину каждой лунки добавляют 70 мкл воды, не содержащей РНКазы (программа 3 на P1250: наполнение 850, распределение 70).

2.2.3.16. Инкубируют 1 мин при комнатной температуре и затем планшет покрывают свежей пленкой AirPore.

2.2.3.17. Блок центрифицируют в течение 4 мин при 6000×g в центрифуге Sigma 4-15C. Элюированный объем составляет от 28 мкл до 50 мкл.

2.2.3.18. Планшет RNeasy-96 выбрасывают, а многоместный держатель пробирок закрывают крышками, прилагаемыми Qiagen (по 8 на полоске).

2.2.3.19. Элюированную РНК хранят при -80°C или сразу же подвергают анализу TaqMan® .

2.3 Подготовка контролем: экстракции.

День 1.

2.3.1.1. Высевают $2,5 \times 10^7$ клеток, продуцирующих репликон, во флаконы для культуры тканей размером 150 см² (T-150).

2.3.1.2. Высевают $2,0 \times 10^6$ клеток Huh7 во флаконы для культуры тканей размером 75 см² (T-75).

2.3.1.3. Инкубируют в течение ночи при 37°C.

День 2.

2.3.1.4. Лизируют клетки лизирующим буфером.

2.3.1.5. Удаляют надосадок с клеток Huh7 и клеток, продуцирующих репликон, и монослоем промывают 10 мл бессыроточной среды (MEM).

2.3.1.6. К клеткам Huh7 добавляют 30 мл лизирующего буфера (1 мкл культуры BVDV/15 мл лизирующего буфера), перемешивают многократным пипетированием и лизат клеток помещают в центрифужные пробирки для культуры ткани с коническим дном объемом 50 мл.

2.3.1.7. 10,5 мл лизирующего буфера добавляют к клеткам, продуцирующим репликон, перемешивают многократным пипетированием и лизат клеток помещают в центрифужные пробирки для культуры ткани с коническим дном объемом 15 мл.

2.3.2. Стандарт высокой экстракции: разносят аликвоты клеточного лизата продуцирующих репликон клеток объемом 170 мкл в 5 и 6 ряды двух держателей пробирок объемом 0,75 мл Matrix.

2.3.3. Стандарт средней экстракции: 1,0 мл клеточного лизата продуцирующих репликон клеток добавляют к 9 мл лизата Huh7 и тщательно перемешивают. Разносят аликвоты указанной смеси объемом 170 мкл в 3 и 4 ряды двух держателей для пробирок объемом 0,75 мл Matrix.

2.3.4. Стандарт низкой экстракции: 50 мкл клеточного лизата продуцирующих репликон клеток добавляют к 10 мл лизата Huh7 и тщательно перемешивают. Разносят аликвоты указанной смеси объемом 170 мкл в 1 и 2 ряды двух держателей для пробирок объемом 0,75 мл Matrix.

2.3.5. Контроль нулевой экстракции: разносят аликвоты лизата клеток Huh7 объемом 170 мкл в 7 и 8 ряды двух держателей пробирок объемом 0,75 мл Matrix.

2.3.6. Контроли хранят при -80°C.

3. ОТ-ПЦР TaqMan® и анализ данных.

3.1. Введение: количественную ОТ-ПЦР в режиме реального времени используют для измерения количества РНК репликона HCV в каждом образце. Указанную методику также называют основанным на ПЦР 5'-нуклеазным анализом и TaqMan®. Прибор для анализа представляет собой систему регистрации последовательностей Applied Biosystems 7700 Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA). Указанный прибор по существу является флуоресцентным спектрографом с временным мультиплексированием, связанным с термоциклиром. Он контролирует накопление ПЦР-ампликона в каждой лунке 96-луночного планшета с образцами в ходе процесса ПЦР.

3.2. Применение внутреннего контроля BVDV: Как указано в предыдущем разделе в каждый образец включают внутренний позитивный контроль. Контроль служит в качестве меры эффективности экстракции РНК и показывает, содержит ли образец загрязнения, которые ингибируют ПЦР TaqMan® . BVDV смешивают с хаотропным буфером для лизиса клеток перед внесение лизирующего буфера в клетки. Хотя позитивный контроль имеется в каждом образце, анализ внутреннего позитивного контроля

BVDV проводят только в том случае, когда результаты анализа РНК репликона HCV выпадают из ожидаемых пределов, что свидетельствует о том, что может существовать проблема, связанная с образцами. Система 7700 способна одновременно осуществлять мониторинг накопления двух разных ПЦР-ампликонов в одной и той же пробирке при использовании регистрирующих зондов, меченых двумя разными флуоресцентными репортерными красителями («мультиплексирование»). Конкретные критерии, которые являются основанием для TaqMan®-анализа внутреннего позитивного BVDV-контроля планшета с образцами, описаны в разделе, посвященном анализу результатов (3.6).

3.3. Зонд и праймеры для TaqMan® РНК репликона HCV Вследствие ожидаемой генетической стабильности и отсутствия общей вторичной структуры РНК в гене устойчивости к неомицину (neo), кодируемом репликоном, используют праймеры и зонд, которые связываются с данной областью. Указанный фрагмент РНК репликона простирается в пределах оснований 342-1193 репликона из 8001 пар оснований (SEQ ID NO: 1):

301	gtgcttgcga	gtgccccggg	aggctcgtat	gaccgtgcac	catgagcacg	aatcttaaac
361	ctcaaagaaa	aacccaaacgt	aaacccaacg	ggcgccat	gatttaacaa	gatggattgc
421	acgcagggtc	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga
481	caatcggtctg	ctctgatgcc	gcccgttcc	ggctgtcgc	gcaggggcgc	cgggttcttt
541	ttgtcaagac	cgacacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	ggcggtctat
601	cgtggctggc	cacgacggggc	gttcccttgcg	cagctgtgt	cgacgttgc	actgaagcgg
661	gaaggggact	gctgtctatttgc	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctctgtca	tctcaccttgc
721	ctctgtccga	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcacatgc	gcgggtcgat	acgettgtac
781	cgggtacatgt	cccattcgtac	caccaagcga	aacatcgat	cgaggcgagca	cgtactcgga
841	tggaaaggccgg	tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag
901	cogaactgtt	cggcagggttc	aaggcgcgca	tgccccgacgg	cgagggatctc	gtctgtgaccc
961	atggcgatgc	ctgttttgcgg	aatatcatgg	tggaaaaatgg	CCCTTTTCT	GGATTCATCG
					праздн. приспособ.	
1021	actcgccccc	ccctccccc	ccggacccgt	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata
		TagMan [®] оптим.				
1081	ttgctgaaga	gcTTGGCCGG	GAATGGGCTG	accgtttct	cgtgttttac	ggtatcgccc
		оптим. приспособ.				
1141	ctccccgattc	gcagcgcacatc	gccttctatc	gccttcttga	cgaggtttcc	ttagtttaaa

3.4. Методики

3.4.1. Способ получения 1Х исходных смесей для ОТ-ПЦР NEO и BVDV.

Таблица 6. Сводные данные по оборудованию и вспомогательным материалам, используемым в методике экстракции РНК НСУ

Из extraktion РНК НСВ		
Оборудование и вспомогательные материалы	Порядковый №.	Поставщик
Пипетка 0,5-10 мкл	Серия 22 47 005-1 2000	Eppendorf
Пипетка 2-20 мкл	Серия 22 47 015-9 2000	Eppendorf
Пипетка 10-100 мкл	Серия 22 47 020-5 2000	Eppendorf
Пипетка 50-200 мкл	Серия 22 47 025-6 2000	Eppendorf
Пипетка 100-1000 мкл	Серия 22 47 030-2 2000	Eppendorf
Наконечники 1250 мкл Matrix	Кат. № 8255	Matrix
Наконечники 200 мкл Matrix	Кат. № 7275	Matrix
Наконечники 10 мкл ART	Кат. № 2140	Molecular Bioproducts
Наконечники 20 мкл ART	Кат. № 2149Р	Molecular Bioproducts
Наконечники 100 мкл ART	Кат. № 2065Е	Molecular Bioproducts
Наконечники 200 мкл ART	Кат. № 2069	Molecular Bioproducts
Наконечники 1000 мкл ART	Кат. № 2079Е	Molecular Bioproducts
Электронная пипетка, Impact2	Кат. № 2001	Matrix
Микроцентрифужные пробирки, не содержащие РНКазы, 1,5 мл	Кат. № 12450	Ambion
Полипропиленовые пробирки, 14 мл	Кат. № 352059	Falcon
Емкость для реагентов, 25 мл	Кат. № 8096	Matrix
96-луночный планшет для реакций	Кат. № N801-0560	Applied Biosystems
Оптические полоски с крышками	Кат. № N80 1-0935	Applied Biosystems
Одноразовые стерильные покрытия	Кат. № 9515-Е	Baxter
Reагенты	Порядковый №.	Поставщик
Кислота	0,1N HCl	Fisher
RNaseZap	Кат. № 9780	Ambion
RNase away	Кат. № 7005	Molecular Bioproducts
10-pak, набор основных реагентов для OT-ШИР EZ.	Кат. № 403028	Applied Biosystems

5x реакционный буфер, 25 мМ ацетат магния, дезокси-НТФы.		
Зонд VIC NEO, 2 мкМ (=10x), 550 мкл на аликвоту	Кат. № 450003, изготовлен на заказ, 5'-VIC-CTG TGG CCG GCT GGG TGT GG-TAMRA -3' (SEQ ED NO: 2)	Applied Biosystems
Зонд VIC BVDV, 2 мкМ (=10x), 550 мкл на аликвоту (Vertex)	Кат. № 450003, изготовлен на заказ, 5'-VIC-CCC TCG TCC ACG TGG CAT CTC GA-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 3)	Applied Biosystems
Прямой праймер NEO, 3 мкМ (=10x) смесь прямой/обратный праймер, 550 мкл на аликвоту	Кат. № 304972, изготовлен на заказ, 5'-CCG CTT TTC TGG ATT CAT CG-3' (SEQ ID NO: 4)	Applied Biosystems
Обратный праймер NEO, 3 мкМ (=10x) смесь прямой/обратный праймер, 550 мкл на аликвоту	Кат. № 4304972, изготовлен на заказ, 5'-CCC ATT CGC CGC CAA-3' (SEQ ID NO: 5)	Applied Biosystems
Прямой праймер BVDV, 3 мкМ (=10x) смесь прямой/обратный праймер, 550 мкл на аликвоту	изготовлен на заказ, 5'-CAG GGT AGT CGT CAG TGG TTC G-3' (SEQ ID NO: 6), масштаб 1,0 мкМ/очистка в геле	Oligos etc
Обратный праймер BVDV, 3 мкМ (=10x) смесь прямой/обратный праймер, 550 мкл на аликвоту	изготовлен на заказ, 5'-GGC CTC TGC AGC ACC CTA TC-3' (SEQ ID NO: 7), масштаб 1,0 мкМ/очистка в геле	Oligos etc
Стандарты РНК NEO	РНК, транскрибированная <i>in vitro</i> с плазмидой, содержащей часть гена neo РНК репликона HCV с использованием РНК-полимеразы E7. Транскрибированную <i>in vitro</i> РНК количественно оценивают на основе известной молекулярной массы транскриптов и УФ-оптической плотности раствора очищенного транскрипта. Полученную РНК разбавляют, делят на аликвоты и хранят при -80°C. Отдельные аликвоты размораживают для каждого анализа TaqMan®.	
Подлежащие тестированию образцы РНК, выделенные из клеток, несущих репликон HCV (раздел 2 данного протокола), 10 мкл/96-луночный планшет		
Вода, не содержащая нуклеаз (не обработанная DEPC)	Кат. № 9930	Ambion

3.4.2. Подготовка реагентов для исходной смеси.

3.4.2.1. Очищают лабораторный стол в две стадии, указанные ниже, и протирают пипетки RNase away.

RNase Zap (Ambion, Austin, TX).

RNase Away (Molecular Bioproducts, San Diego, CA).

3.4.2.2. Открывают основные реагенты для ОТ-ПЦР EZ (Applied Biosystems) и помещают 5 × буфер на лед, замороженные реагенты размораживают при комнатной температуре примерно в течение 15 мин и затем помещают их на лед. Один набор реагентов для ОТ-ПЦР EZ можно использовать для анализа экстракций РНК в двух 96-луночных планшетах.

3.4.2.3. Вынимают одну пробирку с 2 мкМ зондом VIC (NEO или BVDV, 550 мкл на пробирку) из -20°C и помещают на лед.

3.4.2.4. Вынимают одну пробирку с 3 мкМ смесью прямого/обратного праймера (NEO или BVDV, 550 мкл на пробирку) из -20°C и помещают на лед.

3.4.2.5. Вынимают одну пробирку (30 мкл) стандартов РНК-транскриптов (10^8 копий/10 мкл) из -80°C и помещают на лед.

3.4.2.6. Берут одну пробирку с водой Ambion комнатной температуры.

3.4.3. Компоновка исходной смеси для реакции в одном 96-луночном планшете.

3.4.3.1. Используют пипетку на 1 мл, чтобы перенести 5×буфер (Applied Biosystems) в пробирку объемом 14 мл; общий добавленный объем составляет 1100 мкл.

3.4.3.2. Используют пипетку на 1 мл, чтобы добавить 25 мМ Mn(OAc)₂ (Applied Biosystems) в пробирку объемом 14 мл; общий добавленный объем составляет 660 мкл.

3.4.3.3. Используют пипетку на 200 мкл, чтобы добавить 165 мкл 10 мМ dATP в пробирку объемом 14 мл. То же самое делают с 10 мМ dCTP, 20 мМ dUTP и 10 мМ dGTP.

3.4.3.4. Используют пипетку на 1 мл, чтобы добавить 550 мкл 10×3 мкМ смеси прямой/обратный праймер.

3.4.3.5. Используют пипетку на 1 мл, чтобы добавить 550 мкл 10×2 мкМ зонда.

3.4.3.6. Используют пипетку на 1 мл, чтобы добавить 220 мкл ДНК-полимеразы rTth (Applied Biosystems).

3.4.3.7. Используют пипетку на 100 мкл, чтобы добавить 55 мкл AmpErase UNG (Applied Biosystems).

3.4.3.8. Используют пипетку на 1 мл, чтобы добавить 605 мкл H₂O Ambion в пробирку объемом 14 мл; конечный объем составляет всего 4400 мкл.

3.4.3.9. Переносят 4400 мкл исходной смеси в емкость для реагентов объемом 25 мл.

3.4.3.10. Распределяют по 40 мкл на лунку во все 96 лунок, используя 8-канальную пипетку.

3.4.3.11. Переносят 10 мкл экстрагированных неизвестных образцов в лунки планшета для реакций, используя 8-канальную пипетку, колонку за колонкой, с 1 колонки по 11 колонку. После переноса каждую колонку закрывают крышками.

3.4.3.12. Добавляют 270 мкл H₂O Ambion к 30 мкл транскрипта РНК 10⁸ копий/10 мкл для использования в случае стандартной кривой и перемешивают. Теперь имеется 10⁷ копий стандартной РНК для количественного анализа репликона HCV/10 мкл.

3.4.4. Установка ABI 7700 для каждого прогона.

3.4.4.1. Перед каждым прогоном перезагружают компьютер для ABI 7700 и заново компонуют рабочий стол.

3.4.4.2. Закрывают и удаляют любые лишние программы в накопителе на жестком диске; переполнения данных удаляют в корзину.

3.4.4.3. Открывают программу детектора последовательностей v1.7 (компьютерная программа SDS).

3.4.4.5. Открывают папку «Ход анализа репликонов».

3.4.4.6. Открывают матричный диск «Анализ репликонов». Условия термоциклира, запрограммированные на матрице, представляют собой следующее:

Стадия 1: 50°C в течение 2 мин.

Стадия 2: 60°C в течение 30 мин.

Стадия 3: 95°C в течение 5 мин.

Стадия 4: 95°C в течение 15 с.

Стадия 5: 60°C в течение 60 с.

Количество циклических повторов стадий 4-5: 40.

Матричное устройство:диагностика:дополнительные опции:

Выбранное представление: показ mse.

Выбранное представление: показ наилучшей подгонки.

Выбранное прочее: эталонный краситель ROX.

3.4.4.7. Файл «сохраняют» (но не «сохраняют как») в папке «Ход анализа репликонов».

3.4.4.8. Раскрывают установку: нажимают RUN.

3.5. Подготовка данных ABI7700 после выполнения анализа с использованием компьютерной программы SDS.

3.5.1. Анализируемые планшеты вынимают из ABI7700 и выбрасывают, даже не открывая. Это значительно уменьшает лабораторные проблемы, связанные с перекрестным загрязнением ПЦР.

3.5.2. Данные анализируют с использованием компьютерной программы системы регистрации последовательностей V1.7.

3.5.3. Пороговые уровни сначала устанавливают, используя установки по умолчанию.

3.5.4. Критерии выбраковки данных: данные отдельных точек или серии целых планшетов могут быть забракованы. Данные можно отбраковать в том случае, если имеется значительное отклонение от протокола, недостаток реагента или случайная ошибка, связанная с реагентом, или сбой в работе ABI7700. Для выбраковки каких-либо точек данных из очевидно нормального прохождения анализа, должен выполняться один или несколько из указанных критериев.

3.5.4.1. Расчеты порогового цикла. Обычно используют значения по умолчанию для компьютерной программы SDS. Если Ct наиболее концентрированного образца меньше 15, то при необходимости изменяют конечный предел порогового значения до более низкого значения, так чтобы Ct образца с самой высокой концентрацией было выше, чем конечный предел. После выполнения такого изменения корректируют расчеты.

3.5.3.2. Решают вопрос о выбраковке всего неправильного прогона TaqMan®, о котором свидетель-

ствует отклонение от средних значений для наклона и отрезка, отсекаемого на оси у графиком, получаемым при анализе стандартов РНК neo. Допустимыми пределами таких значений являются: значения наклона должны быть в пределах от 3,0 до 3,6; количество циклов, соответствующее отрезку, отсекаемому на оси у, должно составлять от 36 до 41 цикла.

3.5.4.3. Отклоняющиеся от нормы отдельные лунки TaqMan®, о чем свидетельствует экстремальное значение Rn/ARn, можно исключить перед анализом данных с тем, чтобы они не влияли на расчеты компьютерной программы SDS.

3.5.4.4. Проверяют и регистрируют значения Ct нематричных контролей и подтверждают, что они >7,0 Ct (>100X), выше, чем Ct для любого обработанного соединением образца.

3.5.5. Значения Ct стандартов РНК HCV сравнивают с полученными ранее результатами.

3.5.6. Кривую для стандарта РНК HCV сравнивают с полученными ранее результатами.

3.5.7. Если в отдельных лунках имеет место явная отклоняющаяся от нормы амплификация, то данные лунки идентифицируют и помечают.

3.5.8. Файл «результаты» экспортируют и переносят из компьютера 7700 в другой компьютер для анализа с использованием Microsoft Excel.

3.5.9. Сообщают о любых из следующих изменений в приготовлениях реагентов или разведениях.

Синтез нового зонда или праймера от поставщика.

Новое разведение зонда или праймера и аликвоты.

Новый препарат стандартов РНК-транскриптов.

Новое разведение стандартов РНК-транскриптов и аликвоты.

Новый вирусный препарат BVDV.

Новый препарат стандартов колонки 11.

3.6. Анализ данных TaqMan®.

3.6.1. Копируют и вставляют номер Ct HCV TaqMan® и количество копий из файла результатов TaqMan® в соответствующие ячейки Microsoft Excel macro для анализа данных исследования репликов, и запускают макрокоманду.

3.6.2. Копируют таблицу результатов TaqMan® из макролиста на другой лист, вводят серийный номер соединения и номер партии.

3.6.3. На основе указанного листа excel будет рассчитано среднее значение, стандартное отклонение и процент CV ингибирующей активности соединения, а также число копий HCV, номер Ct HCV Ct и номер Ct BVDV (если имеется) для всех точек разведения в 5 повторах и контроля, не содержащего соединения.

3.6.4. Критерии выбраковки данных и выполнения контрольного TaqMan® BVDV. Проверяют все расчеты. Данные отдельных точек или серии целых планшетов могут быть забракованы. Данные можно отбраковать в том случае, если имеется значительное отклонение от протокола, недостаток реагента или случайная ошибка, связанная с реагентом, или сбой в работе ABI7700. Для выбраковки каких-либо точек данных из очевидно нормального прогона должен выполняться один или несколько из указанных критериев. Стандартное отклонение ингибирования в процентах должно составлять менее 30% для активных соединений. % CV количества копий HCV должен составлять менее 30%. Стандартное отклонение Ct HCV всех образцов должно быть меньше 0,5; в большинстве образцов обычно оно составляет примерно от 0,1 до 0,3. Если стандартное отклонение Ct HCV составляет более 0,5, то возвращаются к таблице необработанных данных и проверяют номера Ct 5 повторов. Если номер Ct для какой-либо одной лунки отличается на 2 Ct от среднего номера Ct 5 повторов, то указанную лунку следует исключить из анализа. Если более 3 лунок (не в одной и той же колонке) имеют необычные номера Ct, то необходимо провести анализ внутреннего контроля TaqMan® BVDV. Если результаты, полученные для BVDV неравномерны, то соединение необходимо тестировать заново.

3.6.5. Расчет IC₅₀: копируют и вставляют данные среднего значения ингибирования и стандартного отклонения в симмоидальную кривую доза-ответ с помощью устройства, рассчитывающего различные наклоны кривой, которое использует способы нелинейной регрессии. Используя указанное устройство, рассчитывают IC₅₀, используя каждый из двух способов: фиксирование только верхнего предела на уровне 100% ингибирования, или фиксирование верхнего предела на уровне 100% ингибирования и нижнего предела на уровне 0% ингибирования. Затем отмечают способ, который дает самую точную подгонку, для каждого соединения. Наиболее достоверное значение IC₅₀ получают из расчета с наименьшей стандартной ошибкой. Если IC₅₀, рассчитанные на основе указанных двух вариантов подгонки кривых, демонстрируют различие, превышающее однократное, или если SD IC₅₀ больше чем IC₅₀, соединение следует тестировать заново с корректировкой концентраций.

Расчет влияния ингибиторов сериновой протеазы HCV в комбинации с интерферонами

Влияние ингибитора сериновой протеазы HCV (HSPI) и интерферона в комбинации можно оценить в анализе репликонов, получая кривую «доза-ответ» для HSPI в присутствии различных уровней интерферона, или определяя кривую «доза-ответ» для интерферона в присутствии различных уровней HSPI. Цель заключается в том, чтобы оценить, будет ли иметь место большее или меньшее ингибирование на-

копления вирусной РНК, чем ожидалось бы, если бы два лекарственных средства оказывали аддитивное действие на РНК. Более конкретно, используют определение аддитивности по Lowe ((1928) Die Quantitation Probleme der Pharmakologic, Ergebni. Physiol, 27, 47-187). Аддитивность определяют следующим образом. Пусть $D_{E,INF}$ означает концентрацию интерферона, результатом которой является эффект E, и пусть $D_{E,HSPI}$ означает концентрацию ингибитора протеазы, результатом которой является эффект E.

$$1 = \frac{D_1}{D_{E,INF}} + \frac{D_2}{D_{E,HSPI}} \quad (1)$$

Тогда отсутствие взаимодействия или аддитивность Lowe выражается следующим соотношением, где комбинация концентрации D_1 INF и D_2 HSPI дает эффект E.

Степень синергизма или антагонизма выражают кривыми изоэффекта или изоболами. Комбинация (D1,D2) представляет собой точку на графике, где на осях представлены концентрации интерферона и HSPI (фиг. 2). Все такие комбинации, который дают уровень эффекта E, образуют изоболу эффекта E. Обязателен случай, когда ($D_{E,INF}, 0$) и (0, $D_{E,HSPI}$) являются точками изоболы. Изоболы представляют собой прямые линии, связывающие точки ($D_{E,INF}, 0$) и (0, $D_{E,HSPI}$), когда удовлетворяется соотношение аддитивности (1).

Изоболы, вогнутые вверх, свидетельствуют о синергизме, а изоболы, вогнутые вниз, свидетельствуют об антагонизме. Следуя руководствам Berenbaum, M. C. ((1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. J. Theor. Biol., 114, 413-431) и Greco, Park and Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1-B-D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327), добавляют член к (1), чтобы рассчитать синергизм или антагонизм. Уравнение задает поверхность ответов, которую можно подогнать для контрольных процентных значений при всех комбинациях обработки. Точки контура из указанной подогнанной поверхности ответов представляют изоболы.

Модель поверхности ответов предполагает сигмоидальную зависимость «доза-ответ» для каждого соединения, определяемую (2).

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + \left(\frac{[Drug]}{IC50} \right)^m} + B \quad (2)$$

Концентрации, которые дают конкретный уровень активности E по отдельности, выражаются уравнениями (3).

$$D_{E,INF} = IC50_{INF} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B} \right)^{1/m_{INF}} \quad D_{E,HSPI} = IC50_{HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B} \right)^{1/m_{HSPI}} \quad (3)$$

Чтобы удовлетворять модели Greco et al. (1990), комбинированное действие лекарственных средств должно удовлетворять уравнению (4) для каждой комбинации лекарственных средств, которая дает уровень ответа E.

$$1 = \frac{[INF]}{IC50_{INF} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B} \right)^{1/m_{INF}}} + \frac{[HSPI]}{IC50_{HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B} \right)^{1/m_{HSPI}}} + \frac{\alpha [INF][HSPI]}{IC50_{INF} IC50_{HSPI} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B} \right)^{1/2m_{INF}} \left(\frac{E - B}{E_{\max} - E + B} \right)^{1/2m_{HSPI}}} \quad (4)$$

Параметр α является мерой количества взаимодействия. Нулевое значение альфа означает отсутствие взаимодействия или аддитивность, так как уравнение сводится к (1) при $\alpha = 0$. Если даны IC_{50} , наклоны Хилла (m), максимальное значение (E_{\max}) и минимальное значение (B), данное уравнение можно решить, получив эффект, являющийся результатом любой комбинации обработок [INF] и [HSPI]. Следовательно, данное уравнение задает поверхность ответов. Если имеется эксперимент, где [INF] и [HSPI] варьируют, то параметры можно выбрать с использованием нелинейной регрессии на основе метода взвешенных наименьших квадратов. Параметр α может быть связан с показателем синергизма S (Hewlett, P. S. (1969) Measurement of potencies of drug mixtures. Biometrics, 25, 477-487), который определяют непосредственно на основе изобол при 50% эффекте. S представляет собой отношение расстояния от начала координат до изоболы, определяющей аддитивность, к расстоянию от начала координат до изоболы подгоняемых данных, вдоль прямой, проходящей под углом в 45° относительно осей. (S=ON/OM, см. фигуру 3). Зависимость представляет собой $\alpha = 4(S^2 - S)$.

Способ, обсуждаемый в Greco et al. (1990), выше, для подгонки поверхности ответов и определения параметра синергизма α и уровня его значимости дает оценку степени синергизма в серии экспериментов, в которых тестируют HSPI в комбинации с несколькими различными интерферонами. Однако существует необходимость взвесить результаты наблюдений с более низкими оценками в большей степени, чем с более высокими оценками. Оценки прямо связаны с процентом в контроле, который представляет

эффект E. Используя способы, описанные в Carroll, R.J. and Rupert, D. ((1988) (*Transformation and Weighting in Regression*, Chapman and Hall, New York), можно увидеть, что вариабельность от лунки к лунке увеличивается с увеличением квадрата среднего значения процента в контроле. Поэтому результатам наблюдений по одному приписываются веса по введенному в квадрат подогнанному значению процента в контроле (E). Дисперсия и взвешивание, используемые для анализа указанных экспериментов, не противоречат зависимостям изменчивости, наблюдавшимися исследователями, изучающими способы анализа исследований радиолигандов (Finney, D. J., (1976), *Radioligand Assay*, Biometrics, 32, 721-740, и Dudley, R. A. Edwards, P., Ekins, R.P., McKinzie, I. G. M., Raab, G.M., Rodbard, D. and Rodgers, R.P.C. (1985), *Guidelines for Immunoassay Data Processing*, Clinical Chemistry, 31/8, 1264-1271).

Результаты

В исходном эксперименте ингибитор сериновой протеазы HCV, соединение CU, тестируют в пределах концентраций от 3 до 0,0123 мкМ, т.е. в 244-кратном диапазоне. Концентрации интерферона-альфа 2B варьируют от 30 единиц в образце до 0,0096 единиц в образце, т.е. в 3125-кратном диапазоне. Как показано в таблице 7, при использовании в качестве единственного лекарственного средства для обработки соединение CU проявляет IC₅₀, равное 0,48 мкМ, а интерферон - IC₅₀, равное 2,19 ед. В пределах погрешности анализа репликонов, которое составляет примерно 20%, добавление интерферона-альфа 2B приводит к увеличению ингибирования накопления РНК репликона дозозависимым образом. Например, обработка клеток 0,333 мкМ соединения CU приводит к 28% ингибированию накопления РНК репликона. Обработка клеток комбинацией 0,333 мкМ соединения CU, что составляет 71% дозы IC₅₀ (0,469 мкМ), и 0,24 ед. интерферона-альфа 2B, что составляет 11% IC₅₀ интерферона-альфа 2B (2,05 мкМ) приводит к 49% ингибированию накопления РНК репликона. Таким образом, 71% дозы IC₅₀ одного соединения в комбинации с 11% другого приводят к 49% ингибированию накопления РНК репликона. Используя интуитивный подход к определению того, является ли комбинированная обработка синергической или аддитивной, или антагонистической, можно предположить, что если бы эффект комбинированной обработки был только аддитивным, то следовало бы ожидать, что объединяемые фракции двух доз IC₅₀, необходимые для получения 49% ингибирования накопления РНК репликона, составляли бы 98%. Экспериментальные результаты авторов изобретения показывают, что уровень ингибирования накопления РНК репликона достигается с использованием 71% плюс 11%, т.е. 82% дозы IC₅₀, а не 98%, как рассчитано для случая аддитивных эффектов комбинированной обработки. Таким образом, при указанных концентрациях соединений эффект, по-видимому, является синергическим, так как используют меньшие дробные дозы IC₅₀ каждого соединения для получения 49% ингибирования РНК репликона HCV, чем требовалось бы в случае использования любого из соединений по отдельности, когда было бы необходимо 98% доз IC₅₀. Результаты комбинированной обработки показаны в табл. 8 и графически на фиг. 1.

Таблица 7. Ингибирование накопления РНК репликона после 48-часовой обработки соединением CU и интерфероном-альфа 2B отдельно или в комбинации

Соединение CU (конц.)	Интерферон-альфа 2B (единицы)						
	30 У	6 У	1,2 У	0,24 У	0,048 У	0,0096 У	0 У
3 мкМ	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%
1 мкМ	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
0,333 мкМ	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
0,1111 мкМ	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0,0370 мкМ	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0,0123 мкМ	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0 мкМ	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%

Представленные исходные результаты, полученные, как указано ранее, с использованием анализа репликона *in vitro* и простого анализа аддитивности данных, полученных в данном анализе, показывают, что комбинированная обработка клеток, несущих репликон, ингибитором сериновой протеазы HCV и интерфероном дает, по меньшей мере, аддитивный антивирусный эффект и, по-видимому, синергический антивирусный эффект.

Приведенные выше данные повторно анализировали, используя формальные математические способы, описанные выше для того, чтобы определить, является ли взаимоотношение между ингибитором CU сериновой протеазы HCV и интерфероном-альфа-2B синергическим, аддитивным или антагонистическим. Повторный анализ данных показан в числовом выражении в табл. 8 и графически на фиг. 4.

В табл. 8 суммированы дополнительные результаты, полученные в анализе репликонов после обработки клеток, содержащих репликон, в течение 48 ч различными ингибиторами сериновой протеазы HCV согласно данному изобретению и несколькими разными интерферонами, отдельно или в комбинации. Авторы обращают внимание, что стандартное отклонение значений, измеренных для ингибирования РНК репликона HCV в анализе репликона, составляет ~20%. Соединения тестируют в широком диапазоне концентраций и при более низких концентрациях соединения, которые не вызывают существенного ингибирования концентрации РНК репликона HCV. Поскольку стандартное отклонение в анализе составляет ~20%, в некоторых точках данные будут давать отрицательные числа. Отрицательные числа

ингибиования свидетельствуют о том, что в конкретном эксперименте в образцах, обработанных соединением, в среднем больше молекул РНК репликона HCV, чем в должно обработанных образцах.

Таблица 8. Ингибиование накопления РНК репликона после 48-часовой обработки ингибиторами сериновой протеазы HCV и различными интерферонами отдельно или в комбинации

Эксперимент 1

IFN альфа-2B (единицы)

	30.00	6.00	1.20	0.24	0.048	0.0096	0.000
Соединение CU (мкМ)	0.000	89%	73%	38%	16%	8%	12%
	0.012	92%	78%	44%	20%	19%	19%
	0.037	92%	78%	44%	21%	2%	7%
	0.111	93%	79%	46%	29%	12%	15%
	0.333	94%	87%	66%	49%	33%	27%
	1.000	99%	98%	96%	95%	92%	93%
	3.000	99%	99%	99%	99%	98%	98%

Эксперимент 2

IFN альфа-2A (единицы)

	30	6	1.2	0.24	0.048	0.0096	0
Соединение CU (мкМ)	0	86%	61%	27%	4%	-7%	5%
	0.0123	87%	66%	17%	-23%	8%	8%
	0.37	85%	62%	13%	-2%	0%	-1%
	0.1111	87%	68%	37%	20%	-6%	12%
	0.333	92%	77%	58%	41%	26%	25%
	1	98%	96%	90%	86%	84%	83%
	3	99%	99%	98%	98%	98%	98%

Эксперимент 3

Соединение CU (мкМ)

	3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0
Интерферон альфа-2В (единицы)	0	98%	93%	62%	23%	12%	-2%	-4%	-2%
	0.049	98%	95%	70%	39%	12%	2%	6%	9%
	0.123	98%	95%	70%	43%	15%	7%	2%	5%
	0.307	98%	95%	73%	46%	16%	14%	7%	19%
	0.768	98%	95%	82%	56%	43%	34%	28%	32%
	1.920	98%	98%	87%	71%	51%	54%	49%	52%
	4.8	99%	98%	92%	82%	74%	71%	69%	71%
	12.0	99%	98%	96%	89%	87%	85%	85%	80%
	30.0	99%	99%	98%	95%	93%	92%	93%	89%

Эксперимент 4

Соединение CU (мкМ)

	3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0
Интерферон альфа-2А (единицы)	0	98%	94%	74%	38%	17%	3%	-1%	6%
	0.049	98%	93%	60%	22%	29%	21%	-9%	-6%
	0.123	98%	93%	67%	29%	21%	12%	3%	2%
	0.307	98%	93%	66%	29%	22%	4%	-3%	-4%
	0.768	98%	95%	67%	46%	24%	21%	20%	9%
	1.920	98%	96%	73%	48%	43%	44%	27%	33%
	4.8	98%	97%	82%	61%	61%	59%	52%	55%
	12.0	99%	98%	91%	75%	76%	72%	71%	74%
	30.0	99%	98%	96%	89%	86%	85%	84%	83%

Эксперимент 5
Соединение СУ (мкМ)

	3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0
	98%	95%	65%	24%	-1%	-14%	-14%	-12%	0
0.0	97%	95%	72%	41%	17%	11%	12%	6%	17%
0.9375	97%	95%	71%	40%	31%	18%	18%	11%	4%
Интерферон овечий tau (единицы)	1.875	97%	95%	71%	40%	31%	18%	11%	4%
3.75	98%	96%	75%	44%	38%	25%	34%	18%	17%
7.5	98%	96%	82%	61%	42%	37%	25%	26%	36%
15	98%	97%	84%	64%	59%	61%	56%	51%	53%
30	98%	98%	90%	79%	72%	68%	65%	68%	68%
60	98%	98%	93%	87%	80%	80%	74%	77%	82%
120	98%	98%	95%	92%	86%	87%	86%	86%	87%

Эксперимент 6
Соединение ЕС (мкМ)

	3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0
	96%	93%	81%	56%	29%	23%	19%	1%	0
0	96%	92%	80%	60%	31%	15%	19%	29%	6%
0.0492	96%	94%	78%	58%	32%	13%	20%	20%	4%
0.1229	97%	95%	82%	60%	38%	32%	34%	42%	23%
Интерферон альфа-2B (единицы)	0.3072	97%	95%	87%	66%	43%	41%	46%	43%
0.768	97%	95%	87%	66%	43%	41%	46%	43%	25%
1.92	98%	97%	90%	73%	62%	51%	54%	58%	47%
4.8	98%	97%	94%	87%	76%	73%	78%	76%	69%
12.0	98%	98%	96%	92%	86%	86%	86%	85%	84%
30.0	98%	98%	96%	96%	93%	92%	92%	95%	91%

Эксперимент 7
Соединение ЕС (мкМ)

	3.0	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.02344	0
	96%	92%	81%	47%	28%	17%	-1%	-8%	0
0	96%	93%	78%	58%	21%	8%	-12%	10%	-17%
0.0492	95%	93%	79%	64%	14%	5%	14%	7%	-22%
0.1229	95%	91%	80%	64%	22%	15%	5%	2%	-5%
Интерферон альфа-2A (единицы)	0.3072	96%	95%	81%	64%	34%	21%	19%	20%
0.768	96%	95%	81%	64%	34%	21%	19%	20%	4%
1.92	96%	95%	88%	78%	44%	41%	19%	33%	21%
4.8	97%	95%	91%	85%	60%	58%	60%	53%	49%
12.0	97%	97%	95%	91%	77%	72%	76%	70%	71%
30.0	98%	98%	97%	94%	91%	86%	85%	85%	84%

Эксперимент 8
Соединение СУ (мкМ)

	3.0	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.02344	0
	97%	95%	77%	34%	16%	6%	-7%	0%	0
0	98%	97%	83%	49%	31%	19%	-21%	-7%	1%
0.2344	98%	96%	84%	56%	39%	27%	10%	-3%	21%
Интерферон бета (единицы)	0.4688	98%	97%	91%	73%	54%	42%	31%	15%
0.9375	98%	98%	95%	80%	65%	58%	65%	60%	60%
1.875	98%	98%	95%	80%	65%	58%	65%	60%	60%
3.75	98%	98%	97%	92%	86%	81%	77%	73%	79%
7.5	99%	98%	98%	96%	93%	93%	93%	90%	92%
15.0	99%	99%	99%	97%	97%	96%	97%	95%	96%
30.0	99%	99%	99%	99%	98%	99%	98%	98%	97%

Эксперимент 9

Соединение EP (α)										
	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0	
	0	94%	96%	96%	92%	64%	36%	23%	8%	0
	0.0492	95%	96%	96%	91%	67%	25%	28%	8%	3%
	0.1229	95%	97%	96%	91%	65%	44%	4%	11%	4%
Интерферон альфа-2B (единицы)	0.3072	95%	97%	96%	91%	71%	46%	20%	8%	20%
	0.7680	96%	97%	97%	93%	75%	49%	36%	24%	24%
	1.92	96%	97%	97%	94%	82%	67%	49%	52%	54%
	4.8	96%	98%	97%	96%	90%	79%	75%	75%	70%
	12	97%	98%	98%	97%	94%	89%	89%	87%	83%
	30	97%	98%	98%	96%	94%	94%	95%	95%	92%

Эксперимент 10
Рибазирин (мкМ)

	200	80	32	12.8	5.12	2.048	0.8192	0.3277	0	
	0	85%	62%	43%	3%	-8%	-17%	-22%	-6%	0
	0.0492	87%	66%	48%	44%	11%	-4%	-10%	11%	-7%
	0.1229	84%	64%	53%	40%	26%	-12%	-5%	11%	-9%
Интерферон альфа-2B (единицы)	0.3072	86%	70%	62%	44%	28%	1%	6%	14%	7%
	0.7680	90%	80%	72%	65%	38%	30%	28%	44%	29%
	1.92	93%	85%	77%	76%	61%	57%	58%	50%	46%
	4.8	96%	92%	87%	83%	82%	74%	71%	77%	72%
	12	97%	95%	93%	91%	90%	89%	90%	89%	85%
	30	98%	97%	96%	95%	94%	94%	93%	95%	94%

Как показано на фиг. 4-13, на которых графически изображены данные табл. 8, нанесенные с использованием описанного выше математического способа измерения синергизма, изоболические кривые для всех комбинаций ингибиторов сериновой протеазы HCV и тестированных интерферонов вогнуты вверх, что свидетельствует о том, что антивирусное действие обработок в анализе репликонов является синергическим. Полученные результаты сведены в табл. 9, в которой показаны относительные уровни синергизма для комбинированной обработки и значения IC₅₀ для антивирусных соединений, используемых отдельно. Ключевыми элементами в табл. 9 являются значения α и значения p для определений. Элемент α является мерой максимального изгиба изоболической кривой для каждой комбинированной обработки. Значение α, равное нулю, свидетельствует об аддитивности, отрицательное значение свидетельствует об антагонизме и в случае комбинированной обработки ингибиторами сериновой протеазы HCV и интерферонами, указанной выше, значение большее единицы свидетельствует о синергизме. Чем больше параметр α, тем больше синергизм. Как показано в табл. 9 для комбинаций ингибиторов сериновой протеазы HCV и интерферонов, даже при игнорировании уровней значимости в каждом эксперименте, t-критерий на основании 9 экспериментов при среднем значении α равном 0 (нет взаимодействия) имеет значение p, равное 0,00014, свидетельствуя о том, что результаты высоко достоверны.

Расчет синергизма методом Greco Rustom (1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327), используемый в данном анализе, является идеальным средством оценки характера экспериментальных данных, которые могут быть получены с использованием анализа репликонов HCV. Существуют другие способы, которые применяют для исследования антивирусных соединений, такие как способ Pritchard and Shipman (Pritchard, M.N., and Shipman, C.Jr., 1990) "A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions (review)," Antiviral Res. 14:181-206). Применение способа расчета синергизма этих авторов к данным, показанным в табл. 8, также свидетельствует о том, что комбинированная обработка клеток, несущих репликон, ингибитором сериновой протеазы HCV и интерфероном приведет к синергическому ингибированию накопления РНК репликона HCV (данные не показаны).

Таблица 9. Относительные уровни синергизма для комбинированной обработки и значения IC_{50} для антивирусных соединений, используемых отдельно

Ингибитор сериновой протеазы HCV (HSPI)	Интерферон	IC_{50} INF (единицы)	IC_{50} HSPI (мкМ)	α (SE) ¹	P- значение $\alpha>0$
Эксперимент 1	Соединение СУ	IFN альфа-2B	2,05	0,469	0,477(0,09) <0,0001
Эксперимент 2	Соединение СУ	IFN альфа-2A	3,72	0,446	0,770(0,12) <0,0001
Эксперимент 3	Соединение СУ	IFN альфа-2B	2,36	0,587	0,730(0,08) <0,0001
Эксперимент 4	Соединение СУ	IFN альфа-2A	5,67	0,633	0,438(0,08) <0,0001
Эксперимент 5	Соединение СУ	IFN tau	13,22	0,605	0,328(0,07) <0,0001
Эксперимент 6	Соединение ЕС	IFN альфа-2B	2,53	0,384	0,516(0,10) <0,0001
Эксперимент 7	Соединение ЕС	IFN альфа-2A	5,50	0,312	1,24(0,20) <0,0001
Эксперимент 8	Соединение СУ	IFN beta	1,82	0,466	0,551(0,09) <0,0001
Эксперимент 9	Соединение ЕР	IFN альфа-2B	30,6	0,426	0,490(0,12) <0,0001
Эксперимент 10	Рибавирин	IFN альфа-2B	1,22	145	-0,24(0,067) 0,0004

(SE) - стандартная ошибка.

Другое измерение для оценки синергической природы анти-HCV-лекарственной обработки с использованием ингибиторов сериновой протеазы HCV и интерферонов состоит в использовании таких же способов, которые описаны выше, для оценки в анализе репликонов современной стандартной комбинированной терапии HCV, т.е. интерферона альфа-2B в комбинации с рибавирином. На последней строке в табл. 9 показано, что параметр α для смеси интерферона альфа-2B и рибавирина является отрицательным числом, что свидетельствует о том, что существует небольшой антагонизм между двумя указанными лекарственными средствами. Это дополнительно подчеркивает значение описанных в данной заявке комбинированных обработок, в которых используются ингибитор сериновой протеазы HCV в комбинации с интерферонами, так как указанные обработки бесспорно обеспечивают синергизм, тогда как стандартная комбинированная терапия, используемая в случае HCV (интерферон альфа-2B в комбинации с рибавирином) не имеет синергического характера в анализе репликонов.

Приведенное выше сравнение комбинированных обработок с использованием описанных в данной заявке ингибиторов сериновой протеазы HCV плюс интерфероны с рибавирином плюс интерферон в анализе репликонов явно свидетельствует о том, что первая обработка имеет синергический характер, а последняя - не имеет.

Результаты экспериментов, полученные с использованием анализа репликонов, свидетельствуют о том, что гораздо меньшие дозы интерферона были бы эффективными в том случае, если интерферон использовать в комбинации с ингибитором сериновой протеазы HCV, чем необходимо при использовании интерферона альфа-2B в комбинации с рибавирином. Анализ репликонов является полезной модельной системой для тестирования потенциальных анти-HCV-соединений и в настоящее время широко признан как эффективное средство прогнозирования анти-HCV-активности. Например, смотри Blight et al. (2000) Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture. Science 8; 290: 1972-1974, и Chung et al. (2001) Hepatitis C virus replication is directly inhibited by IFN- α in a full-length binary expression system. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 98(17): 9847-52. Отдельно рибавирин обладает минимальной эффективностью в снижении накопления РНК репликона HCV в анализе репликонов (табл. 8, эксперимент 10, и последняя строка табл. 9). Полученный результат видимо противоречит исследованиям *in vivo*, в которых сам по себе рибавирин в случае применения не имеет значимого терапевтического значения для лечения HCV. Напротив, в анализе репликонов при корректировке на цитотоксичность, как обсуждается далее, рибавирин имеет IC_{50} , равную 145 мкМ. Полученный результат можно объяснить, приняв во внимание, что при анализе репликонов выполняют оценку высоких концентраций рибавирина, которые не возможны при терапии человека вследствие цитотоксичности *in vivo* (Chutaputti A. (2000) Adverse effects and other safety aspects of the hepatitis C antivirals. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 15 Suppl.: E156-63).

Данная оценка настоятельно требует определения цитотоксичности рибавирина. Такая цитотоксичность имеет место у пациентов и в анализах на клетках (Shiffman M. L., Verbeke S. B., Kimball P. M. (2000) Alpha interferon combined with ribavirin potentiates proliferative suppression but not cytokine production in mitogenically stimulated human lymphocytes. Antiviral Research. 48(2): 91-9). В описанных в данной заявке экспериментах наблюдали и двумя способами измеряли цитотоксичность рибавирина в анализе репликонов. И в метаболическом XTT-анализе для определения жизнеспособности несущих репликон клеток (Roehm N.W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasebrook A. L. (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. Journal of Immunol. Methods. 142(2): 257-65) и в количественном ОТ-ПЦР анализе TaqMan®, в котором измеряют уровни мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) в обработанных по сравнению с необработанными клетками в анализе репликонов (Brink N., Szamel M., Young A.R., Wittem K.P., Bergemann J. (2000) Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and EL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin *in vivo*. Inflammation Research. 49(6): 290-6) наблюдается значительная индуцированная рибавирином цитотоксичность, но ее корректируют следующим образом. Предполагается, что уровень мРНК GAPDH, которая конститу-

тивно экспрессируется геном «хаускипинга», одинаков во всех жизнеспособных клетках. На основе измерений уровней мРНК GAPDH в клетках, обработанных ингибитором транскрипции активномицином D, известно, что время полужизни мРНК GAPDH составляет только несколько часов (данные не показаны). Таким образом, допускается, как это делается другими авторами при использовании методики TaqMan® для определения уровней конкретных мРНК в клетках человека, что уровни мРНК GAPDH пропорциональны количеству жизнеспособных клеток (VCN) в любом данном образце, при этом зависимость имеет вид $VCN = 2^{(40-Ct_{mRNA\ GAPDH})}$. Вычисляют VCN для каждой лунки образцов в анализе репликонов и затем делят число копий РНК репликона HCV для конкретной лунки на VCN для данной лунки. После расчета указанное отношение используют вместо числа копий HCV, чтобы рассчитать ингибирование («Среднее ингибирование с использованием отношения»; фиг. 14А). Без внесения поправки в результаты анализа репликонов на указанную цитотоксичность, такая цитотоксичность регистрируется как ложно позитивное ингибирование накопления РНК репликона HCV. В анализе репликонов предполагается, что измеренное ингибирование накопления РНК репликона HCV представляет собой сумму действительного ингибирования накопления РНК репликона HCV и кажущегося ингибирования накопления РНК репликона HCV вследствие цитотоксичности. Кроме того, на основании близкой корреляции измерений цитотоксичности с помощью XTT и с помощью измерения мРНК GAPDH в TaqMan® предполагается, что ингибирование накопления мРНК GAPDH, вызванное тестируемыми соединениями при анализе репликонов является надежной мерой кажущегося ингибирования накопления РНК-репликона HCV вследствие цитотоксичности. Таким образом, истинную анти-HCV-активность соединения в анализе репликонов, скорректированную на общую цитотоксичность, можно оценить путем деления количества молекул РНК-репликона HCV, измеренного в каждом образце, на VCN, таким образом, нормализуя количество жизнеспособных клеток в каждом образце. На фиг. 14А показана оценка с использованием данного способа истинной анти-HCV-активности рибавирина в анализе репликонов («среднее ингибирование с использованием отношения»). Оценка IC₅₀ для рибавирина лучше всего рассчитывается с использованием указанного способа. На фиг. 14А «среднее исходное ингибирование» показывает нескорректированную IC₅₀ для рибавирина, которая составляет примерно 80 мкМ, тогда как скорректированное значение IC₅₀, рассчитанное на основе кривой «среднее ингибирование с использованием отношения», составляет примерно 145 мкМ. Следует отметить, что различие между скорректированным и измеренным ингибированием накопления РНК-репликона HCV в результате обработки интерфероном альфа-2B (фиг. 14В) незначительно, учитывая ~20% %CV в анализе репликонов. Подобно интерферону альфа-2B ингибиторы сериновой протеазы HCV, тестированные в данном примере, не проявляли значительной цитотоксичности при используемых концентрациях. Это определяли с использованием XTT-анализов, в которых значения TC₅₀ для разных соединений составляют: CU = 64,7 мкМ, EP > 10 мкМ и EC > 50 мкМ. Указанные значения TC₅₀ в 20-140 раз выше, чем значения IC₅₀, показанные в табл. 9. Таким образом, цитотоксичность указанных соединений не оказывает существенного влияния на накопление РНК HCV в анализе репликонов в пределах точности анализа, так как указанная цитотоксичность имеет место только при концентрациях ингибитора сериновой протеазы HCV значительно превышающих концентрации, тестированные при анализе репликонов.

Выводы, касающиеся эффективности ингибиторов сериновой протеазы HCV и интерферонов отдельно и в комбинации

Анти-HCV-активности описанных в данной заявке ингибиторов сериновой протеазы HCV и различных интерферонов, используемых отдельно в анализе репликонов HCV, показаны в столбцах и строках для отдельных экспериментов, составляющих табл. 8, в которых применяли только одно антивирусное средство. В табл. 9 перечислены значения IC₅₀, измеренные для каждого антивирусного соединения в том случае, когда их тестировали по отдельности. Приведенные выше результаты, полученные с применением анализа репликонов *in vitro*, также показали, что комбинированная обработка клеток, несущих репликон, ингибиторами сериновой протеазы HCV согласно данному изобретению и различными интерферонами дает синергические антивирусные эффекты. Ожидается, что полученные эффекты в полной мере будут перенесены на эффективности *in vivo*.

Комбинированная терапия с применением ингибиторов сериновой протеазы HCV согласно данному изобретению имеет несколько основных преимуществ по сравнению с терапией отдельным лекарственным средством. Во-первых, при осуществлении лечения возможными более низкими дозами отдельных лекарственных средств, чем было бы возможно при отдельном использовании, можно ожидать снижения токсичности и побочных эффектов, связанных с лечением. Это особенно важно в случае терапии интерферонами, при которой побочные эффекты являются тяжелыми и, как было показано, пропорциональными дозе, вводимой пациентам. Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что дозу ингибитора сериновой протеазы HCV, такого как CU, на уровне IC₉₅ можно комбинировать с дозой интерферона альфа, например, на уровне IC₅₀, и в результате терапия будет намного более эффективной, чем можно достичь с одним ингибитором сериновой протеазы HCV, без нежелательных побочных эффектов, вызванных высокими дозами интерферона альфа. Второе основное преимущество комбинированной терапии состоит в том, что поскольку два лекарственных средства действуют независимо, то меньше веро-

ятность развития мутантных штаммов HCV, которые устойчивы к лечению. Развитие резистентности является основной заботой в случае РНК-вирусов, подобных HCV. Вследствие высокой скорости их мутаций такие вирусы могут быстро адаптироваться к окружающим стрессовым условиям. Третьим преимуществом комбинированной терапии может быть сниженная стоимость вследствие потребности в меньших количествах терапевтических средств, требуемых для эффективного лечения.

Дополнительные иммуностимуляторы, которые можно применять в способах, описанных в данной заявке, включают, например, альфа-интерферон 2А, интерферон-консенсус, интерферон тау, интерферон + рибавирин (ребатрон), пэгилированный интерферон и промоторы экспрессии гена интерферона. Ожидается, что анти-HCV-активность указанных соединений будет повышена при использовании в комбинации с ингибиторами сериновой протеазы HCV, такими как ингибиторы, описанные в данной заявке. Так как известно, что интерфероны активны *in vivo* и в анализе репликонов, ожидается, что данные ингибиторы сериновой протеазы HCV будут также активными *in vivo*, и что более важно, будут обладать способностью вызывать синергическую активность при использовании в комбинации с интерферонами, стимуляторами иммунной системы или другими соединениями, обладающими антивирусной активностью, направленной против HCV, которые действуют по механизму, отличному от ингибирования сериновой протеазы HCV.

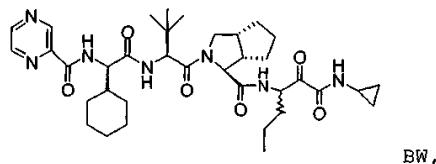
В наилучшем способе терапии HCV в настоящее время используют интерферон альфа и нуклеозидный аналог рибавирин. Указанная обработка эффективна только в небольшой степени и дает существенные побочные эффекты, которые снижают адаптационную способность пациента (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999). Кроме того, у пациентов с трансплантациями не ясно как работает комбинация рибавирин-интерферон, и в действительности может работать хуже, чем один интерферон (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999).

Представленные выше результаты свидетельствуют о синергическом комбинированном действии в том случае, когда интерфероны используют с новым классом антивирусных средств против HCV, ингибиторами сериновой протеазы согласно данному изобретению. Авторы вполне обоснованно ожидают, что описанные в данной заявке результаты *in vitro* приведут к более эффективному лечению пациентов с HCV, чем возможно в настоящее время только с использованием одного интерферона. Субтерапевтические дозы интерферона смогут мобилизовать иммунную систему пациента для лучшей борьбы с вирусом, а ингибитор сериновой протеазы может атаковать непосредственно вирус, что обеспечит атаку на вирус по двум направлениям посредством разных механизмов действия. Таким образом, лечение HCV-инфекции можно осуществлять при более низкой стоимости для пациента как с точки зрения пониженных побочных эффектов, так и более низкой оплаты необходимых фармацевтических средств, так как для эффективной антивирусной терапии, направленной против HCV, обоих лекарственных средств потребуется меньше.

Данное изобретение может быть реализовано в других конкретных формах, не отходя от сути или его важных отличительных признаков.

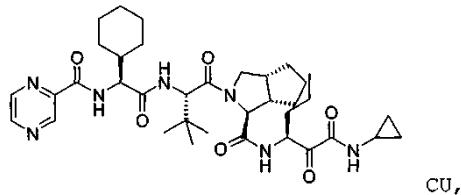
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, или пролекарство, или сольват указанного соединения, его соли или пролекарства.

2. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, или пролекарство, или сольват указанного соединения, его соли или пролекарства.

3. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемое количество соединения по любому из пп. 1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1 или 2, интерферон, обладающий противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, и фармацевтически приемлемые добавки.

лемый носитель.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, дополнительно содержащая соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1 или 2, соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, и фармацевтически приемлемый носитель, где указанное соединение отлично от интерферона.

7. Фармацевтическая композиция по п.5, где указанное соединение по любому из пп.1 или 2, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2В, пэгилированный интерферон-альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2А, лимфобластоидный интерферон и интерферон тау; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединения, усиливающие развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-моноfosфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

9. Применение соединения по п.1 или 2 для получения лекарственного средства для ингибирования протеазы НСВ.

10. Применение соединения по п.1 или 2 для получения лекарственного средства для лечения пациента, страдающего от инфекции, вызванной НСВ, или связанных с инфекцией физиологических состояний.

11. Применение соединения по п.1 или 2 в комбинации с фармацевтически эффективным количеством другого анти-НСВ терапевтического средства для получения лекарственного средства для лечения пациента, страдающего от инфекции, вызванной НСВ, или связанных с инфекцией физиологических состояний.

12. Применение по п.11, где анти-НСВ терапевтическим средством является интерферон или производное интерферона.

13. Применение соединения по п.1 или 2 в комбинации с интерфероном, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гепатита С, у нуждающегося в таком лечении пациента.

14. Применение соединения по п.1 или 2 в комбинации с соединением, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гепатита С, у нуждающегося в таком лечении пациента, где указанное соединение отлично от интерферона.

15. Применение по п.13, где указанное соединение по п.1 или 2 и указанный интерферон, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

16. Применение по п.15, где указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2В, пэгилированный интерферон-альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2А, лимфобластоидный интерферон и интерферон тау.

17. Применение соединения по п.1 или 2 в комбинации с интерфероном, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, и соединением, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики инфекции, вызванной вирусом гепатита С, у нуждающегося в таком лечении пациента, где указанное соединение отлично от интерферона.

18. Применение по п.17, где указанное соединение по п.1 или 2, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

19. Применение по п.18, где указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2В, пэгилированный интерферон-альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2А, лимфобластоидный интерферон и интерферон тау; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединение, усиливающее развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-моноfosфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

20. Применение соединения по п.1 или 2 и интерферона, обладающего противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С для получения лекарственного средства для ингибирования репли-

кации вируса гепатита С в клетке.

21. Применение по п.20, где лекарственное средство дополнительно содержит соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

22. Применение соединения по п.1 или 2 и соединения, обладающего противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона, для получения лекарственного средства для ингибирования репликации вируса гепатита С в клетке.

23. Применение по п.21, где указанное соединение по п.1 или 2, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

24. Применение по п.23, где указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2В, пэгилированный интерферон-альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2А, лимфобластоидный интерферон и интерферон тау; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединение, усиливающее развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

25. Способ ингибирования репликации вируса гепатита С в клетке *in vitro*, включающий контактирование указанной клетки с соединением по п.1 или 2 и интерфероном, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С.

26. Способ по п.25, дополнительно включающий контактирование указанной клетки с соединением, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

27. Способ ингибирования репликации вируса гепатита С в клетке *in vitro*, включающий контактирование указанной клетки с соединением по п.1 или 2 и соединением, обладающим противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

28. Способ по п.26, где указанное соединение по п.1 или 2, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое эффективное количество и их комбинацию.

29. Способ по п.28, где указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2В, пэгилированный интерферон-альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2А, лимфобластоидный интерферон и интерферон тау; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединение, усиливающее развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.

30. Набор, включающий ряд отдельных контейнеров, где по меньшей мере один из указанных контейнеров содержит ингибитор сериновой протеазы вируса гепатита С по п.1 или 2 и по меньшей мере еще один из указанных контейнеров содержит интерферон, обладающий противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С.

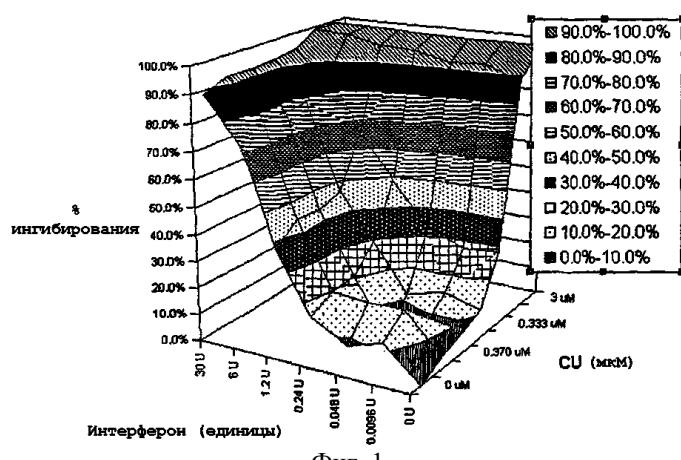
31. Набор, включающий ряд отдельных контейнеров, где по меньшей мере один из указанных контейнеров содержит ингибитор сериновой протеазы вируса гепатита С по п.1 или 2 и по меньшей мере еще один из указанных контейнеров содержит соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

32. Набор, включающий ряд отдельных контейнеров, где по меньшей мере один из указанных контейнеров содержит ингибитор сериновой протеазы вируса гепатита С по п.1 или 2, по меньшей мере еще один из указанных контейнеров содержит интерферон, обладающий противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, и по меньшей мере еще один из указанных контейнеров содержит соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, где указанное соединение отлично от интерферона.

33. Набор по п.32, где указанный ингибитор сериновой протеазы вируса гепатита С, указанный интерферон и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, каждый присутствует в количестве, выбранном из группы, включающей фармацевтически эффективное количество, субклиническое фармацевтически эффективное количество и их комбинацию.

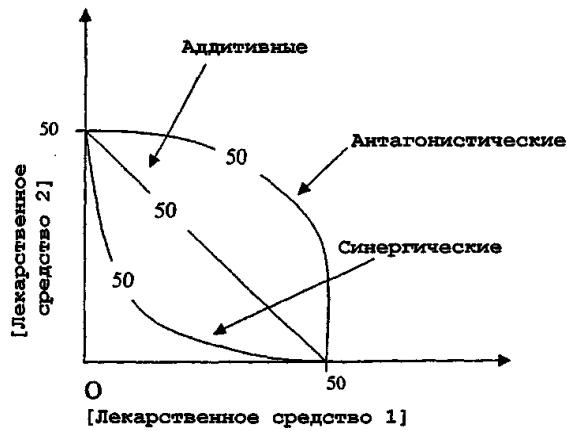
34. Набор по п.33, где указанный интерферон выбирают из группы, включающей интерферон-альфа 2В, пэгилированный интерферон-альфа, согласованный интерферон, интерферон-альфа 2А, лимфобластоидный интерферон и интерферон тау; и указанное соединение, обладающее противовирусной активностью в отношении вируса гепатита С, выбирают из группы, включающей интерлейкин 2, интерлейкин 6, интерлейкин 12, соединение, усиливающее развитие реакции типа 1 Т-хелперных клеток, двунитевую РНК, двунитевую РНК, комплексно связанную с тобрамицином, имиквимод, рибавирин, ингибитор ино-

зин-5'-монофосфатдегидрогеназы, амантадин и римантадин.
Комбинированная обработка интерфероном альфа-2B
и соединением CU

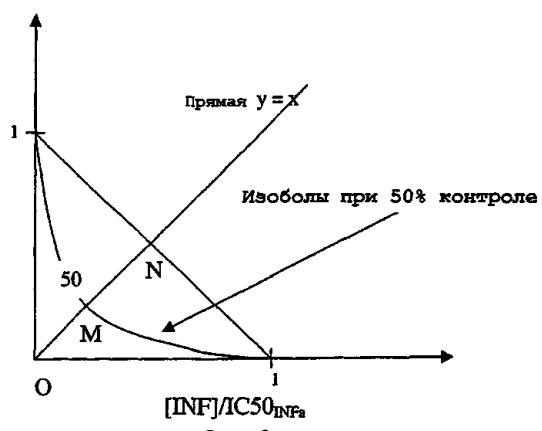


Фиг. 1

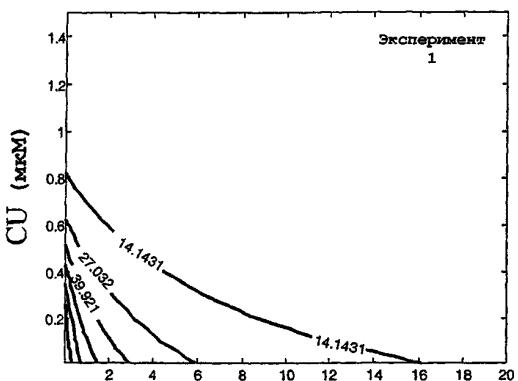
Изоболы при 50% контроле



Фиг. 2

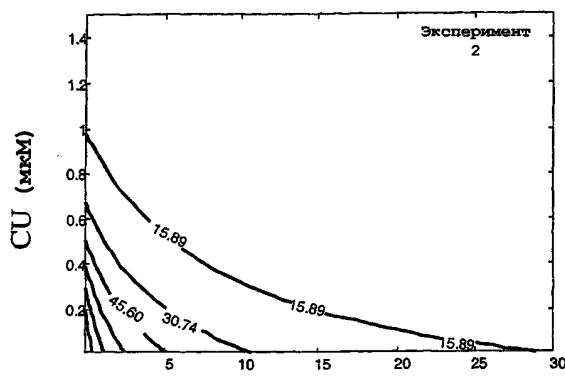
[HSP1]/IC₅₀_{HSP1}

Фиг. 3



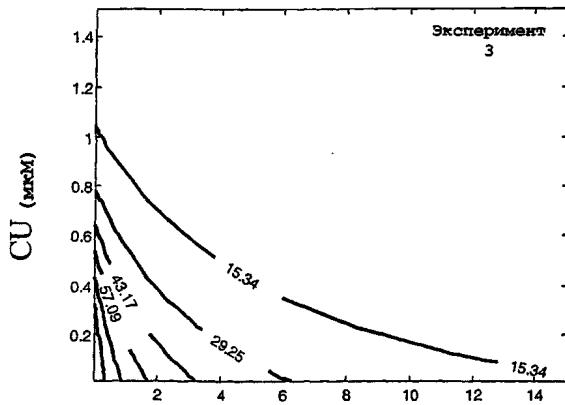
Интерферон альфа-2В (единицы)

Фиг. 4



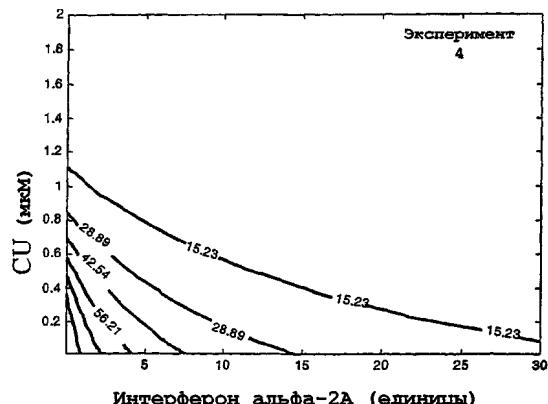
Интерферон альфа-2А (единицы)

Фиг. 5



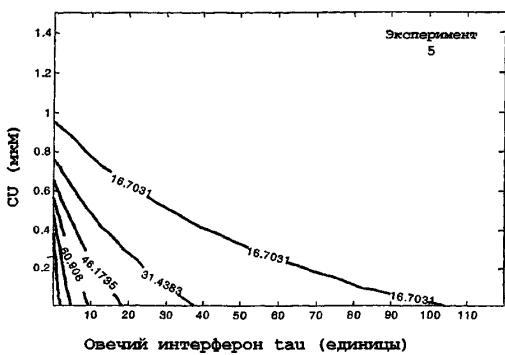
Интерферон альфа-2В (единицы)

Фиг. 6

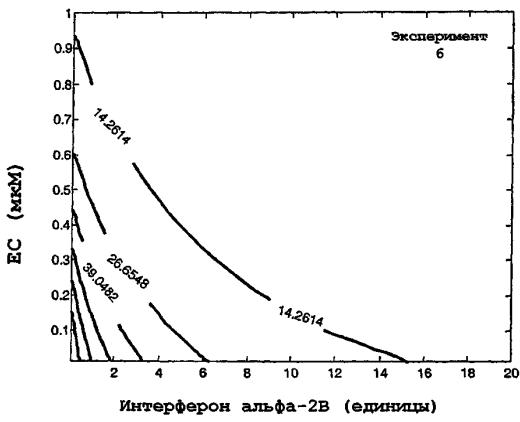


Интерферон альфа-2А (единицы)

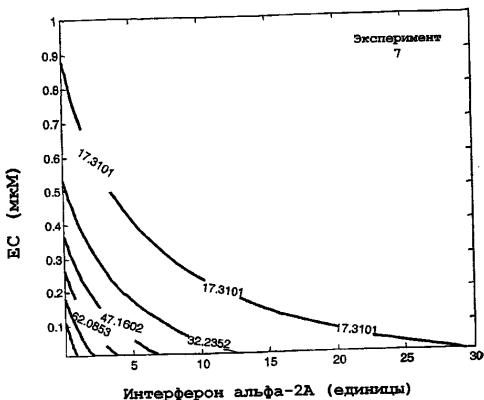
Фиг. 7



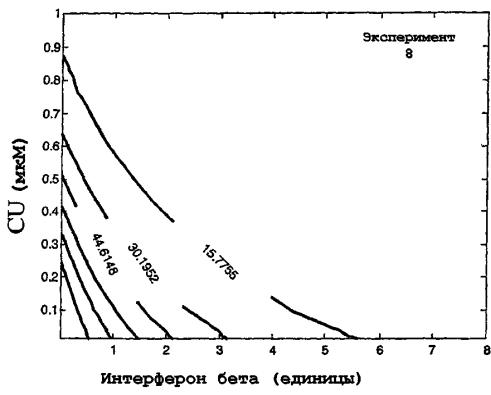
Фиг. 8



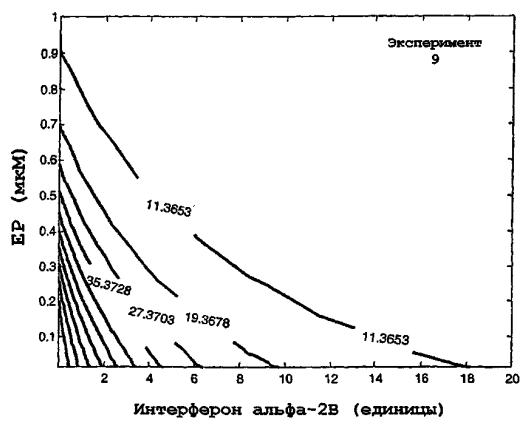
Фиг. 9



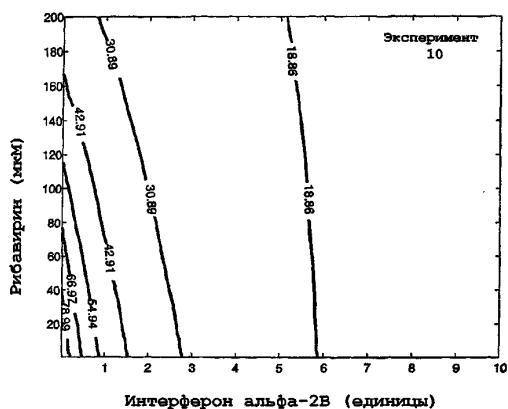
Фиг. 10



Фиг. 11

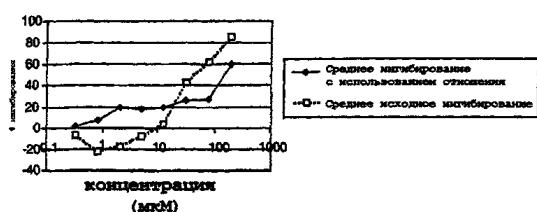


Фиг. 12

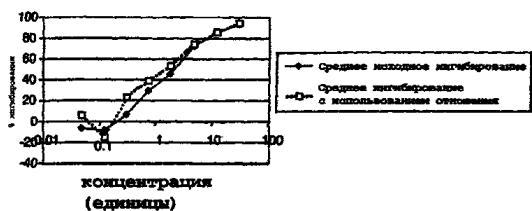


Фиг. 13

A Рибивирин отдельно



Интерферон альфа-2B отдаленно



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2