(19) **RU** (11) **2 088 591** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 07 K 5/065, A 61 K 38/05**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 5011567/04, 08.05.1992

(30) Приоритет: 11.05.1991 DE P 4115468.1

(46) Дата публикации: 27.08.1997

(56) Ссылки: **Заявка ЕПВ N 0236163, кл. C 07 C 121/78, 1987. Заявка ЕПВ N 0236164, кл. C 07 C 121/78, 1987. Walczyka R. et. Al. Carbohydrate Research, 1988, 180, p. 147 - 151.**

(71) Заявитель:
Берингверке АГ (DE)

(72) Изобретатель: **Вернер Штюбер[DE], Герхард Дикнайте[DE], Райнер Кошински[DE]**

(73) Патентообладатель:
Берингверке АГ (DE)

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ АМИДИНОФЕНИЛАЛАНИНА, СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРОИЗВОДНЫЕ АМИДИНОФЕНИЛАЛАНИНА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИКОАГУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Использование - в медицине в качестве антикоагуляционных средств. Сущность изобретения: производные амидинофениламина формулы I

$R\text{-}SO_2NH\text{-}CHR_1\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH(CH_2C_6H_4CNHNH_2)\ COHR_2R_3$

где

R - связанное в α - или b - положении нафталиновое кольцо, которое, в случае необходимости, может быть замещено одним или два раза алкокси /C_1 - C_3/ группой, или тетралиновое кольцо, связанное по b - положению, или фенильное кольцо, которое, в случае необходимости, может быть замещено в 2, 3, 6 - положениях /C_1 - C_4/ - алкилами, в 4-м положении /C_1 - C_4/ алкоксигруппой R_1 = группа A-B, где A = -/CH_2/$_n$-, n=1-4, B - группа -COOH или SO_3H или R_1 - группа A-B-C, где значения A и B указаны выше, а группа C образуется от N - связанной бета - или гамма - аминокислоты или от группы N-гликозидносвязанных урановых кислот или R_1 - тетразол; R_2 и R_3 вместе с атомом азота образуют пиперидил, 3 - гидрокси /C_1 - C_4/ алкилпиперидил. Способ их получения, реагент I: производное Д-р - цианофенилаланина: BOC H N CH_2/C_6H_4CN/ COO NR_2R_3 после отщепления BOC-группы вводят во взаимодействие с реагентом II: (t Bu)HN CHR_1COOH от полученного продукта отщепляют N- а -защитную группу, остаток обрабатывают RSO_2Cl, в полученном соединении цианогруппу переводят в амидиногруппу, а, в случае необходимости, отщепляют защитные группы. 2 с. и 8 з.п. ф-лы, 2 табл.

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

(19) **RU** (11) **2 088 591** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 07 K 5/065, A 61 K 38/05**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 5011567/04, 08.05.1992

(30) Priority: 11.05.1991 DE P 4115468.1

(46) Date of publication: 27.08.1997

(71) Applicant:
Beringverke AG (DE)

(72) Inventor: **Verner Shtjuber[DE], Gerkhard Diknajte[DE], Rajner Koshinski[DE]**

(73) Proprietor:
Beringverke AG (DE)

(54) DERIVATIVES OF AMIDINOPHENYLALANINE, METHOD OF THEIR SYNTHESIS AND AMIDINOPHENYLALANINE DERIVATIVES SHOWING ANTICOAGULATING ACTIVITY

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, amino acid derivatives. SUBSTANCE: product: derivatives of amidinophenylalanine of the formula (I): $R\text{-}SO_2\text{-}NH\text{-}CHR\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH(CH_2C_6H_4CNHNH_2)CONR_2R_3$ where: R - naphthalene ring bound at α- or b-position that if necessary can be substituted one or twice with alkoxy-(C_1-C_3)-group, or tetraline ring bound at β-position, or phenyl ring that if necessary can be substituted at 2, 3, 6 positions with (C_1-C_4)-alkyls, at 4 position - with (C_1-C_4)-alkoxy-group; R_1 - the group A-B where A - $-(CH_2)_n-$; n = 1-4; β-group is -COOH or SO_3H, or R_1 - the group A-B-C where values A and β were indicated above, and the group C is formed from N-bound beta- or gamma-amino acid or from the group N-glycoside-bound uronic acids, or R_1 - tetrazole; R_2 and R_3 together with nitrogen atom form piperidyl, 3-hydroxy-(C_1- C_4)-alkylpiperidyl. Reagent 1: derivative of D-p-cyanophenylalanine: $BOC\text{-}HNCH_2/C_6H_4CN/COONR_2R_3$ and after BOC-group splitting off product is reacted with reagent 2: $(tBu)HNCHR_1COOH$ and from the obtained product N-α-protective group is split off. Residue is treated with RSO_2Cl and in the obtained compound cyano-group is converted to amidino-group and protective groups were split off, if necessary. EFFECT: improved method of synthesis. 10 cl, 2 tbl

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

Изобретение относится к производным мидинофенилаланина, к способу получения этих соединений, к их применению и к фармацевтическим антикоагуляционным средствам, которые содержат эти соединения.

Как известно, ряд патофизиологических условий приводит к расходу антитромбина III (AT III), важнейшего ингибитора тромбина в плазме. Снижение AT III ведет к повышенному риску тромбоза, как известно между прочим, также о случаях с врожденным дефицитом AT III. Снижение до величин ниже 75% нормы влечет за собой тромбоэмболические осложнения. Эти осложнения появляются часто в форме диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови после операций и при состояниях шока. При этом во многих случаях появляются угрожающие жизни сгустки крови. Для лечения и профилактики тромботических заболеваний в медицине применяют до сих пор антикоагулянты с различным принципом действия. Для неотложной борьбы с риском тромбоза применяют такие вещества, как AT III, непарин и за последнее время также гирудин. Длительные профилактики исполняют с производными кумарина и индандиона. Однако приведенные антикоагулянты частично имеют значительные недостатки.

Гепарин, например, на основании его полисахаридной структуры можно назначать только парентерально и его действие рассчитано также на функционально способный уровень антитромбина III. Кумарины непосредственно противодействуют биосинтезу протеина, причем зависимые от витамина K факторы свертывания крови II, VII, IX и X не могут больше находиться в распоряжении в достаточном количестве и тем самым потенциал свертывания крови снижается. Отсюда вытекает замедление активности по времени. В качестве известных побочных действий появляются геморрагические некрозы кожи, тошнота и выпадение волос.

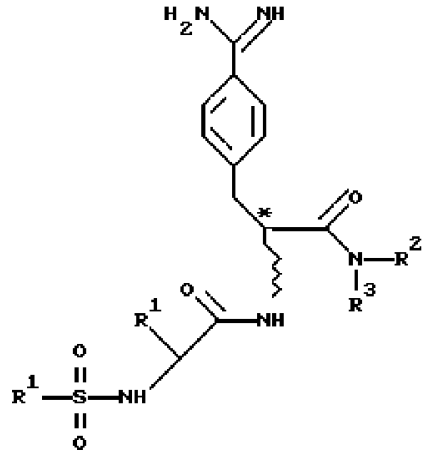
Низкомолекулярные ингибиторы тромбина, напротив, имеют то преимущество, что они независимо от кофакторов действуют непосредственно на тромбин, причем связываются непосредственно с активным центром и тем самым как бы закрывают фермент. На основании своей химической структуры эти вещества потенциально могут назначаться орально.

Особую известность получили производные аминокислоты на основе аргинина и на основе амидинофенилаланина. К первой группе причисляют такие соединения, как Д-фенилаланил-пропил-аргининальдегид и моногидрат (2R,4R)-4-метил-l-[N $_2$-(3-метил-1,2,3,4-тетрагидро-8-хинолинсульфонил)-L-аргинил] -2-пиперидинкарбоновой кислоты (МД 805). МД 805 представляет собой конкурентный специфический ингибитор тромбина, который применяют также в терапии. Другим известным производным амидинофенил-аланина является бета-нафтилсульфонил-глицил-R, S-4-амидинофенилаланилпиперидид (NAPAP). В английском патенте N 0236 163 и 0236 164 описаны производные NAPAP. При этом глицин (NH_2-CH_2-COOH) был заменен другой аминокислотой структуры (NH_2-CHR_1-COOH), где R_1 представляет низшую алкильную группу, низшую гидроксиалкильную группу, фенильную группу или 4-гидроксифениловую группу. 4-амидинофенилаланин (Aph) может быть метилирован до N-метил-Aph.

Кроме того, для NAPAP были описаны различные образования производных на арилсульфониле, "мостиковом" глицине и на пиперидиновом кольце. Сообразно этому наиболее подходящими являются альфа- или бета-нафтил-сульфонилгруппы на N-обрывателе цепи, напротив, гетероарил-сульфонил-группы, как 8-хинодинсульфонил, на десятичные степени хуже. Другой недостаток этих соединений, который относится особенно к NAPAP-структурам, заключается в их ограниченной переносимости, неблагоприятном фармакокинетическом поведении и частично в слишком небольшой специфичности, причем особенно следует упомянуть слишком высокую активность антитрипсина. Оральному применению веществ, которые содержат пара-амидинофенилаланин, противодействует тот факт, что стойкость против ферментов кишечника и против ферментов печени не является оптимальной, так что вещества в кишечнике и в печени слишком быстро подвергаются метаболизму. Благодаря замене пиперидина в NAPAP пролином можно достигнуть улучшенной переносимости и более благоприятной фармакокинетики. Правда, весьма решающим недостатком соединения пролина является нежелательная потеря действия относительно торможения тромбина в 100 раз по сравнению с NAPAP. Кроме того, до сих пор не существует никакой возможности значительно улучшить специфичность этих соединений по отношению к тромбину и трипсину введением заместителей.

Поэтому задача изобретения получение новых соединений на основе амидинофенилаланина, которые на основе своей антитромботической активности превосходят известные соединения, имеют высокую ферментативную резистентность, улучшенные переносимость, специфичность и фармакокинетику.

Предметом этого изобретения являются, следовательно, соединения формулы


(I)

где R' обозначает связанное в альфа- или бета-положении нафталиновое кольцо,

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

которое в случае необходимости при помощи алкильных групп, содержащих до 3 С-атомов, и/или алкоксигрупп соответственно с 3 С-атомами образует производные, или связанное в альфа- или бета-положении тетралиновое или индановое кольцо, которое в случае необходимости при помощи алкильных групп, состоящих из 3 С-атомов, и/или также алкоксигрупп соответственно с 3 С-атомами образует производные, фениловое кольцо, которое в случае необходимости при помощи алкильных групп, содержащих до 4 С-атомов, и/или с количеством групп до 3 структуры О-Х, в которой О представляет кислород и Х представляет водород, метил, этил, n-пропил, i-пропил или трет.-бутил, и/или с группой структуры -COOY, в которой Y представляет водород, метил, этил, n-пропил, i-пропил, трет. -бутил, i-бутил, i-пентил или нео-пентил, образует производные, или система хромана, которая с количеством алкильных групп предпочтительно до 5, содержащих до 3 С-атомов, образует производные;

R^1 представляет группу структуры А-В, с А $-(CH_2)_n-$ и n=1-4 и В представляет кислотную функцию, выбранную из группы карбоксильной функции, которая в случае необходимости может быть этерифицирована или существует как амид, причем сложные эфиры содержат спирт с количеством С-атомов до 17, функцию сульфокислоты, функцию кислоты фосфора, функцию борной кислоты и группу тетразола, или R^1 представляет группу структуры А-В-С, причем А имеет вышеназванное значение, В представляет карбонил или сульфонил, группа С образуется от N-связанной альфа-, бета-, гамма- или дельта-аминокислоты или от группы N-гликозидно соединенных уроновых кислот;

R^2 и R^3 могут быть одинаковыми или различными и представляют алкильные группы с количеством С-атомов до 4 или образуют вместе гетероциклическое кольцо с количеством звеньев кольца до 8, которое при помощи гидроксигруппы или гидроксиалкилгруппы с количеством С-атомов до 3 может образовывать производные, и эта гидроксигруппа в случае необходимости существует в этерифицированном виде, причем соответствующие кислоты представляют карбоновые кислоты, которые содержат до 17 С-атомов, в которой обозначенный С-атом существует в R- или S-структуре, но предпочтительно в R-структуре.

Эти новые соединения отличаются тем, что аминокислота R^1 в формуле (I) представляет кислую аминокислоту. Кислые аминокислоты представляют, например, встречающиеся в протеинах аминокислоты глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту или также цистеиновую кислоту, но также ненатуральные аминокислоты такие, как аминоадипиновая кислота или 3-фосфоноаланин либо 2-амино-3-боропропионовая кислота. Так как эти аминокислоты вследствие несимметрично замещенного С-атома существуют как хиральные вещества, полученные с этими аминокислотами новые соединения показывают также различную активность, причем преимущественно соответствующие аминокислоты в L-форме дают конечные соединения с более высокой эффективностью.

Названная в структуре R_1 группа А отличается преимущественно тем, что n принимает число 1 или 2, причем особенно предпочитают число 1. Если группа С представляет аминокислоту, то под этим подразумевают преимущественно альфа-, бета-, гамма- или дельта-аминокислоту. Такими аминокислотами являются, например, альфа-аминоадипиновая кислота, альфа-аминомасляная кислота, гамма-аминомасляная кислота, 4-аминобензойная кислота, 2-аминобензойная кислота, эпсилон-аминокапроновая кислота, 1-аминоциклогексанкарбоновая кислота, 2-аминоциклогексанкарбоновая кислота, 3-аминоциклогексанкарбоновая кислота, 4-аминоциклогексанкарбоновая кислота, 1-аминоциклопентанкарбоновая кислота, 2-амино-4,5-диметилфеноксазон(3)-1,8-ди-карбоновая кислота, 2-амино-3-гидрокси-4-метилбензойная кислота, альфа-амино- изомасляная кислота, аминогидроксимасляная кислота, β-аминоизо-масляная кислота, аланин, b-аланин, дегидроаланин, С-аллилглицин, аллиин, 2-амино-3-метил-бутил-1,3-тиазолин-5-карбоновая кислота, 6-амино-пенициллановая кислота, альфа-амино-пимелиновая кислота, 1-амино-циклопропанкарбоновая кислота, аспарагин, аспарагиновая кислота, альфа-амино-пробковая кислота, азетидинкарбоновая кислота, азиридинкарбоновая кислота, байкиаин, С-бензилфенилаланин, канаванин, цитруллин, цистеин, цистатионин, дженколовая кислота, 3,4-дигидроксифенилаланин, 4-сульфонилфенилаланин, 2,2-диметил-1,3-тиазолидин-4-карбоновая кислота, фелинин, глютамин, глютаминовая кислота, глицин, гексагидроникотиновая кислота, гомо-цистеин, гистидин, гомосерин, дельта-гидрокси-лизин, гамма-гидрокси-пролин, b-гидроксипролин, изолейцин, изосерин, изовалин, киноренин, лантионин, лейценин, лейцин, лизергиновая кислота, метионин, мимозин, миналин, норлейцин, норвалин, пантонин, пипеколиновая кислота, пенициллламин, фенилаланин, С-фенил-глицин, пиколиновая кислота, пролин, дегидропролин, b-фенил-серин, пиридил-2-аланин, пирролидон-(5)-карбоновая кислота-(2), (пиразолил-3)-аланин, хиноксалин-2-карбоновая кислота, розеонин, саркозин, селеноцистеин, селенометионин, серин, статин, (1,3-тиазолил-(2))-аланин, b-(1,3-тиазолил-(2))-аланин, треонин, тиронин, тироксин, 1,3-тиазолин-2-карбоновая кислота, третичный лейцин, триптофан, триптатионин, тирозин, валин. Эти аминокислоты для того случая, когда они оптически активны, могут существовать в D- или L-форме.

Для того случая, когда С представляет аминодикарбоновую кислоту, к которым причисляют, например, D- или L-глютаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту, одна из этих карбоксильных групп может образовывать производные, причем предпочтительно образует производные альфа-карбоксильная группа. Такими производными являются предпочтительно

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

амиды, которые образуются, например, от аммиака, метиламина, диметиламина, бензиламина, пиперидина или морфолина.

Если группа C представляет N-гликозидно соединенную уроновую кислоту, то подобное соединение можно представить следующей общей формулой:

с X_1 -H, -OH, CH_3, O-ацетил

X_2 -H, -OH, CH_3, O-ацетил

X_3 -H, -OH, CH_3, O-ацетил.

Неожиданно новые соединения оказываются высокопроцентными ингибиторами тромбина. Неожиданным является также, что стойкость против гомогенатов кишечника и печени, а также против трипсина и химотрипсина значительно улучшена по сравнению с известными соединениями.

Также неожиданно найдено, что на эффективность и специфичность соединений по изобретению оказывают решающее влияние группы R'. Соединение с R'= b-нафтил-сульфонил и R^1 ASp показывает относительно торможения тромбина и трипсина очень похожую активность, следовательно, небольшую специфичность. Введением алкильных групп и/или гидроксиалкильных групп и/или гидроксигрупп и/или карбоксильных групп на остатке сульфокислоты R', к которым причисляют преимущественно группы с количеством C-атомов до 3, особенно преимущественно метил- и/или метоксигруппы, можно достигнуть значительного повышения специфичности против тромбина. Это означает, что замещением одной или нескольких таких групп получают свойства веществ, которые особенно и неожиданно проявляются в усиленном торможении тромбина, причем одновременно было меньше торможение трипсина.

Таким образом, свойства веществ этого интересного как ингибиторы тромбина класса веществ могут оказывать решающее влияние благодаря описанным здесь образцам производных, и ведет к превосходящим соединениям.

Особую эффективность, как видно на примере K_i-величин, имеют структуры согласно изобретению на основе R' фенил и R_1 $-CH_2$-COOH (т.е. L-ASp), а также образованных от них соединений, причем R' несет или алкильные группы, которые содержат до 4 C-атомов, или также группы структуры O-X, в которой O кислород, и X водород, метил-, этил-, n-пропил, i-пропил или трет.-бутил-, или также группу структуры -COOY, в которой Y водород, метил-, этил-, n-пропил-, i-пропил, трет.-бутил-, i-бутил-, i-пентил- или нео-пентил-.

В более узком смысле и без ограничения нижеследующими примерами в качестве R' пригодны предпочтительно следующие группы:

6,7-диметоксинафтил- (b-Dmn)
-5-метоксинафтил- (b-Mns)
2,2,5,7,8-пентаметилхроман- (Pmc)
5,6,7,8-тетрагидронафталин- (Thn)
5,6,7,8-тетраметилнафтил- (Tmn)
фенил- (Phl)
4-метокси-2,3,6-триметилфенил- (Mtr)
2,3,4,5,6-пентаметилфенил- (Pme)
4-метокси-2,3,5,6-тетраметилфенил- (Mte)
4-гидрокси-2,3,6-триметилфенил- (Htr)
4-карбоксифенил- (Cph)

При этом совершенно особенной эффективностью отличалась Mtr-группа, т.е. речь идет о структуре, которая образуется от хлорангидрида 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфокислоты.

В качестве группы C применяются альфа-, бета-, гамма- или дельта-аминокислоты и их производные, а также N-гликозидно связанная уроновая кислота, как, например, b-D-аминоглюкуроновая кислота.

Неожиданно соединения согласно изобретению отличаются также улучшенной переносимостью и поэтому превосходят соединения по уровню техники. Так, например, для соединения b-нафтил-сульфонил-L-ASp-D,L-Aph-Pip была определена $ЛД_{50}$-величина (крыса, внутривенно) около 120 мг/кг, напротив, эта величина у NAPAP составляет около 20 мг/кг. Также найдено, что другая карбоксильная группа на группе R' улучшает дальше переносимость соединений по изобретению.

Лучшая переносимость ингибиторов согласно изобретению с кислыми группами проявляется в уменьшенном освобождении гистамина и в уменьшенном падении кровяного давления.

То, что эти соединения наряду с сильной антитромбиновой активностью, специфичностью и более благоприятной переносимостью отличаются улучшенной стойкостью против ферментов, например, против трипсина и химотрипсина, а также гомогенатов печени и кишечника, делает эти вещества классом интересных антикоагулянтов.

В качестве другого преимущества соединений согласно изобретению следует упомянуть оральную возможность биопереносимости, которая делает эти соединения особенно привлекательными.

Соединения согласно изобретению можно применять как антитромбиновые средства для терапии, чтобы препятствовать образованию сгустков крови, или при диагнозе.

К предмету изобретения относится также получение производных этих веществ, особенно соединений сложного эфира. Последние отличаются тем, что карбоксигруппа этерифицирована на аминокислоте R_1 при помощи алифатических спиртов с количеством C-атомов до 17. Таким образом, такие сложные эфиры образованы от спиртов, как метиловый, этиловый, изопропиловый, n-пропиловый, n-бутиловый, изобутиловый, трет.-бутиловый, n-пентиловый, изопентиловый, нео-пентиловый, октиловый, дициловый, додециловый, гексадециловый или гептадециловый спирт. Благодаря образованию производных при помощи спиртов улучшается растворимость липидов согласно изобретению, что благоприятно отражается на восприятии кишечника.

Если на остатках R_2 или R_3 имеются гидроксильные функции, то последние могут быть в случае необходимости этерифицированы карбоновыми кислотами. Такими карбоновыми кислотами являются, например, уксусная кислота, янтарная кислота, триметилуксусная кислота, гексанкарбоновая кислота, октанкарбоновая кислота, деканкарбоновая кислота,

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

додеканкарбоновая кислота или гексадеканкарбоновая кислота.

Так как амидиновая функция на основании основного действия представлена как правило, в качестве соли, то ингибиторы тромбина согласно изобретению могут появляться также в различных солевых формах. При этом форма соли оказывает существенное влияние на растворимость соединений, а также на всасываемость в случае терапевтического использования. В качестве солевых форм здесь следует назвать формиаты, ацетаты, капроаты, олеаты или соли карбоновых кислот с количеством С-атомов до 16, хлориды, бромиды, йодиды, алкансульфонаты с количеством С-атомов до 10, соли дикарбоновой кислоты и трикарбоновых кислот как цитраты или тартраты.

Особенно предпочтительны:

соединение формулы (I), в которой R' обозначает b-нафтил, R_1 обозначает -CH $_2$-COOX с X водород, R_2 и R_3 обозначают вместе пиперидин;

соединение формулы (I), в которой R' обозначает b-6,7-диметоксинафтил-, R_1 обозначает -CH_2-COOX с X водород, R_2 и R_3 обозначают вместе пиперидин;

соединение формулы (I), в которой R' обозначает b-тетралин, R_1 обозначает -H $_2$-COOX с X водород, R_2 и R_3 обозначают вместе пиперидин;

соединение формулы (I), в которой R' обозначает 4-метокси-2,3,6-триметилфенил-, R_1 обозначает -CH_2-COOX с X водород, R_2 и R_3 обозначают вместе пиперидин;

соединение формулы (I), в которой R' обозначает 4-карбоксифенил-, R_1 обозначает -CH_2-COOX с X водород, R_2 и R_3 обозначают вместе пиперидин;

соединение формулы (I), в которой R' обозначает 4-гидрокси-2,3-6-триметилфенил-, R_1 обозначает -CH_2-COOX с X водород, R_2 и R_3 обозначают вместе пиперидин;

соединение формулы (I), в которой R' обозначает 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-, R_1 обозначает -CH_2-COOX с X водород, R_2 и R_3 обозначают вместе пиперидин;

соединение формулы (I), отличающееся тем, что X представляет остаток спирта, который имеет количество С-атомов до 17;

соединение формулы (I), причем R_1 имеет структуру -$(CH_2)_n$-SO_3H с n 1 4;

соединение формулы (I), причем R_1 имеет структуру -$(CH_2)_n$-$PO(OH)_2$ с n 1 4;

соединение формулы (I), отличающееся тем, что R_2 и R_3 обозначают вместе 3-гидроксиметилпиперидин;

соединение формулы (I), отличающееся тем, что гидроксифункция этерифицирована карбоновой кислотой, которая содержит количество С-атомов до 17.

Предметом изобретения является также способ для получения соединения формулы (I), отличающийся тем, что защищенную кислую аминокислоту через альфа-концевую карбоксильную группу связывают с альфа-аминофункцией производного р-цианофенилаланинамида, удаляют N-альфа-защитную группу, связывают хлористый сульфонил с этой группой азота, переводят цианогруппу в амидинофункцию и в случае необходимости отщепляют имеющуюся защитную группу на третьей функции кислой аминокислоты.

Для вставки кислых аминокислот, к которым причисляют особенно аминокислоты аспарагиновую (ASp) или глутаминовую (Glu), следует вернуться к применению защищенных аминокислот. При этом обязательным является блокирование N-альфа-функции с защитной группой. В качестве защитных групп служат при этом предпочтительно группы типа уретана такие, как трет.-бутилоксикарбонил (Boc), бензилоксикарбонил (Z или Cbo), бифенилизопропилоксикарбонил (Bpoc), диметоксидиметилбензилоксикарбонил (DdZ) или 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc). При этом особое внимание следует уделить маскировке карбоксильной группы в боковой функции.

Здесь применяют предпочтительно сложные эфиры, которые в зависимости от потребности после синтеза можно отщеплять. Если после синтеза намереваются осуществлять отщепление маскировки боковой группы, то применяют предпочтительно третичный сложный бутиловый эфир. В качестве N-альфа-защитной группы оказалась пригодной, например, отщепляемая основанием Fmco-группа или очень кислотнонеустойчивая Bpoc- или Ddz-группа. Если боковая функция в кислой аминофункции в конечном соединении должна оставаться этерифицированной, то предпочтительно соответствующий N-альфа-Z-защищенной аминокислоте альфа-третичный сложный бутиловый эфир этерифицируют с требуемым спиртом, Z-группу удаляют гидрогенолизом, соответствующий хлористый сульфонил превращают с производным аминокислоты, третичный сложный бутиловый эфир отщепляют ацидолизом и выделенный продукт связывают с аминофункций производного цианофенилаланина. Вобщем получают сульфамидную связь по стандартному способу, причем соответствующие хлорангидриды сульфокислоты связывают с аминогруппой кислой аминокислоты. Получение соединений, которые содержат на R' группу фенола, происходит через соответствующие защищенные простые феноловые эфиры, особенно предпочтительны третичные бутиловые простые эфиры, которые после перевода в хлористые сульфонилы и получения сульфамидной связи отщепляются ацидолизом и дают, следовательно, конечные соединения.

Свободные группы фенола можно получать также другими известными способами, так, например, со средствами деметилирования, особенно предпочтительно с трибромидом бора в органическом растворителе, причем следует упомянуть дихлорметан.

Вторая возможность состоит в том, что сначала получают сульфамидную связь к кислой аминокислоте и последнюю после этого конденсируют на производном пара-цианофенилаланина. Для получения третичного сложного бутилового эфира арилсульфонил-аминокислоты или третичного сложного бутилового эфира гетероарилсульфонил-аминокислоты

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

соответствующий хлорангидрид сульфокислоты и третичный бутиловый сложный эфир-альфа-метиловый сложный эфир аминокислоты превращают в диметилформамиде при добавке основания, например, N-метилмофолина или диизопропилэтиламина. Сложный метиловый эфир омыляют при помощи щелока и происходит соединение с производным Aph- или цианфенилаланина посредством карбодиимидной реакции. Соединения по изобретению с группой сульфокислоты (B SO_3H), предпочтительно с цистеинсульфокислотой, можно было получать с применением N-альфа защищенной цистеинсульфокислоты. Для этого Boc-группу связывают с азотом аминокислоты и это соединение соединяют с цианофенилаланинпиперидидом. После отщепления защитной группы вступает в реакцию требуемый хлорангидрид сульфокислоты. Можно также получать соответствующее соединение цистеина со свободной сульфогидридриловой функцией и затем переводить его при помощи окислителя, например, надмуравьиной кислоты, в сульфокислоту. При этом предпочитают использовать Boc-Cys (SStBu) или Boc-Cys (Trt). Реакции окисления осуществляют после отщепления защитных групп серы.

Соединения согласно изобретению с группой C из группы альфа-, бета-, гамма-или дельта-аминокислоты получают известными способами. Предпочтительно вводят N-защищенную кислую аминокислоту, например, аспарагиновую, причем в качестве защитной группы предпочтительно окончательную сульфонамидную структуру, связанную с карбоксилзащищенной аминокислотой. При этом альфа-карбоксильная функция защищается предпочтительно как сложный метиловый эфир. Связывание происходит преимущественно при помощи средств конденсации типа карбодиимида, предпочтительно при помощи дициклогексилкарбодиимида. В реакцию можно добавлять гидроксибензотриазол. В качестве растворителя используют преимущественно диметилформамид.

После выделения веществ освобождают альфа-карбоксильную группу, что в случае сложного метилового эфира происходит омылением.

Эти предварительные стадии связывают затем при помощи уже описанных здесь способов с аминофункцией цианофенилаланина и продолжают реакцию, т.е. получают амидинофункцию. Для получения соединений согласно изобретению, причем группа C представляет N-глюкозидно связанную уроновую кислоту, сначала связывают N-альфа- и C-альфа-защищенную кислую аминокислоту с соответственно защищенной углеводной частью. Получение осуществляют по известным способам (Klener A. и др. J.Carbohydrate Chemistry, 7(4), 785-797 (1988); Jakeda T. и др. Carbohydrate Chemistry, 207, 71-79 (1990); Urge Z. и др. Jetrahedron Letters 32 (9), 3445-3448 (1991); Walczyna R. и др. Carbohydrate Research, 180, 147-151 (1988)). После отщепления азотной защитной группы аминокислоты хлорангидрид сульфокислоты связывают, как описано выше, и отщепляют C-альфа- карбоксильную группу. Затем происходит соединение с аминогруппой C-конечной части, для чего применяют предпочтительно амидинофенилаланин-амид, особенно предпочтительно D-4-амидинофенилаланин-пиперидид. После освобождения от защиты уроновой кислоты вещества очищают обычными способами такими, как гель-проникающая хроматография или ионообменная хроматография.

Для получения амидинофункции соединения p-цианофенилаланина растворяют в пиридине и триэтиламине и насыщают сероводородом. Через 2-3 дня раствор замешивают в солянокислую воду и выделяют осадок. После метилирования посредством метилирующего средства, предпочтительно йодистого метила, и превращения с солью аммония например такой, как ацетат аммония, в спирте, предпочтительно в метаноле, получают производное пептида с амидинофункцией. После обработки ацидолизом с трифторуксусной кислотой или HCl в уксусной кислоте получают искомый конечный продукт. Последующая гель-проникающая хроматография на $R_{сефадекс}$ LH-20 в метаноле дает чистое вещество. Конечные соединения проверяют при помощи ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии на идентичность, а при помощи жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) и тонкослойной хроматографии на чистоту. Для перевода в желательные солевые формы служит преимущественно ионообменная хроматография. При этом соответствующее соединение связывают с карбоксиметилированной ионообменной смолой, например CM-^{R} фрактогель, и элюируют с требуемой кислотой. Конечный продукт путем лиофилизации получают в кристаллической форме. Другие требуемые солевые формы можно получать из ацетатных солей.

Ингибиторы согласно изобретению для оценки их активности проверяют по различным критериям, предпочтительно это определение K_i-величины, IC_{50}-величины и частичного времени образования тромбопластов (PTT) на живом организме и в пробирке. Для испытания специфичности определяют IC_{50}-величины против различных серинпротеаз, особенно тромбина и трипсина, причем пробу вещества инкубируют с чистым ферментом, предпочтительно трипсином, химотрипсином или папаином или с гомогенатами печени или кишечника, и из растворов через определенные интервалы времени отбирают пробы, которые измеряют преимущественно при помощи жидкостной хроматографии высокого давления. Тем самым можно установить, что заявленные соединения по сравнению с уровнем техники являются более устойчивыми и менее быстро расщепляются. У заявленных соединений речь идет о специфических и высокоактивных ингибиторах тромбина с большим антитромбиновым потенциалом, который превосходит известные до сих пор низкомолекулярные ингибиторы, и которые частично отличаются также возможностью кишечного применения, как это можно было установить с соединением Mtr-L-Asp-D-Aph-Pip.

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

Предметом изобретения является также диагностическое или терапевтическое средство, содержащее соединение формулы (I).

Кроме того, предметом изобретения является применение соединения формулы (I) в способе для получения диагностического средства или лекарственного средства с антитромботическим действием.

Сокращения:

Aph амидинофенилаланин

NAPAP b-нафтилсульфонил-глицил-D,L-p-амидинофенилаланил-пиперидид

ASp аспарагиновая кислота

Asr аспарагин

Glu глутаминовая кислота

CyS (SO_3H) цистеиновая сульфокислота

b-Dmn 6,7-диметоксинафтил

b-Mns 5-метоксинафтил

Pmc 2,2,5,7,8-пентаметилхроман

Thn 5,6,7,8-тетрагидронафталин

Tmn 5,6,7,8-тетраметилнафтил

Phl фенил-

Mtr 4-метокси-2,3,6-триметилфенил-

Tos 4-метилфенил

Pme 2,3,4,5,6-пентаметилфенил-

Mte 4-метокси-2,3,5,6-тетраметилфенил-

Htr 4-гидрокси-2,3,6-триметилфенил-

Cph 4-карбоксифенил-

Z(Cbo) бензилоксикарбонил-

Boc трет.-бутилоксикарбонил

Bpoc бифенилизопропилоксикарбонил-

Ddz диметоксидиметилбензилоксикарбонил

Fmoc флуоренилметилоксикарбонил

Pip пиперидин

OtBu трет.-бутиловый сложный эфир

OMe метиловый сложный эфир

OEt этиловый сложный эфир

OiBu изо-бутиловый сложный эфир (втор-бутиловый сложный эфир)

OiPr изо-пропиловый сложный эфир

OnPe нео-пентиловый сложный эфир

DC тонкослойная хроматография

DCCI дициклогексилкарбодиимид

DMF диметилформамид

FAB-MS Fast atom bombardment mass spectrometry

DIPEA диизопропилэтиламин

HOBt гидроксибензотриазол

Следующие примеры описывают изобретение подробнее:

D-p-амидинофенил-аланил-пиперидид бета-нафтилсульфонил-L-аспарагиновой кислоты

1. Boc-D-p-цианофенилаланил-пиперидид.

50 г (225 ммоль) p-цианобензилбромида, 55 г (255 ммоль) сложного диэтилового эфира ацетамидомалоновой кислоты и 2 г йодистого калия нагревали до кипения в 250 мл абсолютного диоксана. Туда закапывали в течение 3 ч свежеприготовленный раствор 6 г (260 ммоль) натрия в этаноле. Еще через 3 ч кипячения с обратным холодильником охлаждали до 80° и в течение 3 ч добавляли 170 мл натрового щелока. Исходную смесь нагревали 4 ч до 95°. После охлаждения при помощи HCl устанавливали величину pH 1 и выпаривали диоксан. Возможный выпавший осадок отфильтровывали. При помощи натрового щелока устанавливали величину pH 9 и два раза экстрагировали этилацетатом. Водную фазу при помощи соляной кислоты еще раз доводили до величины pH 1, причем выкристаллизовывался N-ацетил-цианофенилаланин. Кристаллы собирали, несколько раз промывали водой и сушили в высоком вакууме.

Выход: 47 г (79,2% от теории).

Испытание чистоты: тонкослойная хроматография Rf 0,5 (хлороформ 50/метанол 10/ледяная уксусная кислота 2,5/об. ч.).

24 г этого продукта растворяли путем добавления 4 н. натрового щелока в 3 л воды и устанавливали величину pH до 6,0-6,5. Добавляли 500 мг ацилазы и инкубировали исходную смесь 4 дня при 37°. После этого раствор ультрафильтрованием освобождали от ацилазы и затем сгущали до объема 1 л. После установления величины pH 1 многократно экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу промывали немного концентрированным раствором поваренной соли, сушили над сульфатом натрия и выпаривали растворитель. Получали 8,2 г N-ацетил-D-цианофенилаланина (68% от теории). К 8 г этого соединения добавляли 22 мл ледяной уксусной кислоты и 4,3 мл концентрированной соляной кислоты с 40 мл воды и нагревали 24 ч до кипения. После выпаривания отщепленного раствора и отвода приставших следов кислоты с метанолом переосаждали из метанола/простого диэтилового эфира.

Выход: 6,6 г (85% от теории).

5 г D-цианофенилаланингидрохлорида растворяли в 14 мл воды при добавке 7,5 мл диизопропилэтиламина. Для этого добавляли раствор 6 г трет.-бутилокси-карбонил-оксиимино-2-фенил-ацетонитрила в 17 мл диоксана и перемешивали в течение ночи. Добавляли 40 мл воды и 50 мл этилацетата. Водную фазу отделяли и органическую фазу экстрагировали еще раз при помощи 1-молярного гидрокарбоната калия. Соединенные водные фазы промывали еще раз 10 мл простого диэтилового эфира и затем при помощи соляной кислоты устанавливали величину pH 3. Экстрагировали 3 раза этилацетатом, промывали раствором хлористого натрия и сушили органическую фазу над сульфатом натрия. После выпаривания растворителя получали 5,6 г (78%) Boc-D-дианофенил-аланина. 3,26 г (10 ммоль) Boc-D-цианофенилаланина, 1,49 г (11 ммоль) Hobt и 2,42 г (12 ммоль) DCCI, растворяли в 50 мл DMF и перемешивали 1 ч. Добавляли 1 мл пиперидина и перемешивали в течение ночи. Осажденную дициклогексилмочевину отфильтровывали, отгоняли DMF и поглощали остаток в этилацетате. Промывали 3 раза гидрокарбонатом калия, 3 раза 1-молярным гидросульфатом калия и 3 раза насыщенным раствором поваренной соли. После сушки органической фазы с сульфатом натрия и отгонки растворителя получают 3,16 г (80%) Boc-D-цианофенил-аланил-пиперидида.

Контроль чистоты: тонкослойная хроматография Rf 0,27 (хлороформ).

2. D-цианофенилаланил-пиперидин-гидрохлорид.

3 г Boc-защищенного соединения растворяли в 50 мл 1,2 н. HCl в ледяной уксусной кислоте и перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Отщепляющий

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

реактив отгоняли в вакууме, дополнительно удаляли с толуолом и остаток растирали с небольшим количеством простого диэтилового эфира. Кристаллы собирали и сушили в вакууме.

Выход: 2,2 г (90% от теории).

3. Ddz-ASp (tBu)-D-цианофенилаланил-пиперидид. 2,88 г (7 ммоль) Ddz-ASp (tBu), 1,04 г HOBt, 1,73 г DCCl и 2,06 г (7 ммоль) циано-фенилаланил-пиперидид-гидрохлорида растворяли в 50 мл DMF. После добавки 2,4 мл (14 ммоль) диизопропилэтиламина перемешивали 1 день в темноте при комнатной температуре. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток поглощали в этилацетате и промывали 3 раза 1-молярным раствором гидросульфата калия, 3 раза раствором гидрокарбоната калия и 2 раза концентрированным раствором поваренной соли. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и выпаривали растворитель. Остаток перемешивали с простым диизопропиловым эфиром, кристаллы собирали и сушили. Получали 3,86 г (85% от теории) Ddz-ASp (tBu)-D-циано-фенил-аланил-пиперидида.

4. b-нафтилсульфонил-ASp (tBu)-D-цианофенилаланилпиперидид. 3,25 г (5 ммоль) Ddz-ASp (tBu)-D-цианофенилаланил-пиперидида растворяли в 200 мл 5-ной трифторуксусной кислоты в дихлорметане и перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Исходную смесь выливали на 2-молярный раствор гидрокарбоната натрия, органическую фазу промывали два раза раствором гидрокарбоната натрия и один раз концентрированным раствором поваренной соли. После сушки над сульфатом натрия растворитель выпаривали и маслянистый осадок экстрагировали три раза простым диизопропиловым эфиром. Маслянистый остаток растворяли при добавке 1,71 мл (10 ммол) DIPEA в дихлорметане, для чего добавляли при перемешивании 1,13 г (5 ммол) b-нафтилсульфонилхлорида. Исходную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и затем промывали органическую фазу по 3 раза раствором $NaHCO_3$, раствором гидросульфата калия и раствором хлористого натрия. После сушки органической фазы над сульфатом натрия отгоняли растворитель и полученное вещество использовали без очистки для дальнейшего превращения.

5. b-нафтилсульфонил-ASp(tBu)-D-амидино-фенилаланил-пиперидид. Полученное в примере 4 соединение растворяли в 30 мл сухого пиридина и после добавки 1 мл триэтиламина в течение 3 час вводили газообразный сероводород. После трехдневной выдержки при комнатной температуре выливали на смесь из 100 г льда и 50 мл концентрированной соляной кислоты. Осадок отсасывали и промывали водой. Тиоамид после сушки поглощали в 50 мл ацетона и смешивали с 1,5 мл йодистого метила. Кипятили 30 мин при флегме. После охлаждения осаждали простым диэтиловым эфиром. Осадок растворяли в дихлорметане и дважды промывали водой. После сушки органической фазы над сульфатом натрия и удаления растворителя остаток поглощали в 30 мл сухого метанола и добавляли 200 мг ацетата аммония. Нагревали 3 ч до 60 °. Растворитель выпаривали в вакууме. Продукт подвергали очистке хроматографией на Сефадекс LH-20 в метаноле.

Выход: 630 мг.

Контроль чистоты: DC:Rf 0,55 (хлороформ 50/метанол 10/ледяная уксусная кислота 2,5/объем)

FAB-MS: M + H 636.

6. b-нафтилсульфонил-ASp-D-амидино-фенилаланилпиперидид. 500 мг выделенного в примере 5 вещества растворяли в 5 мл 1,2 н. HCl в ледяной уксусной кислоте и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. После выпаривания растворителя растирали остаток с простым диэтиловым эфиром и собирали на пористом стеклянном фильтре. Продукт сушили над пятиокисью фосфора в глубоком вакууме. Сырое вещество растворяли в воде и связывали с CM-фрактогелем ионообменником. Элюирование осуществляли с 5-ной уксусной кислотой. После лиофилизации получали 290 мг соли ацетата. Правильная структура была подтверждена при помощи 13C-ядерной магнитной резонанс-спектроскопии.

FAB MS: M + H 580.

6,7-диметокси-b-нафтилинсульфонил-L-ASp-D-p-амидинофенилаланил пиперидид. Получение осуществляли по аналогии с примером 6. Вместо хлорангидрида b-нафталинсульфокислоты применяли хлорангидрид 6,7-диметокси-b-нафталинсульфокислоты.

FAB-MS: M + H 640.

5,6,7,8-тетрагидро-b-нафталинсульфонил-L-ASp-D-p-амидинофенилаланилпиперидид. При применении 5,6,7,8-тетра-b-нафталинсульфонил-хлорида и вышеназванного способа получали 5,6,7,8-тетра-b-нафталинсульфонил-L-ASp-D-p-амидинофенилаланилпиперидид.

FAB-MS: M + H 584.

4-метокси-2,3,6-триметилфенилсульфонил-L-ASp-D-p-амидинофенилаланилпиперидид. При применении 4-метокси-2,3,6-триметилфенилсульфонил-хлорида и вышеназванного способа получали 4-метокси-2,3,6-триметилфенилсульфонил-L-ASp-D-p-амидинофенилаланилпиперидид.

FAB-MS: M + H 602.

4-метокси-2,3,6-триметилфенилсульфонил-L-CyS(SO_3 H)-D-p-амидинофенилаланилпиперидид. При применении 4-метокси-2,3,6-триметил-фенил-сульфонил-хлорида и вышеназванного способа получали 4-метокси-2,3,6-триметилфенилсульфонил-L-CyS(SO_3 H)-D-p-амидинофенилаланилпиперидид.

FAB-MS: M + H 638.

4-метокси-2,3,6-триметилфенилсульфонил-L-аспарагинил-N-{ b-D-глюкопиранозил уроновая кислота]-D-p-амидинофенил-аланил-пиперидид (Mtr-L-ASp(b-D-аминоглюкороновая кислота)-D-Asp-pip)

1. метил-(2,3,4-три-O-ацетил-b-D-глюкопиранозиламин)-уронат. 2 г метил-(2,3,4-три-O-ацетил-b-D-глюкопиранозил-азид)-уроната растворяли в 200 мл

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

этилацетата/метанола (2: 1; V:V), добавляли 2 г палладия/угля, устанавливали при помощи триэтиламина величину pH 7,5 и обрабатывали 1 ч потоком водорода. Реакционную смесь отфильтровывали и выпаривали растворитель.

Выход: 1,9 г.

Контроль чистоты: DC Rf 0,35 (дихлорметан: ацетон/ 2:1).

2.

2-N-(Z)-4-N-[метил-(2,3,4-три-O-ацетил-b-D-глюкопиранозил)уронат]-L-аспарагин-сложный трет.-бутиловый эфир. 1,26 г альфа-трет.-бутилового сложного эфира Z-аспарагиновой кислоты, 0,9 г HOBt и 1,4 г дициклогексилкарбодиимида растворяли в 100 мл тетрагидрофурана и смешивали при 0°C с 1,4 г стадии 1. Перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и выпаривали растворитель в вакууме. Остаток поглощали в хлороформе, промывали водой, сушили с сульфатом натрия и отгоняли растворитель. Остаток очищали на силикагеле при помощи хлороформа/ацетона (6:1/объем:объем).

Выход: 1,7 г.

Контроль на чистоту: DC Rf 0,72 (хлороформ:ацетон/6:1).

3.

4-N-[метил-(2,3,4-три-O-ацетил-b-D-глюкопиранозил)уронат]-L-аспарагин-сложный трет.-бутиловый эфир. 0,9 г стадии II растворяли в 20 мл метанола, смешивали в палладием/углем на кончике шпатели и гидрировали 5 ч. После отфильтровывания катализатора отгоняли растворитель и применяли остаток (0,75 г) без дальнейшей очистки для последующей реакции.

4.

2-N-(4-метокси-2,3,6-триметил-бензолсульфонил)-4-N-[метил-(2,3,4-три-O-ацетил-b-D-глюкопиранозил)-уронат] -L-аспарагинсложный трет.-бутиловый эфир. 1,73 г предшествующей стадии, 1,2 мл диизопропилэтиламина и 0,8 г Mtr-хлорида растворяли в 80 мл DMF и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Растворитель выпаривали в вакууме, остаток поглощали в этилацетате и промывали три раза водой. Органическую фазу сушили с сульфатом натрия и выпаривали в вакууме. Для дальнейшей очистки осуществляли хроматографию на силикагеле с дихлорметаном/ацетоном (3:1/объем:объем).

Выход: 1,57 г.

Контроль чистоты: DC Rf 0,87 (дихлорметан:метанол/10:1).

5.

2-N-(4-метокси-2,3,6-триметил-бензолсульфонил)-4-N-[метил-(2,3,4-три-O-ацетил-b-глюкопиранозил)-уронат] -L-аспарагин. 2,2 г из стадии IV растворяли в 50 мл трифторуксусной кислоты/дихлорметана (1:1/объем/объем) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Кислую смесь отгоняли в вакууме и прилипшие следы кислоты выпаривали в вакууме с толуолом. Полученный продукт без дальнейшей очистки использовали для следующего превращения.

Выход: 1,2 г

Контроль чистоты: DC Rf 0,7 (хлороформ:метанол/3:1).

6.

2-N-(4-метокси-2,3,6-триметил-бензолсульфонил)-4-N-[метил-(2,3,4-три-O-ацетил-b-D-глюкопиранозил)-уронат]
-L-аспарагин-ил-D-4-амидинофенилаланин-пиперидид. 1,0 г из предшествующей стадии, 0,23 г HOBt и 0,37 г DCCI растворяли в 50 мл DMF и перемешивали при 4°C 30 мин. После этого добавляли 0,4 г D-4-амидино-фенилаланин-пиперидида и 0,5 мл N-метил-морфолина. Исходную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, отфильтровывали и выпаривали растворитель в вакууме. Сырой продукт хроматографировали на силикагеле с хлороформом/метанолом 5:1.

Выход 1,2 г.

Контроль чистоты: DC Rf 0,7 (хлороформ:метанол/3:1).

7.

2-N-(4-метокси-2,3,6-триметил-бензолсульфонил)-4-N-[метил-(b-D-глюкопиранозил)уронат]-L-аспарагинил-D-4-амидинофенилаланин-пиперидид

1,1 г предшествующей стадии растворяли в 50 мл метанола и при помощи 1 н натрового щелока устанавливали величину pH 9. Через 2 часа при pH 8,5-9 нейтрализовали раствором метанола в HCl и выпаривали растворитель в вакууме. Остаток хроматографировали в метаноле на Сефадекс R LH-20.

Выход: 0,9 г

Контроль чистоты: DC Rf 0,34 (хлороформ:метанол:вода/40:20:1).

8.2-N-(4-метокси-2,3,6-триметил-бензолсульфонил)-4-N-b-D-глюкопиранозил)уронат-L-аспарагинил-D-4-амидинофенилаланинпиперидид

0,9 г последней стадии поглощали в 100 мл хлороформа:метанола:воды (40: 20:1/объем:объем) и смешивали с 0,2 г гидроокиси бария. Смесь перемешивали 3 часа при комнатной температуре, при помощи HCl в метаноле устанавливали величину pH 3,5 и выпаривали растворитель. Остаток хроматографировали в метаноле на Сефадекс RLH-20.

Выход: 0,72 г

Контроль чистоты: DC Rf 0,32 (хлороформ: метанол:вода/8:6:1)

FAB-MS: 777,

4-метокис-2,3,6-триметилбензолсульфонил-L-аспарагиновая кислота-(гамма-аминомасляная кислота)-D-Aph-пиперидид

1.4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил-L-аспарагиновая кислота-(гамма-аминомасляная кислота-третичный сложный бутиловый эфир)-D-цианофенилаланин-пиперидид

1 г Mtr-ASp-D-цианофенилаланин-пиперидида растворяли в 30 мл DMF и смешивали с 0,34 мл диизопропилэтиламина, 0,39 г HOBt, 0,42 г сложного трет. -бутилового эфира гамма-аминомасляной кислоты и 0,66 г дициклогексилкарбодиимида. Сначала перемешивали 1 ч в ледяной бане, затем в течение ночи при комнатной температуре. Осажденную дициклогексилмочевину отфильтровывали и выпаривали растворитель в вакууме. Маслянистый остаток поглощали в этилацетате и по 2 раза промывали 1-молярным раствором гидрокарбоната калия, 1-молярным раствором гидросульфата калия и насыщенным раствором поваренной соли.

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

После сушки над сульфатом натрия отгоняли растворитель.

Выход: 1,1 г

Контроль чистоты: DC Rf 0,89 (хлороформ:метанол/9:1).

2. 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил-L-аспарагиновая кислота-(гамма-аминомасляная кислота-третичный сложный бутиловый эфир)-D-ApL-пиперидид

Перевод цианогруппы в амидиногруппу осуществляли как 1-ом примере 5-1 стадии.

Выход: 500 мг

Контроль чистоты: DC Rf 0,4 (хлороформ:метанол:уксусная кислота/50:10:2,5).

3. 3-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил-L-аспарагиновая кислота-(гамма-аминомасляная кислота)-D-ApL-пиперидид

400 мг предшествующей стадии поглощали в 15 мл 1,2 н HCl/уксусной кислоты и перемешивали 90 минут при комнатной температуре. Кислую смесь отгоняли и дважды перемешивали с толуолом и выпаривало толуол. Сырой продукт растворяли в 3 мл метанола и кристаллизовали закапыванием в 50 мл простого диэтилового эфира. Осадок собирали и сушили в вакууме.

Выход: 320 мг

Контроль чистоты: DC Rf 0,25 (хлороформ:метанол:уксусная кислота/50:10:2,5).

FAB-MS: 686.

Опуская рацематическое расщепление при помощи ацилазы в стадии 1, соответствующие рацемические D,L-цианофенилаланинпиперидиды также превращали до соединений согласно изобретению, которые представляют также высокоэффективные ингибиторы тромбина.

Определение констант торможения для тромбина

Константы торможения (Ki) для веществ были определены ферментокинетическим путем по известным способам. Примененный тромбин человека был определен с чистотой 87% при помощи "активного участка титрования". Тест-раствор для Ki-определения состоял из буферного раствора (50 ммол, 75 ммол NaCl, pH 7,8. 37 °C), 100 pM тромбина, 0,1 ммол субстрата S2238 (Каби) и ингибитора, который составлял от 0 до 0,2 ММ. Ингибитор и фермент инкубировали 10 минут предварительно, реакция начиналась добавкой хромогенного субстрата S2238. Для оценки кинетик применяли математический алгоритм для "плотной связи", который получался при помощи нелинейной регрессии Ki-величин (таблица II) и давал тип торможения. Тип торможения для всех ингибиторов был на основании сравнения больше чем 90%

Определение специфичности ингибиторов

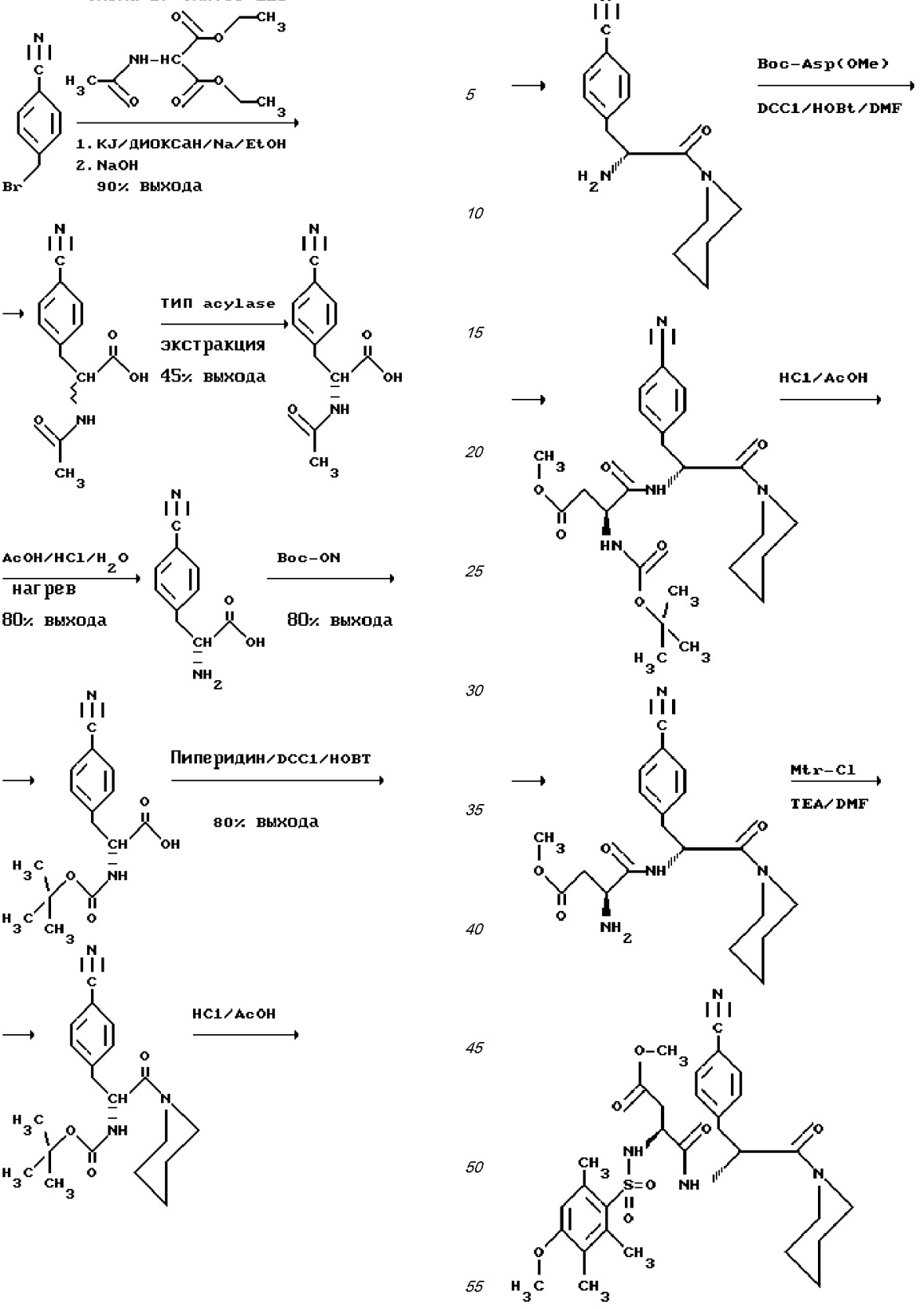
Специфичность ингибиторов определяли по сравнению с тромбином и трипсином. Специфичность определена как отношение Ki-величин для трипсина и тромбина (таблица II). Концентрация ингибитора, которая вызывала 50-ное торможение ферментативной активности, была обозначена как IC_{50} (100 соответствует незаторможенной ферментативной реакции). Величина IC_{50} для трипсина была определена следующим образом: трипсин из поджелудочной железы крупного рогатого скота был предварительно инкубирован при помощи возрастающих концентраций ингибитора в 25 ммол трис-HCl, 10 ммол $CaCl_2$, pH 7,8 при 37°C в течение 10 мин. Ферментативная реакция была начата добавкой субстрата хромозима TRV ($7{,}1 \cdot 10^{-5}$ M). Освобождение pNA измеряли через час при 405 нм. Аналогичным образом определяли IC_{50}-величины для тромбина, с тем исключением, что применяли тромбин человека, буферный раствор (50 ммол трис-HCl, 50 ммол NaCl, pH 7,8) и $5 \cdot 10^{-5}$ M S2238. Из IC_{50}-величины для тромбина и трипсина были вычислены K-величины (Ki $IC_{50}|S + KM$). Отношение величин трипсина и тромбина давало специфичности. Результаты приведены в табл.2.

Схема синтеза 220

RU 2088591 C1

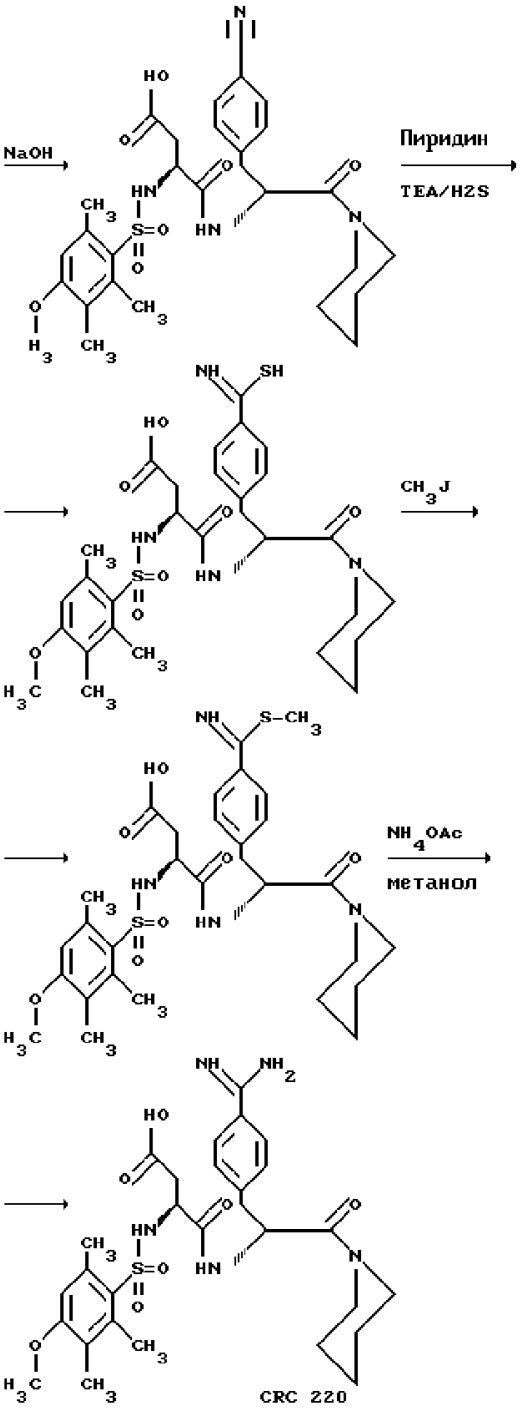
RU 2088591 C1

Схема 1: Синтез 220



RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

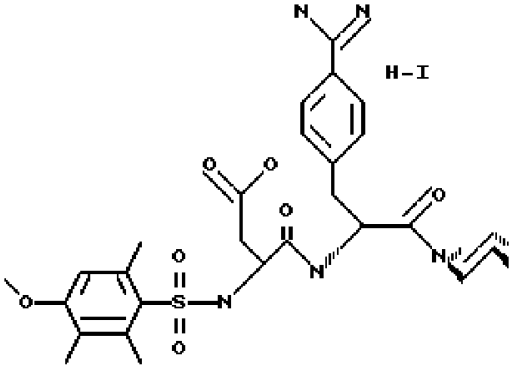


ДАННЫЕ ДЛЯ СОЕДИНЕНИЯ CRC 220

Химическое название:

4-метокси-2,3,6-триметилфенилсульфонил -аспарагил-D-4-амидинофенилаланил -пиперидид гидроиодид

Структура:



Молекулярная формула: $C_{29}H_{40}IN_5O_7S$

Молекулярный вес: 729.64 gl mo1

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ:

Точка плавления: 180-183 °C

Значение вращения $[\omega]_D^{20}$ ^{20}D: -21.5 ° (c=1, метанол)

Ядерно-резонансный спектр:

^{13}C-NMR(CD_3OD) 12.2(g), 18.4(g), 24.6(g), 25.3(t), 26.7(t), 27.2(t), 36.7(t), 39.3(t), 44.5(t), 47.5(t), 51.1(d), 54.1(d), 56.2(g), 113.4(d), 126.5(s), 128.0(s), 129.0(d), 130.9(s), 131.8(s), 140.3(s), 140.4(s), 145.0(s), 161.0(s), 168.2(s), 169.8(s), 171.8(s), 173.6(s)

^{1}H-NMR(CD_3OD) 1.34-1.70 (6H, pip-CH_2), 2.14 (3H, s, mtr-CH_3), 2.47 (2H, d, asp-CH_2 S 6.1 Hz), 2.56 (3H, s, mtr-CH_3), 2.65 (3H, s, mtr-CH_3), 2.88 (1H, dd, a from abx aph-CH_2 J_1 13.4 HZ J_2 7.1 Hz), 3.11 (1H, dd, b from abx aphCH_2 J_1 13.4 Hz, S_2 6.4 Hz), 3.32-3.55 (4H, m, pip CH_2), 3.86 (3H, s, OCH_3), 4.02 (IH, t, asp-CH s 6.1 Hz), 5.08 (1H, dd, x from aph CH J_1 7.1 Hz, J_2 6.4 Hz), 6.75 (1H, s, arom.CH) 7,4(2H,d,arom.CH J=8.4 Hz), 7.9 (2H, d, arom.CH J 8.4 Hz)

Масс-спектр m/z (FAB): 602 $(M+H)^+$

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ: CRC 220

Ki (nM) тромбин: 2.5

Ki (nM) трипсин: 312

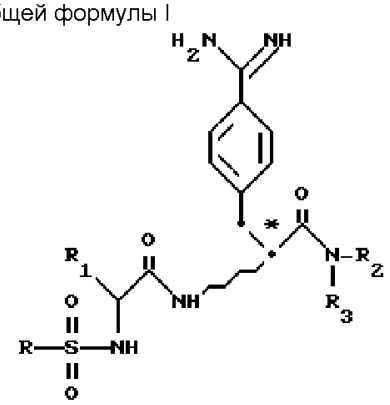
Спецификация трипсин/тромбин: 125

Острая токсичность LD_5: 80 мг/кг

Время полураспада l/2 (nach IV- Bf1us Gabe): 20±5 мини

Формула изобретения:

1. Производные амидинофенилаланина общей формулы I



где R связанное в α- или β-положении нафталиновое кольцо, которое в случае необходимости может быть замещено один или два раза алкокси-C_1 - C_3-группой, или тетралиновое кольцо, связанное по β-положению, или фенильное кольцо, которое в случае необходимости может быть замещено во 2-, 3-, 6-положениях C_1 C_4-алкилами, в 4-м положении C_1 - C_4-алкоксигруппой;

R_1 группа A B, где A -$(CH_2)_n$-, n 1 4, B - группа COOH или -SO_3H, или R_1 группа A B C, где A и B имеют указанные значения, а группа C образуется от N-связанной бета- или гамма-аминокислоты или от группы N-гликозидносвязанных уроновых кислот, или

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

R_1 тетразол;

R_2 и R_3 вместе с атомом азота образуют пиперидил,

3-гидрокси-C_1 C_4-алкилпиперидил.

2. Производные амидинофенилаланина по п. 1 формулы I, где C-атом существует в R-конфигурации.

3. Производные амидинофенилаланина по пп. 1 и 2 формулы I, где R - β-нафтил, R_1 CH_2COOX с X водород, а R_2 и R_3 - вместе пиперидил.

4. Производные амидинофенилаланина по пп. 1 3 формулы I, где R - β-6,7-диметоксинафтил, R_1 CH_2COOX, X водород, а R_2 и R_3 вместе пиперидил.

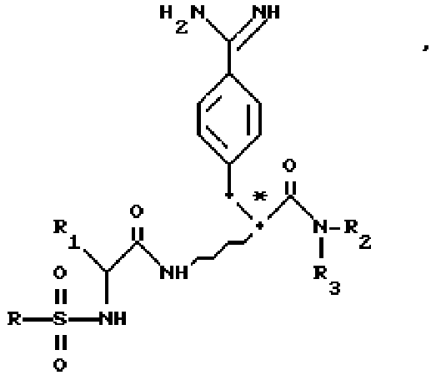
5. Производные амидинофенилаланина по пп. 1 4 формулы I, где R - β-тетралин, R_1 CH_2COOX, X водород, а R_2 и R_3 вместе пиперидил.

6. Производные амидинофенилаланина по пп. 1 5 формулы I, где R - 4-метокси-2,3,6-триметилфенил, R_1 CH_2OOH, X водород, а R_2 и R_3 вместе пиперидил.

7. Производные амидинофенилаланина по пп. 1 6 формулы I, где R_1 имеет структуру $-(CH_2)_nSO_3H$ с n 1 4.

8. Производные амидинофенилаланина по пп. 1 7 формулы I, где R_2 и R_3 вместе представляют 3-гидроксиметилпиперидил.

9. Способ получения производных амидинофенилаланина общей формулы I

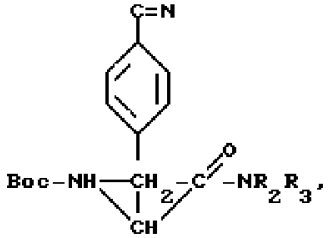


где R связанное в α- или β-положении нафталиновое кольцо, которое в случае необходимости может быть замещено один или два раза алкокси-C_1 - C_3-группой, или тетралиновое кольцо, связанное по β-положению, или фенильное кольцо, которое в случае необходимости может быть замещено во 2-, 3-, 6-положениях C_1 C_4-алкилами, в 4-положении C_1 - C_4-алкоксигруппой;

R_1 A B, где A $-(CH_2)_n-$, n 1 4, B группа COOH или $-SO_3H$, или R_1 группа A B C, где A и B имеют указанные значения, а группа C образуется от N-связанной бета- или гамма-аминокислоты или от группы N-гликозидносвязанных уроновых кислот или R_1-тетразол, R_2 и R_3 вместе с атомом азота образуют пиперидил,

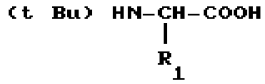
3-гидрокси-C_1 C_4-алкилпиперидил,

отличающийся тем, что производное D-р-цианофенилаланина формулы II



где R_2 и R_3 имеют указанные значения,

после отщепления BOC-группы вводят во взаимодействие с производным N-защищенной аминокислоты формулы III



где R имеет указанные значения,

от полученного продукта отщепляют N-α-защитную группу, а остаток обрабатывают производным формулы IV

RSO_2Cl,

в образующемся при этом соединении цианогруппу переводят в амидиногруппу и в случае необходимости отщепляют защитные группы.

10. Производные амидинофенилаланина общей формулы I по п. 1, обладающие антикоагулирующей активностью.

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

Таблица 1

Список соединений согласно изобретению*

β-нафтилсульфонил-L-Giu-D-Aph-Pip
β-нафтилсульфонил-L-Asp-D-Aph-Pip
β-нафтилсульфонил-D-Asp-D,L-Aph-Pip
β-нафтилсульфонил-L-Asp-D,L-Aph-Pip
β-нафтилсульфонил-L-Asp-D,L-Aph-3-гидроксиметилпиперидин
β-нафтилсульфонил-L-Asp(OtBu)-D-Aph-Pip
β-нафтилсульфонил-L-Asp(OMe)-D-Aph-Pip
β-нафтилсульфонил-L-Asp(OEt)-D-Aph-Pip
β-нафтилсульфонил-L-Asp(OiBu)-D-Aph-Pip
Mtr-D-Asp-D,L-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(OtBu)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(OMe)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(OEt)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(OiBu)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(OiPr)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp D-Aph-Pip
Mte-L-Asp-D-Aph-Pip
Mte-L-Asp(OiBu)-D,L-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(OtBu)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp-D-Aph-Pip
Mtr-L-Glu-D,L-Aph-Pip
Mtr-L-Asn-D-Aph-Pip
Mtr-D-Asn-D,L-Aph-Pip
Thn-L-Asn-D-Aph-Pip
Pme-L-Asp(OtBu)-D-Aph-Pip
Pme-L-Asp-D-Aph-Pip
Pme-L-Asp(OtBu)-D,L-Aph-Pip
Phl-L-Asp(OtBu)-D-Aph-Pip
Phl-L-Asp-D-Aph-Pip
β-Dmn-L-Asp(OtBu)-D-Aph-Pip
β-Dmn-L-Asp-D-Aph-Pip
Tos-L-Asp(OtBu)-D-Aph-Pip
Tos-L-Asp-D-Aph-Pip
Pms-L-Asp(OtBu)-D-Aph-Pip
Pms-L-Asp-D-Aph-Pip
β-Mns-L-Asp-D-Aph-Pip
β-Mns-L-Asp(OnPe)-D-Aph-Pip
Cph-L-Asp(OtBu)-D,L-Aph-Pip
Cph-L-Asp-D,L-Aph-Pip
Phl-L-Cys(SO_3H)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Cys(SO_3H)-D,L-Aph-Pip
Mtr-L-Cys(SO_3H)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(гамма-аминомасляная кислота)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(L-треонин)-D-Aph-Pip
Mtr-L-Asp(L-фенилаланин)-Aph-Pip
Mtr-L-Asn[(β-D-глюкопиранозил)-уронат]-D-Aph-Pip

*Солевые формы амидинофункций не названы.

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1

Таблица 2

Активности некоторых выбранных соединений

Соединение	Специфичность тромбин/трипсин	Торможение тромбина KI (наномол/л)
1. Напап	24	11
2. NaS-Asp-D-Aph-Pip	7	10
3. Dmn-Asp-D-Aph-Pip	230	6
4. Mtr-Asp-D-Aph-Pip	126	1,5
5. Mtr-Asp(tBu)-Aph-Pip	297	0,9
6. Mtr-Asp(iPr)-Aph-Pip	378	0,6
7. NaS-Asn-Aph-Pip	48	6
8. Mtr-Asn[(β-глюкопиранозил)уронат]-D-Aph-Pip	4106	0,085
9. Mtr-L-Cys(SO_3H)-D-Aph-Pip	150	0,6
10. Mtr-l-Asp(гамма-аминомасляная кислота)-D-Aph-Pip	1810	0,8

RU 2088591 C1

RU 2088591 C1