



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

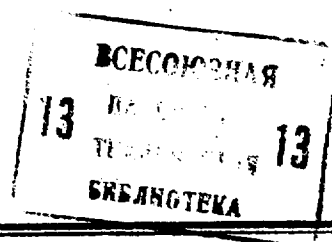
(19) SU (11) 1304748 A3

(51) 4 C 07 D 217/06//A 61 K 31/47

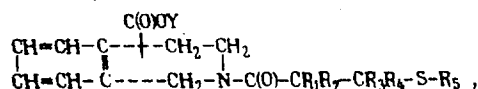
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ



- (21) 3282548/23-04
(22) 11.05.81
(31) 148083
(32) 12.05.80
(33) US
(46) 15.04.87. Бюл. № 14
(71) ЮСВ Фармасьютикал корпорейшн (US)
(72) Джон Т. Саж, Бруц Е. Вильямс и Джерри В. Скайлз (US)
(53) 547.781.785.07 (088,8)
(56) Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии. М.: Химия, 1964, с.445-450.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ТЕТРАГИДРОИЗОХИНОЛИНА
(57) Изобретение касается производных азотогетероциклических соединений, в частности соединений общей формулы I



где Y - низший алкил; R₁ - R₄ - независимо друг от друга H или C₁-C₆-алкил; R₅-H, C₁-C₆-алконоил, которые как проявляющие противогипертензивную активность могут быть использованы в медицине. Для выявления активности у соединений указанного класса были получены новые соединения I. Реакцию ведут из тетрагидроизохинолина и алкилирующей кислоты в присутствии дициклокарбодимида с последующим гидролизом и выделением целевого соединения I с выходом до 91%. Соединения I являются активными ингибиторами ангиотензинпревращения энзима; токсичность LD₅₀ = 84 мг/кг живой массы.

(19) SU (11) 1304748 A3

Изобретение относится к способу получения новых производных тетрагидроизохинолина, обладающих ценными фармакологическими свойствами, позволяющими их применять в медицине.

Цель изобретения - синтез новых соединений, обладающих противогипертензивной активностью и активностью, ингибирующей превращение ангиотензин-превращающего энзима.

Пример 1. L-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота.

Суспензию L-фенилаланина (75 г, 0,455 моль) в концентрированной соляной кислоте (488 мл) и 37%-ный формалин (165 мл) медленно нагревают с обратным холодильником при интенсивном перемешивании в течение 30 мин. По прошествии этого времени добавляют другую порцию 37%-ного формалина (75 мл) и концентрированной соляной кислоты (165 мл). Перемешивание и нагревание продолжают в течение 4 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и образовавшийся твердый осадок отфильтровывают и промывают небольшим количеством метанола; при этом получают гидрохлорид в виде бесцветного твердого вещества (68,9 г, 71%), т.пл. 291-294°C.

Пример 2. L-бензилкарбетокси-L-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота.

Гидрохлорид L-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновой кислоты (58,8 г, 0,275 моль) растворяют в 1 N гидроокиси натрия (600 мл) и получающийся раствор охлаждают в ледяной бане. Добавляют по каплям бензилхороформат (39,0 мл, 0,263 моль). После этого добавляют бензил-хороформат (30 мин) при перемешивании в течение часа при комнатной температуре, а затем добавляют другую порцию 1 N гидроокиси натрия (100 мл). Перемешивание продолжают в течение последующих 2-2,5 ч. Реакционную смесь подкисляют до pH 4 концентрированной соляной кислотой и продукт экстрагируют хлороформом. Органическую фазу дважды промывают водой и сушат над сульфатом магния. После фильтрования и испарения растворителя получают бесцветное масло (86,3 г, 91,5%), которое можно использовать без дальнейшей очистки.

Пример 3. трет-Бутил N-бензилкарбетокси-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-карбоксилат.

N-бензилкарбетокси-L-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту (46,5 г, 0,150 моль) растворяют в метиленхлориде (1000 мл) и добавляют концентрированную серную кислоту (7 мл). Получающуюся смесь охлаждают в бане с сухим льдом и ацетоном до -30°C, а затем через раствор в течение 3 ч пробукливают изобутилен. Реакционный сосуд закрывают пробкой с клапаном, сбрасывающим давление и хранят в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь осторожно подщелачивают, добавляя по каплям 10%-ный раствор водного карбоната калия. Органическую фазу отделяют и еще раз промывают 10%-ным K₂CO₃, а затем дважды водой. Органический экстракт высушивают над сульфатом магния. После фильтрования и выпаривания раствора получают светло-желтое масло (45,3 г, 82,4%), которое можно использовать без дальнейшей очистки.

Пример 4. трет-Бутил N-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-карбоксилат.

трет-Бутил N-бензилкарбетокси-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-карбоксилат (45 г, 0,123 моль) растворяют в абсолютном этаноле (600 мл) и добавляют 10% Pd/C (4 г). Получающуюся смесь гидрогенизируют в мешалке Парра низкого давления под давлением 50 футов на кв. дюйм в течение 16 ч. Катализатор отфильтровывают и растворитель выпаривают с получением неочищенного продукта в виде бледно-голубого масла (24,8 г, 86,4%), который используют без дальнейшей очистки.

Пример 5. трет-Бутил N-(3'-ацетилтио-2'-метилпропаноил)-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-карбоксилат.

К раствору трет-бутила L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолина)-3-карбоксилата (8,1 г, 0,0349 моль) и 3-ацетилтио-2-метилпропионовой кислоты (5,6 г, 0,036 моль) в метиленхлориде (250 мл), охлажденному в ледяной бане, добавляют дициклогексилкарбодиимид (7,2 г, 0,0350 моль). Получающуюся смесь перемешивают со внешним охлаждением в течение 30 мин, а затем примерно 3 ч

при комнатной температуре. Осажденную дициклогексилмочевину отфильтровывают и промывают небольшим количеством метиленхлорида. При концентрировании фильтрата получают неочищенный продукт в виде бледно-желтого масла, который используют без дальнейшей очистки.

Пример 6. N-(3'-Ацетилтио-2'-метилпропанил)-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-карбоновая кислота.

Неочищенный трет-бутил N-(3'-ацетилтио-2'-метилпропаноил)-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-карбоксилат (14 г, 0,371 моль) растворяют в смеси анизол (25 мл) и трифторуксусной кислоты (75 мл). Получающийся раствор перемешивают при комнатной температуре примерно в течение часа. Трифторуксусную кислоту удаляют под вакуумом и остаток распределяют между этилацетатом и насыщенным бикарбонатом натрия. Водную бикарбонатную фазу отделяют и дважды промывают этилацетатом, а затем осторожно подкисляют до pH 2-4 с помощью концентрированной соляной кислоты. Осажденный продукт несколько раз экстрагируют хлороформом и объединенный органический экстракт дважды промывают водой и высушивают над сульфатом магния, фильтруют и выпаривают с получением бледно-желтого масла (7,3 г). Этот грубый продукт очищают с помощью жидкостной хроматографии высокого давления с использованием смеси n-гексана : этилацетата : уксусной кислоты (30:60:1) в качестве элюанта для получения чистого продукта в виде бесцветного масла (5,9 г). Продукт был описан в виде его дициклогексиламиновой соли (ДЦГА), которую получали в эфире в виде бесцветных кристаллов, т.пл. 161-163°C.

Пример 7. N-(3'-Меркапто-2'-метилпропаноил)-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-карбоновая кислота.

Безводный аммиак пробулькивают в течение 15 мин через метанол (100 мл) и получающийся насыщенный раствор добавляют к N-(3'-ацетилтио-2'-метилпропаноил)-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-карбоновой кислоте (2,0 г, 0,00623 моль) и помещают в атмосферу азота. Реакционную смесь перемешивают при комнатной темпера-

туре в течение часа. Растворитель удаляют в вакууме и остаток наносят на колонку AC-50 W-X2 катионообменной смолы и элюируют метанолом. Метанол выпаривают и остаток растворяют в хлороформе. Хлороформ вымывают водой один раз и высушивают над сульфатом магния. После фильтрования и выпаривания растворителя получают бесцветное масло (1,7 г, 98%). Свободную кислоту переводят в ДЦГА соль в простом эфире с получением бесцветных кристаллов, т.пл. 146-147°C. Продукт описывают в виде его ДЦГА соли.

Пример 8. 2-(3'-Ацетилтио-2'-метилпропаноил)-1-фенил-3-карбометокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин.

1-Фенил-3-карбометокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин (10 г, 0,04 моль) и триэтиламин (4,1 г, 0,04 моль) растворяют в ацетонитриле (250 мл) и получающуюся смесь охлаждают в ледяной бане. 3-Ацетилтио-2-метилпропионилхлорид (6,5 г, 0,036 моль) добавляют небольшими порциями. После этого добавляют кислый хлорид и убирают ледяную баню; смесь перемешивают при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 2,5 ч. Растворитель выпаривают и остаток растворяют в хлороформе. Хлороформ промывают водой, 5%-ным водным раствором NaOH, 5%-ным водным раствором HCl и водой. Выпаривают хлороформ высушиванием над сульфатом магния, фильтруют и испаряют с получением неочищенного продукта в виде слегка окрашенного масла. Продукт подвергают дальнейшей очистке хроматографией на силикагеле (CH₂Cl₂) с получением чистого продукта в виде бесцветного масла (9,6 г, 65%).

Пример 9. 2-(3'-Меркапто-2'-метилпропаноил)-1-фенил-3-карбометокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин.

2-(3'-Ацетилтио-2'-метилпропаноил)-1-фенил-3-карбометокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин (2 г, 0,0045 моль) растворяют в метаноле (75 мл) и через раствор пробулькивают безводный аммиак в течение 15 мин. Реакционную смесь помещают в атмосферу азота продолжают перемешивание при комнатной температуре в течение часа. Метанол испаряют и остаток наносят на катион-обменную колонку (ме-

танол). Метанол испаряют и остаток растворяют в хлороформе, промывают водой, высушивают над сульфатом магния, фильтруют и выпаривают с получением продукта в виде бесцветного масла (1,6 г, 88%).

Пример 10. N-(3'-Ацетилтио-2'-метилпропаноил)-L-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота.

К перемешанной суспензии L-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновой кислоты (40,0 г, 187,2 моль) примерно в литре р-диоксана и воды (200 мл) добавляют триэтиламин (78 мл, 560,8 моль), а затем по каплям добавляют 3-ацетилтио-2-метилпропионилхлорид (33,8 г, 187,2 моль). По мере прохождения реакции смесь становится в основном гомогенной. По прошествии примерно 3 ч отфильтровывают небольшое количество растворимого материала и фильтрат концентрируют на вращающемся испарителе. Получающийся раствор разбавляют водой и подкисляют до pH 2 концентрированной HCl, после чего экстрагируют в этилацетат. Раствор этилацетата дважды промывают водой, один раз соляным раствором, высушивают над сульфатом магния, фильтруют и испаряют с получением примерно 55 г масла. Неочищенный продукт отделяют методом препаративной хроматографии с элюированием 2%-ной уксусной кислоты, 40%-ным этилацетатом и 60%-ным гексаном с выходом 30,2 г (50,2%) чистого вещества.

Испытание *in vitro* на ингибирование ангиотензин-превращающего энзима (ACE).

Испытание на ингибирование ангиотензин-превращающего энзима.

Введение. Этот тест обеспечивает метод идентификации ингибирования ангиотензин-превращающего энзима (ACE).

Активность энзима испытывают в присутствии и отсутствии испытуемого соединения и определяют процентное ингибирование активности энзима.

Преобразующий энзим катализирует гидролиз трипептида, гиппурил-гистидил-лейцина (HHL). Продуктами этой реакции являются гиппуровая кислота и гистидил-лейцин.

Активность энзима может быть определена путем измерения количества гиппуровой кислоты, образуемой за данное время. Для этой цели превраща-

ющий энзим инкубируют с HHL в течение 10 мин при 37°C. Реакцию энзима останавливают с помощью добавления соляной кислоты. Затем гиппуровую кислоту отделяют с помощью экстракции реакционной смеси этилацетатом. После выпаривания растворителя остаток, содержащий гиппуровую кислоту, растворяют в воде. Концентрацию гиппуровой кислоты определяют спектрофотометрически путем сравнения поглощения раствора при 228 нм с поглощением раствора известной концентрации чистого соединения. Удельную активность энзима выражают в наномолях образуемой гиппуровой кислоты мин/мг протеина. Тестируемые соединения оценивают по их способности уменьшать удельную активность ACE.

Препарат сырого ангиотензин-превращающего энзима.

Экстракция ацетонового порошка из легкого кролика. Влили 80 мл холодного раствора 0,05 М KH_2PO_4 , доведенного до pH 8,3 с помощью гидроксида калия, в мини-контейнер из нержавеющей стали (емкость 100 мл), предварительно охлажденный льдом. Добавили 5,0 г ацетонового порошка из легкого кролика и гомогенизировали смесь в течение одной минуты с использованием смесителя Waring Blender (установка 4). Контейнер охладили и продержали во льду в течение 2 мин. Повторили гомогенизацию и охлаждающую процедуру более двух раз.

Перенесли гомогенат в 250 мл лабораторный стакан, охлаждаемый льдом. Промыли мини-контейнер 20 мл холодного фосфатного буфера, pH 8,3, и объединили промывочную жидкость с гомогенатом. Перенесли гомогенат в поликарбонатные центрифугационные пробирки (27x103 мм), охлаждаемые льдом. Центрифугировали в течение 40 мин при 40000 g (21500 об/мин) в роторной N 30, предварительно охлажденной до 4°C центрифуге Beckman L 3-50. Перенесли верхний слой жидкости в 250 мл лабораторный стакан, охлаждаемый льдом.

Влили 80 мл охлажденного раствора 0,05 М KH_2PO_4 при pH 8,3 в мини-контейнер из нержавеющей стали, охлаждаемый льдом. Перенесли шарики из центрифугационных пробирок в мини-контейнер и повторили процедуру гомо-

Требуемые растворы получены в
стекле с применением дистиллирован-
ной воды.

1. 2%-ный $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Растворили 5,0 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в воде и добавили достаточное количество воды для получения 250 мл раствора.

2. 4%-ный натрий калий тартрат. Растворили 10,0 г натрий калий тартрата в воде и разбавили водой до 250 мл.

3. 2%-ный карбонат натрия в 0,1 М гидроокиси натрия. Растворили 20,0 г карбоната натрия и 4,0 г едкого натра в воде и разбавили раствор до 1000 мл водой.

4. Щелочной раствор сульфата меди. В день определения протеина смешали 0,1 мл 2%-ного раствора сульфата меди, 0,1 мл натрий калий тартратного раствора и 20 мл 2%-ного раствора карбоната натрия и 0,1 М раствора гидроокиси натрия в 25 мл мерной мензурке.

5. Фенольный реагент. Разбавили 1 мл реагента (Sigma Chemical Co) 1 мл в день определения протеина.

6. Альбумин бычьего серума (BSA). Растворили 25 мг BSA (Sigma Chemical Co) в воде и разбавили до 25 мл водой. Хранение раствора при 4°C.

Методика. Концентрация протеина реактивов энзима определяется с помощью стандартной кривой, полученной с BSA.

Растворы добавляли к испытуемым пробиркам 13x10 мм в порядке, перечисленном в табл.1.

После стояния в течение нескольких недель при 4°C раствор энзима может становиться мутным и может иметь место седиментация в колбе. Раствор энзима может быть очищен путем центрифугирования при 4°C без какого-либо существенного изменения его удельной активности.

Диализ сырого экстракта. Превращающий энзим, который должен был использоваться для целей скрининга, диализовали для удаления низкомолекулярных ингибиторов. Для этой цели около 30-40 мл сырого экстракта поместили в диализирующую трубку Spectrapor № 1 (отсекаемые молекулярные веса: 6000-8000), которую предварительно промыли 0,05 М буферным раствором фосфата калия с pH 8,3. Энзим диализовали в течение ночи (около 18 ч) против такого же буфера при 4°C. Диализованный энзим хранили при 4°C; он сохранял полную активность в течение трех недель.

Определение концентрации протеина. 35

Концентрацию протеина энзимного препарата определяли согласно методу Lowry (2).

Т а б л и ц а 1

[illegible]

Проводили смешивание сразу же после добавления фенольного реагента и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре.

Прослеживали поглощение (A_{500}) каждого образца относительно воды.

Образец 1 был контрольным. Образцы 2 - 6 были стандартными, используемыми для получения стандартной кривой в диапазоне 20-100 мкг BSA.

Образцы 7 и 8 были неизвестными.

Расчеты. Провели вычитание A_{500} для образца 1 из A_{500} неизвестного образца. Для этого из стандартной кривой нашли количество протеина в мкг согласно формулы: мкг/мл протеина =

$$= \text{мкг протеина} \times \frac{1000}{\text{мл, использование для испытания}} \times \text{фактор разбавления.}$$

Определение активности ангиотензин-превращающего энзима и действие ингибиторов.

Для определения коэффициента экстинкции гиппуровой кислоты приготовили пять образцов (аналогичных), содержащих 0,98, 0,96, 0,94, 0,92 и 0,90 мл воды добавили 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 и 0,1 мл водного раствора гиппуровой кислоты до 1 мл в такой же последовательности. Это привело к получению образцов, содержащих 20, 40, 60, 80 и 100 мкМ гиппуровой кислоты соответственно, зарегистрировали поглощение каждого образца относительно водного контроля при 228 нм на ультрафиолетовом спектрометре. Использовали 1 мл кварцевую ячейку. Отложили зависимость поглощения каждого образца от соответствующей концентрации гиппуровой кислоты. График имел вид прямой линии, проходящей через нуль. Наклон прямой линии равен микромолярному коэффициенту экстинкции и имел величину $0,0103 \pm 5\%$. Эта величина используется для расчета концентраций гиппуровой кислоты в эксперименте с превращающим энзимом.

Методика измерения активности ангиотензин-превращающего энзима в присутствии и отсутствии потенциальных ингибиторов.

Реагенты для испытания. Неорганические реагенты и этилацетат были марки ХЧ. Гиппуровая кислота была получена от Sigma Chemical Co. Гиппу-

риллестидин-лейцин являлся продуктом, поставляемым Reseoreh Plus. Inc.

Требуемые растворы были получены в стеклянной посуде с использованием дистиллированной воды.

1. 3М NaCl. Растворили 175 г хлористого натрия в 800 мл воды. Перенесли раствор в мерный цилиндр и довели объем до 1000 мл.

2. 0,3 М KH_2PO_4 - 1,5 М NaCl, pH 8,3. Растворили 12,2 г фосфата калия в 120 мл воды в лабораторном стакане. Добавили 150 мл 3М хлористого натрия. Перемешали раствор магнитной мешалкой и добавили разбавленную гидроксид калия для доведения pH раствора до 8,3. Перенесли раствор в мерный цилиндр и довели объем до 300 мл водой.

3. 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3. Растворили 1,701 г фосфата калия в 220 мл воды. Довели pH раствора до pH 8,3 с помощью добавления разбавленной гидроксид калия. Перенесли раствор в мерный цилиндр и довели объем раствора до 250 мл.

4. 0,001 М гиппуровой кислоты - 0,05 М KH_2PO_4 ; pH 8,3. Растворили 1,701 г KH_2PO_4 в 200 мл воды. Добавили 0,0448 г гиппуровой кислоты. Раствор перемешивали магнитной мешалкой и добавили разбавленной гидроксид калия, чтобы довести pH раствора до pH 8,3. Перенесли раствор в мерный цилиндр и довели объем раствора до 250 мл водой.

5. 0,001 М гиппуровой кислоты. Растворили 0,0448 г гиппуровой кислоты в 200 мл воды. Довели объем раствора до 250 мл водой.

6. 0,025 М гиппурил-гистидил-лейцина (HNL) - 0,04 М KH_2PO_4 , pH 8,3. Растворили 0,170 г KH_2PO_4 в 20 мл воды. Добавили 0,2685 г HNL и перемешивали раствор магнитной мешалкой. Добавили разбавленной гидроксид калия для доведения pH раствора до pH 8,3.

7. 1 М HCl. Добавили 83 мл 37%-ной соляной кислоты к 500 мл воды в мерном цилиндре. Раствор смешали и довели объем раствора до 1000 мл водой.

8. 0,001 М SQ 20,881. Растворили 3,0 мг SQ 20,881 в 2,72 мл воды.

9. 4 мкМ SQ 20,881. Разбавили 0,01 мл раствора 8 2.49 мл 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3.

Растворы 2, 3, 4, 5, 6, 8 и 9 хранили при 4°C.

Метод. Разбавили диализированную АСЕ до 2 мг/мл раствором 0,05 М

KH_2PO_4 - КОН, pH 8,3 и хранили во льду. Растворы внесли пипеткой в испытываемые пробирки 13x100 мм в порядке, указанном в табл.2.

Т а б л и ц а 2

Раствор	Образец, N, объем, мл						
	1	2	3	4	5	6	7
0,05 М KH_2PO_4 - 1,5 М NaCl, pH 8,3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
0,05 М KH_2PO_4 pH 8,3	0,045	0,095	0,07	0,095	0,095	0,095	0,07
1 мМ гиппуровая кислота - 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3	0,05	-	-	-	-	-	-
0,025 М NH_4I - 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
4 микромоля SQ 20,881 - 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3	-	-	0,025	-	-	0,025	-
5 мМ ингибитор (в 95%-ном этаноле)	-	-	-	0,005	-	-	0,005
95%-ный этанол	0,005	0,005	0,005	-	0,005	0,005	-

Опыт с каждым образцом дублировался.

Образец 1 использовали для определения извлечения гиппуровой кислоты. Образец 2 - контроль активности АСЕ. Образец 3 - активность АСЕ в присутствии стандартного ингибитора. Образец 4 - активность АСЕ в присутствии спирторастворимого ингибитора.

Образцы 5, 6 и 7 - эталоны сравнения в начальный момент времени для образцов 1 и 2, 3 и 4 соответственно.

Вышеуказанные образцы и разбавленные растворы энзима инкубировали (2 мг/мл) при 37°C в водяной бане в течение 5 мин перед добавлением растворов, приведенных в табл.3.

Т а б л и ц а 3

Раствор	Образец, N, объем, мл						
	1	2	3	4	5	6	7
HCl , 1 М	0,25	-	-	-	0,25	0,25	0,25
Диализованный АСЕ, 2 мг/мл	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
HCl , 1 М	-	0,25	0,25	0,25	-	-	-

Образцы 1, 5, 6 и 7 удаляли из водяной бани после добавления энзима. Образцы 2, 3 и 4 инкубировали при 37°C в течение 10 мин перед добавлением HCl .

Конечная концентрация компонентов смеси составляла фосфат, 0,01 М, гиппуровой кислоты, 50 мкМ хлористого натрия, 300 мкМ и NH_4I 2 мМ. Концентрация стандартного ингибитора

SQ 20,881 составляла 0,4 мкМ. Удельная активность препарата ACE, использованного в этой методике составила 48 нм/мин/мг.

После добавления ко всем образцам HCl к каждому образцу добавили 1,5 мл этилацетата и смешали в вихревом смесителе (установка 6) в течение 15 с. Центрифугировали образцы в течение 5 мин на верхнем столе, центрифугировали для отделения двух слоев жидкости. Отделили 1,0 мл из этилацетатного слоя каждого образца и перенесли в испытываемые пробирки 13x100 мл. Поместили испытываемые пробирки в аналитический испаритель (Organomation Associates, Inc.) с температурой воды 65°C. Выпарили образцы досуха в потоке азота чисто-

той 99,99% (10 мин). Удалили образцы из испарителя. Добавили 1 мл воды к каждой испытываемой пробирке и мешали в течение 20 с на вихревом смесителе (установка 6) для растворения осадка. Зарегистрировали поглощение при 228 нм (A_{228}) относительно воды. Использовали 1 мл кварцевую кювету.

Расчеты.

Извлечение гиппуровой кислоты. Вычитают величину поглощения образца 5 из величины поглощения образца 1. Чистое поглощение при 228 нм, обусловленное 50 нМ гиппурой кислоты, добавляют к образцу 1. Долю гиппуровой кислоты, извлекаемую из образца 1, рассчитывают следующим образом:

$$\text{Доля извлечения} = \frac{\text{чистое поглощение при 228 нм}}{\text{микромольный коэффициент экстинкции}} \times 1,5 \times \frac{1}{50}$$

Активность энзима. Вычитают поглощение образцов 5, 6 и 7 из поглощения образцов 2, 3 и 4 соответственно. Это приводит к величине чистого поглощения за счет гиппуровой кислоты в контрольном образце, содержащем во-

дорастворимый ингибитор и образце, содержащем спирторастворимый ингибитор.

2. Расчет образуемой гиппуровой кислоты, нМ, проводят следующим образом:

$$\text{Гиппуровая кислота, нМ} = \frac{\text{чистое поглощение при 228 нм}}{\text{микромольный коэффициент экстинкции}} \times 1,5 \times \frac{1}{\text{извлеченная доля}}$$

Активность превращающего энзима выражается в наномоля образуемой гиппуровой кислоты/мин. Удельная

активность выражается в наномолях гиппуровой кислоты/мин/мг протеина.

$$\text{Удельная активность} = \text{активность} \times \frac{1}{\text{мг протеина в образце (0,16)}}$$

% ингибирования рассчитывается следующим образом:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{\text{удельная активность} - \text{удельная активность}}{\text{удельная активность контроля}} \times 100.$$

Концентрация испытываемого соединения. Для целей скрининга все соединения были испытаны при концентрации 100 мкМ.

В качестве стандартного ингибитора активности ACE использовали нонапептид SQ 20,881. Воздействие стандартного ингибитора на активность ACE определяют каждый раз при испытании неизвестного соединения.

При растворении испытываемых соединений в органических растворителях,

контрольный образец, извлекаемый образец и образец в начальный момент времени должны содержать одинаковое количество органического растворителя. Не обнаружено существенного влияния на активность ACE 5%-ного этанола или 2%-ного диметилсульфоксида. Повышение концентрации этих растворителей приводят к ингибированию активности энзима.

Влияние испытываемого соединения на pH реакционной смеси определяют раз-

бавлением 0,02 мл 5 мМ раствора испытуемого соединения 0,2 мл 0,05 М KH_2PO_4 - 1,5 М NaCl , pH 8,3 и 0,78 мл 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3. Концентрации испытуемого соединения, буферного раствора, органического растворителя и хлористого натрия в этом разбавленном растворе равны концентрациям этих компонентов в реакционной смеси. Если pH разбавленного раствора находится между 8,2 и 8,5, то 5 мМ раствор испытуемого соединения в органическом растворителе используется для испытания на воздействие на активность АСЕ. Если pH разбавленного раствора меньше 8,2 или больше 8,5, то аликвоту 5 мМ раствора разбавляют в 0,05 М KH_2PO_4 и pH доводят до 8,3.

Соединения, которые являются активными ингибиторами АСЕ, испытываются при нескольких различных концентрациях ингибитора для того, чтобы определить I_{50} или константу ингибирования, $K_i^{(4)}$.

Активные соединения. Соединения, которые содержат активные группы и потенциально воздействуют как активные целенаправленные необратимые ингибиторы АСЕ, испытываются на их способность к необратимому ингибированию АСЕ. Такие соединения предварительно инкубируют с АСЕ в 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3 при 37°C. В различные моменты времени отделяют аликвоты и испытывают на активность превращающего энзима, как это описано выше. Параллельно проводят опыт с контрольной предварительно инкубированной смесью без испытуемого соединения.

Заключения об активности - Менее 20% ингибирования АСЕ. Соединения, вызывающие менее 20% ингибирования АСЕ активности рассматриваются как неактивные и далее не испытываются.

Соединения, вызывающие 20-50%-ное ингибирование активности АСЕ, рассматриваются как соединения средней активности. Такие соединения вновь испытываются для подтверждения процента ингибирования.

Соединения, которые имеют воспроизводимое ингибирование активности АСЕ более 50% при концентрации 100 мкМ, рассматриваются как активные. Такие соединения испытываются при различных концентрациях для того, чтобы определить I_{50} или K_i .

Соединения, которые необратимо ингибируют АСЕ, испытываются далее для определения минимальной концентрации ингибитора, необходимой для инактивации АСЕ и скорости инактивации.

Активность соединения при 0,1 мМ. Неактивное L 20% ингибирования.

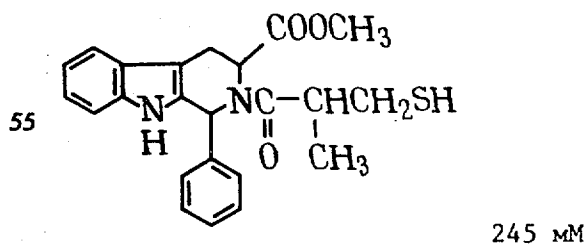
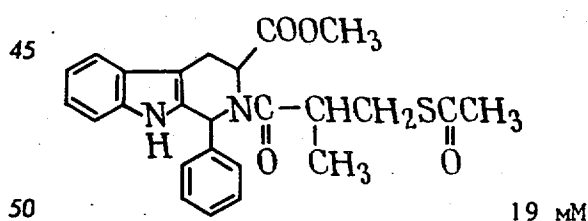
Получение сырого ангиотензин-превращающего энзима. (Pel - Freer) в 20 мл 0,03 М 1-0-н-октил- β -D-глюкопиранозид - 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3 в 30 мл измельчителе ткани Potbr Elvehjem, охлаждаемом льдом. Гомогенизовали суспензию с применением механического тefлонового пестика (%) 3 прохода.

Гомогенат перенесли в охлажденную поликарбонатную пробирку (50 мл) для центрифугирования и центрифугировали в течение 25 мин при скорости 20000 об/мин (36900 x) в центрифуге SS-34 с использованием Sorval RC 5B при 4°C. Перенесли верхний слой жидкости в лабораторный стакан 50 мл, охлаждаемый льдом.

Вновь суспендировали шарики в 10 мл охлажденного 0,03 М 1-0-н-октил- β -D-глюкопиранозид - 0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,3 в дробилке и повторили методику, описанную выше для гомогенизации и центрифугирования. Объединенные поверхностные слои жидкости, как было найдено, содержали около 70% активности, присущей первоначальному гомогенату. Энзим диализовали перед использованием.

Следующие соединения были испытаны in vitro на ингибирование ангиотензин-превращающего энзима, прилагаемому здесь. Ингибирование представлено в виде величин I_{50}

Соединение I_{50}



N-(3'-Меркаптопропаноил)-
-L-(1,2,3,4-тетрагидро-
изохинолин)-3-карбоновая
кислота

3,8

N-(3'-Ацетилтио-2'-метил-
пропаноил)-L-(1,2,3,4-
тетрагидроизохинолин)-3-
-карбоновая кислота

0,04

N-(3'-Меркапто-2'-метил-
пропаноил)-L-(1,2,3,4-
тетрагидроизохинолин)-
-3-карбоновая кислота

0,045

N-(3-Меркапто-2'-метилпропаноил)-
-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-3-
-карбоновая кислота;

N-(3'-Ацетилтио-2'-метилпропано-
ил)-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-
-3-карбоновая кислота.

Это испытание дает предваритель-
ные данные, указывающие на присутст-
вие активности, направленной на цент-
ральную нервную систему и автономной
активности, а также косвенно указы-
вающие на циркуляторную активность
соединения. В этом испытании получа-
ют также предварительные данные по
смертности, в результате чего можно
выбрать нелетальные дозы для исполь-
зования в каких-либо дальнейших нуж-
ных фармакологических испытаниях.

Для каждой дозы используют группу
из 4 мышей, которым внутривенно
инъекцией вводят соединение в коли-
честве 160 мг/кг. Животных наблюдают
для определения сильных явных симп-
томов в течение 1,5 ч после введе-
ния лекарства. Симптомы фиксируют и
эти данные анализируют для проведе-
ния определения в том случае, если
соединение имеет какую-либо пригод-
ную активность по отношению к ЦНС
и/или автономную активность. Опреде-
ляют максимальную нелетальную дозу
и, если это возможно, приблизитель-
ные значения LD₅₀ и ED₅₀.

В приложении А представлены ре-
зультаты, полученные с использовани-
ем N-(3'-меркапто-2'-метилпропано-
ил)-L-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-
-3-карбоновой кислоты (соединения
№ 3371). В приложении В представле-
ны результаты, полученные с исполь-
зованием N-(3'-ацетилтио-2'-метил-
пропаноил)-L-(1,2,3,4-тетрагидроизо-
хинолин)-3-карбоновой кислоты (сое-
динение № 3370). Соединение № 3371
испытано на автономную активность

для лакримации, расширения зрачков
иптоза, и на активность по отноше-
нию к центральной нервной системе,
тремор, конвульсии, моторную актив-
ность, атаксию и потерю рефлекса вып-
рямления. Наблюдала также одышку и
цианоз. Там, где это возможно, ука-
заны также ED₅₀ и LD₅₀.

Приложение А. Первичный фармаколо-
гический отбор. Испытание 100 особей
на сильную реакцию в интервале доз.
Испытывали соединение (-) № 3371
(1 ч).

ED₅₀ мг/кг веса
тела

Автономная

Усиление лакри-
мации-22

715

Расширение зрач-
ка-23

640

Общая

понижение рек-
тальной темпе-
ратуры-30

НД

НД-ED₅₀ не дос-
тигается30 LD₅₀ > 640 мг/кг веса
тела

Код №: SKI-D-59-B

Проект: алкано-
иламинокислоты35 Источник: специа-
лист/виварий

Цвет желтый

Форма: жидкий раст-
ворНоситель Tween
8040 Основной фактор:
1,0Вид: крыса, выдер-
жанная без пищи
18 ч

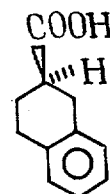
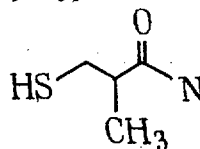
pH 3,0

Пол: самцы

Использованные дозы: Комнатная темпе-
ратура: 22,4°CДоведение pH: -
перорально50 Количество живот-
ных на 1-ю дозу: 6 перорально

Структура:

55



Первичный фармакологический отбор.
Испытание 100 особей на сильную реакцию в интервале доз. Испытывали соединение № 3371 (1/2 ч)

ED₅₀, мг/кг веса
тела

Автономная

усиление лакримации 22 НД

расширение зрачка 23 НД

640 мг/кг веса
тела

НД-ED₅₀ не достигается

Код №: SKI-D-59-B

Проект: алканоглициноаминокислоты

Цвет желтый

Источник: специалист/
виварий

Носитель: Tween 80

Форма: жидкий раствор

pH 3,0

Основной фактор: 1,0

Пол: самцы

Вид: крыса, выдержанная без пищи 18 ч

Температура 22,3°C

Доведение pH -

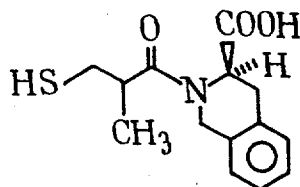
Использованные дозы:

640-10 мг/кг веса
тела

Способ введения: перорально

Количество животных на 2-ю дозу: 6

Структура:



Первичный фармакологический отбор.
Испытание 100 особей на сильную секцию в интервале доз. Испытывали соединение № 3371.

ED₅₀, мг/кг веса
тела

Центральная нервная система

снижение моторной 5 активности 113

Автономная

птоз 20 120

расширение зрачка 23 НД

Общая

снижение температуры пищевода 32 160

LD₅₀ приблизительно НД=ED₅₀ не дост-равна 320 мг/кг тигается веса тела X=ED₅₀ > LD₅₀

LD₀ равна приблизительно 160 мг/кг веса тела

Код №: SKI-D-59-B

Проект: алканоглициноаминокислоты

Источник: специалист/
виварий

Цвет: желтый

Форма: жидкий раствор

Носитель: 15% Tween 80

Основной фактор: 1,0

pH: 3,5

Вид: мышь, не выдержанная без пищи

Пол: самцы

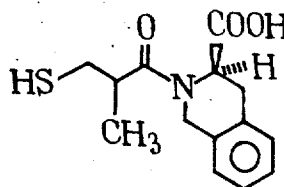
Температура 21,8°C

Использованные дозы: 320-20 мг/кг

Доведение pH: -
Способ введения: внутрибрюшинно

Количество животных на 1-ю дозу: 4

Структура:



Первичный фармакологический отбор.
Испытание 100 особей на сильную реакцию в интервале доз. Испытывали соединение № 3371 (3,5 и 24 ч).

Сильные симптомы
отсутствуют

640 мг/кг веса
тела

$LD_0 > 640$ мг/кг веса тела $HD=ED_{50}$ не достигается

Код №: SKI-D-59-B

Проект: алканоил-
аминокислоты

Код №: K1- -59-B Проект: алканоил-
аминокислоты

Источник: специ-
алист/
виварий

5 Источник: специа-
лист/
виварий

Цвет: желтый

Форма: жидкий раст-
вор

Цвет желтый

10 Форма: жидкий рас-
твор

Носитель: Tween
80

Основной фактор:
1,0

Носитель: Tween
80

15 Вид: крыса, выдер-
жанная без пищи
18 ч

pH 3,0

Вид: крыса, не вы-
держанная без пищи

pH 3,0

Использованные
дозы:

Пол: самцы

Температура
22,4°C

Пол: самцы

20 640-10 мг/кг

Доведение pH: -

Использованные
дозы:

Комнатная темпе-
ратура: 21,7°C

Количество живот-
ных на 1 дозу: 6

Способ введения:
перорально

640-10 мг/кг

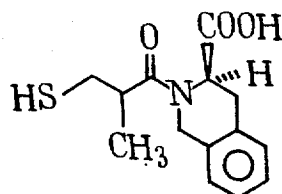
Доведение pH: -

Количество животных
на 1-ю дозу: 6

Способ введения:
перорально

25

Структура:



30

Первичный фармакологический отбор.
Испытание 100 особей на сильную ре-
акцию в интервале доз. Испытывали со-
единение № 3371.

ED_0 ED_{50} LD_{50}
/ LD_0 / LD_0 ED_{50}
 ED_{50} ED_{100} , мг/кг
веса тела

35 Центральная нервная
система

Первичный фармакологический отбор.
Испытание 100 особей на сильную ре-
акцию в интервале доз. Испытывали
соединение № 3371 (1 ч)

снижение мотор-
ной активнос-
ти - 5

39 113 2,83
1,42 0,48

ED_0 ED_{50} LD_{50}
/ LD_0 / LD_0 ED_{50}
 ED_{50} ED_{100} , мг/кг
веса тела

40

Автономная

птоз 20

39 120 2,67
1,33 0,44

Автономная

45

усиление лакрима-
ции 22

>320 >715 >0,9
>0,9 >0,4

расширение
зрачка 23

HD HD HD HD
HD

расширение зрач-
ка 23

>320 >640 >1
>1 >0,5

50 Общая

снижение темпе-
ратуры пищева-
да 32

80 160 2 1
0,5

Общая

55

снижение рек-
тальной темпе-
ратуры 30

HD HD HD HD
HD HD=E 50
не достигается

LD_{50} равна прибли-
зительно
320 мг/кг веса
тела $HD=ED_5$

не достигается

LD₅₀ равна приблизительно
160 мг/кг веса
тела

Код №: SKI-D-59-B

Проект: алканоил-
аминокислоты

Источник: специ-
алист/
виварий

Форма: жидкий
раствор

Основной фактор:
1,0

Вид: мышь, без вы-
держивания

без пищи

Использованные
дозы:

320-20 мг/кг

Количество живот-
ных на дозу: 4

Приложение В. Первичный фармако-
логический отбор. Испытание 100 на
сильную реакцию в интервале доз. Ис-
пытывали соединение № 3370-W.

ED₅₀, мг/кг веса
тела

Центральная нервная
система

тремор 2 40

конвульсии 3 X

понижение мотор-
ной активности 5 57

атаксия 6 40

потеря реф-
лекса выпрямле-
ния 11 84

Автономная

гиперемия 19 80

расширение
зрачков 23 X

Дыхание

одышка 26 84

цианоз 27 60

Общая

снижение темпе-
ратуры пищева-
да 32 42

42

НД=ED₅₀ не дости-
гается

X=ED₅₀ > LD₅₀

равна приблизитель-
но 64 мг/кг веса
тела

равна приблизитель-
но 42 мг/кг веса
тела

Код №: SKI-C-113-D

Проект: алканоил-
аминокислоты

Источник: специа-
лист/
виварий

Цвет белый

Форма: жидкокри-
сталлический раст-
вор

Носитель: вода

pH 6,0

Основной фактор:
1,56

Пол: самцы

Вид: мыши, не вы-
держанные без
пищи

Температура
22,5°C

Доведение pH -

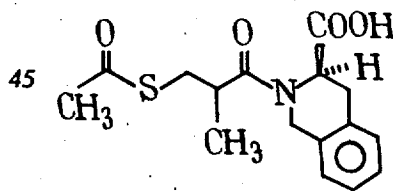
Использованные
дозы:

160-10 мг/кг

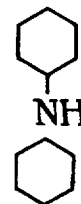
Способ введения:
внутрибрюшинно

Количество живот-
ных на 1-ю дозу: 4

Структура:



50



Первичный фармакологический отбор.
Испытание 100 особей на сильную ре-
акцию в интервале доз. Испытывали
соединение № 3370-W.

ED₀ ED₅₀ LD₅₀ /LD₀/LD₀/
ED₅₀ ED₅₀ ED₁₀₀, мг/кг веса
тела

Центральная нервная
система

Тремор 2	8	40	2,1	1,05	0,22
Конвульсии 3	34	108	0,78	0,39	0,12
снижение мотор- ной активности 5	40	57	1,47	0,74	0,53
атаксия 6	20	40	2,1	1,05	0,53
потеря рефлекса выпрямления 11	42	84	1	0,5	0,25

Автономная

гиперемия 19	40	80	1,05	0,52	0,26
расширение зрач- ков 23	40	89	0,94	0,47	0,21

Дыхание

одышка 26	42	84	1	0,5	0,25
цианоз 27	20	60	1,4	0,7	0,23

Общая

снижение темпе- ратуры пищева- да 32	21	42	2	1	0,5
--	----	----	---	---	-----

НД=ED₅₀ не достигается

LD₅₀ приблизительно равна 84 мг/кг веса тела

LD₅₀ приблизительно равна 42 мг/кг веса тела

Код №: SKI-C-113-D Проект: алканоиламинокислоты

Источник: специалист

виварий

Цвет белый

Форма: жидкокри-
сталлический раст-
вор

Носитель: вода

pH 6

Основной фактор:
1,56

Пол самцы

Вид: мышь, не вы-
держанная без пищи

Температура 22,5°C

Доведение pH -

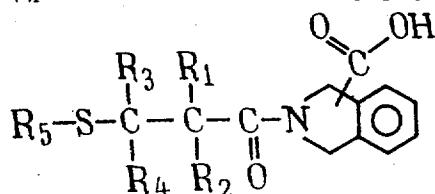
Использованные до-
зы: 160-10 мг/кг

Способ введения: внутрибрю-
шинно

Количество живот-
ных на 1-ю дозу: 4

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения производных тет-
рагидроизохинолина общей формулы



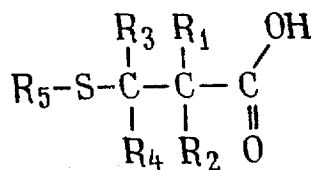
где R₁-R₄ - независимо друг от дру-
га водород или низший алкил с 1-6
атомами углерода;

R₅ - водород или низший алканоил
с 1-6 атомами углерода,
от л и ч а ю щ и й с я т е м , ч т о
тетрагидроизохинолин общей формулы

15

где Y - низший алкил,
подвергают ацилированию кислотой
формулы

20



25

где R₁-R₄ имеют указанные значения,
в присутствии дициклогексилкарбодии-
мида с последующим гидролизом и вы-
делением целевого продукта.

Составитель Г. Жукова

Редактор В. Ковтун Техред В.Кадар

Корректор А. Обручар

Заказ 1326/58

Тираж 372

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д.4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4