



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **96-00738**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **07.10.1994**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate: **07.10.1993 US 08/133.543;**
07.10.1993 US 08/133.696;
02.02.1994 US 08/190.764

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 94/11307 07.10.1994**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 95/09843 13.04.1995**

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.08.2004 BOPI nr. **8/2004**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 0346847; 0539192; 0560268

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: **AGOURON PHARMACEUTICALS, INC., SAN DIEGO, CALIFORNIA, US**

(73) Titular: **AGOURON PHARMACEUTICALS, INC., LA JOLLA, CALIFORNIA, US**

(72) Inventatori: **DRESSMAN BRUCE A., INDIANAPOLIS, INDIANA, US; FRITZ JAMES E., GREENWODE, INDIANA, US; HAMMOND MARLYS, PASADENA, CALIFORNIA, US; HORNBACK WILLIAM J., INDIANAPOLIS, INDIANA, US; KALDOR STEPHEN W., INDIANAPOLIS, INDIANA, US; KALISH VINCENT J., SAN DIEGO, CALIFORNIA, US; MUNROE JOHN E., INDIANAPOLIS, INDIANA, US; REICH SIEGFRIED HEINZ, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US; TATLOCK JOHN H., POWAY, CALIFORNIA, US; SHEPHERD TIMOTHY A., INDIANAPOLIS, INDIANA, US; RODRIGUEZ MICHAEL J., INDIANAPOLIS, INDIANA, US; JUNGHEIM LOUIS N., INDIANAPOLIS, INDIANA, US**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI**

(54) **DERIVAT DE DECAHIDROIZOCHINOLINĂ, COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ ȘI UTILIZARE**

(57) **Rezumat:** Prezenta invenție se referă la un derivat de decahidroizochinolină, la compoziția farmaceutică care îl conține și la utilizarea sa ca agent antiviral. Compusul conform invenției inhibă sau blochează activitatea proteazei HIV, provo-

când replicarea virusului HIV. Derivatul de decahidroizochinolină și compoziția farmaceutică, care îl conține, sunt agenți antivirali.

Revendicări: 9

RO 119363 B1



Prezenta invenție se referă la un derivat de decahidroizochinolină, la o compoziție farmaceutică, ce îl conține și la utilizarea sa ca agent antiviral.

Sindromul Imunodeficienței Dobândite (SIDA) este o boală sau o stare relativ nou recunoscută. SIDA provoacă distrugerea treptată a sistemului imunitar al corpului precum și deteriorarea progresivă a sistemului nervos central și periferic. Din anul primei sale recunoașteri, la începutul anilor 1980, SIDA s-a răspândit rapid, atingând astăzi proporții epidemice, în interiorul unor segmente relativ limitate de populație. Intensele cercetări au condus la descoperirea agentului responsabil, retrovirusul uman T-limfotropic III (HTLV-III), cunoscut astăzi ca virusul imunodeficienței umane sau HIV.

HIV este un membru al clasei de virusuri cunoscute ca retrovirusuri. Genomul retroviral este compus din RNA care este convertit la DNA prin transcripție reversă. Acest DNA retroviral este apoi integrat stabil într-un cromozom al celulei gazdă și folosind procesele de replicare ale celulelor gazdă, produce particule retrovirale noi și propagă infecția spre alte celule. HIV pare să aibă o afinitate deosebită pentru limfocitele umane T-4 care joacă un rol vital în sistemul imunitar al corpului. Infecția HIV a acestor leucocite epuizează populația acestor leucocite. În cele din urmă sistemul imunitar devine inoperativ și ineficient împotriva diferitelor boli oportuniste, cum ar fi, printre altele, pneumonia pneumocică carini, sarcomul Karposis și cancerul sistemului limfatic.

Deși mecanismul exact al formării și acționării virusului HIV nu este încă cunoscut, identificarea virusului a condus la unele progrese în controlarea bolii. De exemplu, medicamentul azidetimidina (AZT) a fost găsit eficient pentru inhibarea transcripției reverse a genomului retroviral al virusului HIV, oferind astfel o măsură a controlului bolii, fără a fi însă un tratament pentru pacienții afectați de SIDA. Cercetările continuă pentru medicamentele care pot trata sau, cel puțin, care pot oferi o modalitate îmbunătățită de control al virusului HIV, mortal.

Replicația retrovirală caracterizează, în mod obișnuit, procesul post-translațional al poliproteinelor. Acest proces este însoțit de enzima protează HIV codificată viral. Aceasta produce polipeptide mature care ajută, după aceea, la formarea și funcționarea virusului infecțios. Dacă acest proces molecular este întrerupt, atunci producerea normală de HIV este terminată. De aceea, inhibitorii de protează HIV pot funcționa ca agenți virali anti-HIV.

Proteaza HIV este unul din produsele de translație rezultate din gena pol a proteinei structurale HIV. Această protează retrovirală scindează în mod particular, alte polipeptide structurale în situsuri distincte pentru a elibera aceste proteine și enzime structurale nou activate făcând posibilă în acest fel replicarea virionului.

În același mod, inhibarea proteazei HIV de către compuși eficienți poate preveni integrarea provirală a limfocitelor T infectate în faza timpurie a ciclului de viață a HIV-1 și inhibă, de asemenea, procesul proteolitic viral, în timpul ultimului său stadiu. În mod suplimentar, inhibitorii proteazei pot avea avantajul de a fi mai ușor accesibili; să trăiască mai mult în virus și să fie mai puțin toxici decât medicamentele accesibile în mod curent, posibil datorită specificității lor pentru proteaza retrovirală.

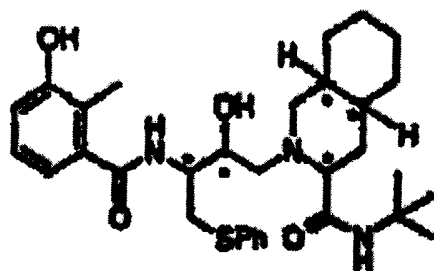
Sunt cunoscuți inhibitorii ai proteazei HIV aparținând clasei derivaților substituți ai acidului pipercolinic, despre care s-a demonstrat că interferează cu efectele citopatogenice induse de HIV în celulele umane (EP 0560268).

EP 0539192 descrie analogi de oligopeptide având proprietăți de inhibare a proteazei HIV.

De asemenea, sunt cunoscuți derivați ai aminoacizilor având activitate de inhibare a proteazelor de origine virală (EP 0346847). Sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora și compozițiile farmaceutice care îi conțin sunt, de asemenea, descrise.

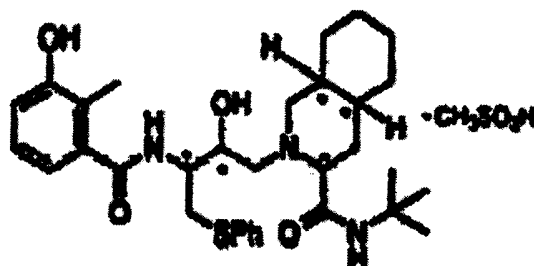
RO 119363 B1

Prezenta invenție se referă la un derivat de decahidroizochinolină, cu formula:



sau o sare acceptabilă farmaceutic, a acestuia.

Un alt obiect al prezentei invenții se referă la un derivat de decahidroizochinolină cu formula:

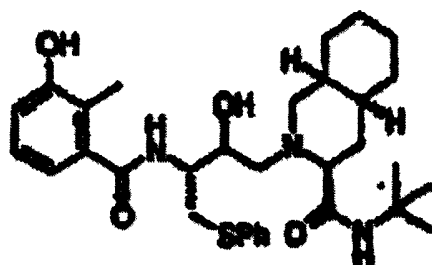


Invenția se referă, de asemenea, la o compoziție farmaceutică, cuprinzând compusul conform formulelor de mai sus și un purtător acceptabil farmaceutic.

Un alt obiect al invenției se referă la utilizarea unui compus cu formula de mai sus, la fabricarea unui medicament pentru inhibarea proteazei HIV.

Derivatul de decahidroizochinolină, sărurile lui acceptabile farmaceutic și izomerii săi pot inhiba și/sau bloca activitatea proteazei HIV, oprind proliferarea acesteia, fiind medicamente eficiente în tratamentul SIDA.

O realizare preferată a invenției o constituie stereoizomerul derivatului de decahidroizochinolină, care are formula:

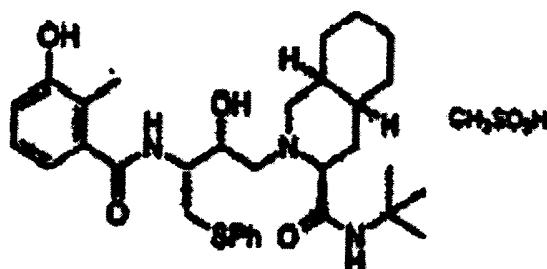


sau o sare acceptabilă farmaceutic, a acestuia.

Într-o realizare preferată în mod particular, sarea stereoizomerului este în mod esențial pură.

Într-o realizare mai preferată, izomerul este în mod esențial pur.

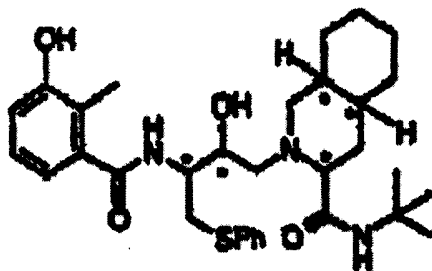
În concordanță cu o altă realizare preferată prezenta invenție furnizează un stereoizomer care are formula:



RO 119363 B1

Într-o realizare preferată în mod suplimentar, stereoisomerul este în mod esențial pur.

Compușii prezentei invenții au cel puțin doi centri asimetrici notați cu un asterisk în formula de mai jos.



Ca o consecință a acestor centri asimetrici, compușii din prezenta invenție pot să apară sub orice formă stereoisomerică, posibilă și pot fi utilizați în amestecuri de stereoisomeri, care pot fi optic active sau racemice sau pot fi utilizați singuri ca stereoisomeri în mod esențial puri, adică având cel puțin 95% puritate. Toate formele asimetrici, stereoisomenii individuali și combinațiile acestora sunt cuprinse în domeniul prezentei invenții.

Stereoisomerii individuali pot fi preparați din precursorii lor corespunzători prin proceduri descrise mai sus, prin rezoluția (separarea) amestecurilor racemice sau prin separarea diastereomerilor. Rezoluția se poate desfășura în prezența unui agent de rezoluție, prin cromatografie sau prin cristalizare repetată sau prin combinații ale acestor tehnici care sunt cunoscute în domeniu. Alte detalii privind rezoluția pot fi găsite în Jacques et al., *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, John Wiley & Sons 1981.

Preferabil, compușii din prezenta invenție sunt, în mod substanțial, puri, adică sunt de puritate peste 50%. De preferință, compușii au cel puțin puritate 75%. Mai preferabil compușii au puritate mai mare de 90%. Chiar mai preferabil, compușii au puritatea de cel puțin 95%, de preferință cel puțin 97% puritate și cel mai preferabil, cei puțin 99%.

După cum s-a menționat anterior, invenția include sărurile acceptabile farmaceutic, ale derivatului de decahidroizochinolină, definit mai sus. Compusul prezentei invenții poate avea o grupare suficient de acidă, o grupare suficient de bazică sau ambele grupări funcționale și în mod corespunzător, poate reacționa cu un număr de baze organice sau anorganice și acizi anorganici sau organici, pentru a forma o sare acceptabilă farmaceutic.

Termenul de "sare acceptabilă farmaceutic", utilizat în prezenta invenție, se referă la săruri ale compușilor cu formula de mai sus, care sunt, în principal, netoxice pentru organismele vii. Exemple de săruri acceptabile farmaceutic includ acele săruri preparate prin reacția compușilor din prezenta invenție, cu un acid mineral sau organic sau cu o baza anorganică. Reactanții sunt, în general, combinații într-un solvent ca, de exemplu, dietileter sau benzen, pentru săruri de adiție de acid, sau apă sau alcooli pentru săruri de adiție de baze. Sărurile precipită, în mod normal, din soluție în interval de o oră până la zece zile și pot fi izolate prin filtrare sau alte metode convenționale. Astfel de săruri sunt cunoscute ca săruri de adiție de acid și săruri de adiție de baze.

Acizii care se pot utiliza pentru a forma săruri de adiție de acid sunt acizi anorganici, cum ar fi acidul clorhidric, acidul bromhidric, acidul iodhidric, acidul sulfuric, acidul fosforic și alții asemenea și acizi organici cum ar fi acidul *p*-toluensulfonic, acidul metan sulfonic, acidul oxalic, acidul *p*-bromfenilsulfonic, acidul carbonic, acidul succinic, acidul citric, acid benzoic, acid acetic și alții asemenea.

Exemple de săruri acceptabile farmaceutic sunt sulfat, piro-sulfat, bisulfat, sulfid, bisulfid, fosfat, fosfat monoacid, fosfat diacid, metafosfat, pirofosfat, clorură, bromură, iodură, acetat, propionat, decanoat, caprilat, acrilat, format, izobutirat, caproat, heptanoat, propiolat, oxalat, malonat, succinat, suberat, sebacat, fumarat, maleat, butin-1,4-dioat, hexin-1,6-dioat,

RO 119363 B1

benzoat, clorbenzoat, metilbenzoat, dinitrobenzoat, hidroxibenzoat, metoxibenzoat, ftalat, sulfonat, xilensulfonat, fenilacetat, fenilpropionat, fenilbutirat, citrat, lactat, g-hidroxibutirat, glicolat, tartrat, metan-sulfonat, propansulfonat, naftalan-1-sulfonat, naftalen-2-sulfonat, mandelat și altele asemenea.

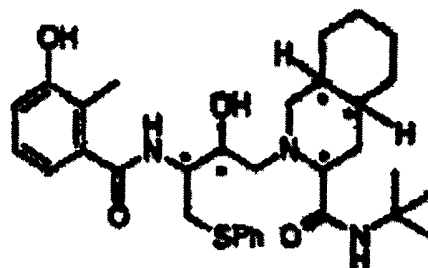
Sărurile preferate de adiție de acid acceptabile farmaceutic sunt acelea formate cu acizi minerali, cum ar fi acidul clorhidric și acidul bromhiaric și acelea formate cu acizi organici, cum ar fi acidul maleic și acidul metansulfonic. 150

Săruri de adiție de baze includ pe acelea derivate de la baze anorganice sau organice, cum ar fi hidroxid de amoniu sau hidroxizi de metale alcaline sau alcalino-pământoase, carbonați, bicarbonați și altele asemenea. Astfel de baze utilizate la prepararea sărurilor prezentei invenții includ hidroxidul de sodiu, hidroxidul de potasiu, hidroxidul de amoniu, carbonatul de potasiu, carbonatul de sodiu, bicarbonatul de sodiu, bicarbonatul de potasiu, hidroxidul de calciu, carbonatul de calciu și altele asemenea. Bazele de sodiu și de potasiu sunt preferate, în mod special. 155

Se va recunoaște faptul că contraionii particulari ce formează o parte a oricărei sări a acestei invenții nu sunt de natură critică atâta timp, cât sarea este în întregime acceptabilă farmaceutic și atâta timp, cât contraionul nu influențează, în mod nedorit, asupra sării, ca un întreg. 160

Compuși conform invenției sunt:

2-[2'-hidroxi-3'-feniltiometil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxifenil)pentil]decahidroizochinolin-3-H-t-butilcarboxamidă: 165



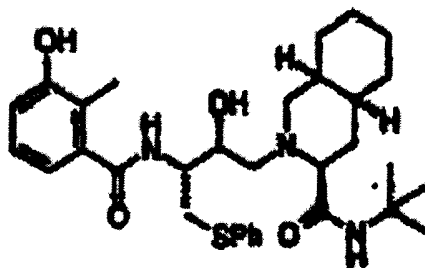
170

Sarea acidului 2-[2'-hidroxi-3'-feniltiometil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxifenil)pentil]decahidroizochinolin-3-H-t-butilcarboxamid metansulfonic 175

Fiecare dintre formulele de mai sus au 5 centri asimetrici și definesc astfel un compus selectat din grupa de 32 de stereoizomeri individuali și orice amestec de doi sau mai mulți stereoizomeri.

Stereoizomerii preferați ai acestor compuși sunt:

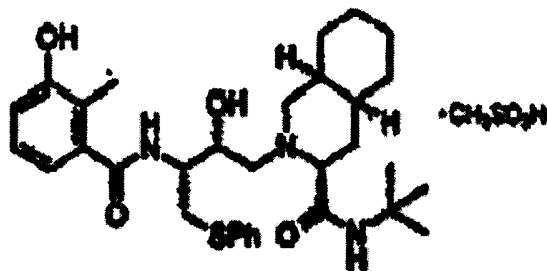
[3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-hidroxi-3'-feniltiometil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxifenil)pentil]decahidroizochinolin-3-H-t-butilcarboxamidă; 180



185

Sarea acidului [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-hidroxi-3'-feniltiometil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxifenil)pentil]decahidroizochinolin-3-H-t-butilcarboxamidă metansulfonic. 190

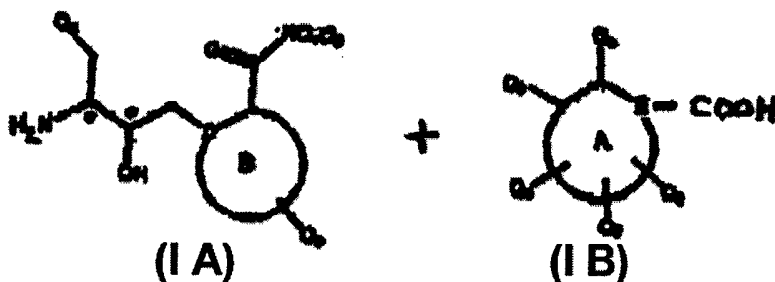
195



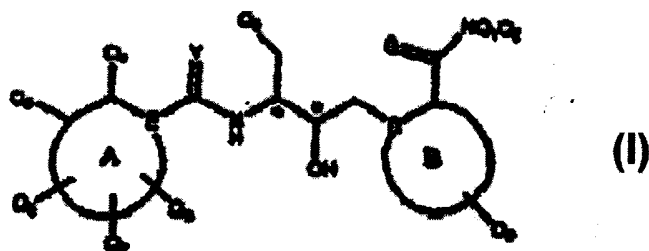
200

Compușii conform prezentei invenții pot fi preparați conform următoarei scheme generale de reacție I.

205



210



215

în care D este azot, G este oxigen, Q₁ este *tert*-butil, Q₂ este hidrogen, B este decahidroizochinolină, Q₃ este metiltiofenil, Q₉ este hidrogen, E este carbon, Q₄ este metil, Q₅ este hidroxil, A este fenil.

220 Reacția I este o reacție standard de cuplare, utilizată, în mod obișnuit, pentru sinteza amidelor sau peptidelor, care se realizează prin reacția unei amine cu formula 1A, substituită adecvat cu un acid carboxilic, cu formula 1B substituit adecvat, într-un solvent aprotic sau un amestec de solvenți. Reacția se desfășoară în mod obișnuit în prezența sau absența unui agent promotor, de preferință, în prezența unui agent promotor și în prezența unui agent de cuplare.

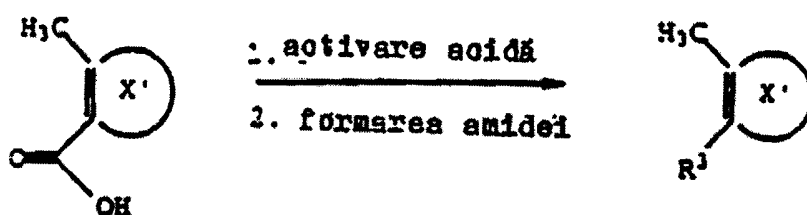
225 Solvenți aprotici tipici, pentru această reacție, sunt tetrahidrofuranul și dimetilformamida sau un amestec de astfel de solvenți. Reacția se desfășoară în mod caracteristic la o temperatură de la circa -30°C la circa 25°C. Reactantul aminic este folosit în proporții echimolare, raportat la acidul carboxilic, în prezența unei cantități echimolare, până la un mic exces, din reactivul de cuplare. Reactivii de cuplare, caracteristici, includ carbodiimide cum ar fi dicitohexilcarbodiimida (DCC) și N,N'-dietilcarbodiimida; imidazoli, cum ar fi carbonildiimidazol; cât și reactivi, cum ar fi clorura *bis*(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinică (BOP-Cl) sau N-etoxycarbonil-2-etoxi-1,2-dihidrochinolina (EEDQ). Un reactiv preferat de cuplare pentru această reacție este DCC. Pentru această reacție este preferabil să se includă și un agent promotor; un agent promotor preferat este hidratul de hidroxibenzotriazol (HOBT.H₂O).

235 O dată ce reacția este completă, dacă se dorește, compusul poate fi izolat prin proceduri cunoscute în domeniu, de exemplu, compusul poate fi cristalizat și apoi colectat prin filtrare sau solventul de reacție poate fi îndepărtat prin extracție, evaporare sau decantare. Compusul poate fi mai departe purificat, (dacă se dorește), prin tehnici, cum ar fi cristalizarea sau cromatografia pe suporturi solide, cum ar fi silicagelul sau atumină.

240 Compușii inițiali cu formula IA pot fi preparați conform procedurilor prezentate în Schema de reacție A.

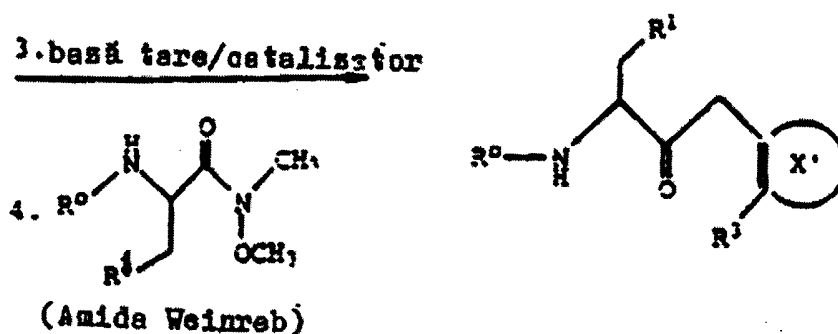
RO 119363 B1

Schema de reacție A



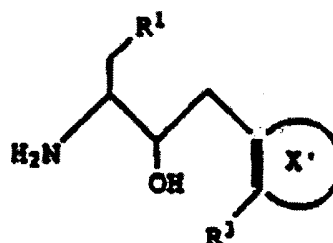
245

3. bază tare/catalizator



250

5. reducere
6. de-protecție

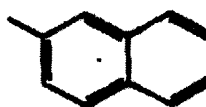


260

în care:

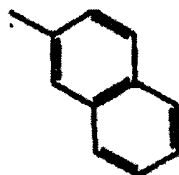
este o grupare având formula :

265



sau

270



275

în care:

V^A este o grupare de protecție amino;

B, D, G, Q, Q₂, Q₈ și Q₉ sunt definite, în același fel, cum sunt definite în formula (1) de mai sus; și

ZZ este halogen.

280

Schema de reacție A, de mai sus, este însoțită de reacțiile 1 - 7 în ordine secvențială. Îndată ce reacția este completă, compusul intermediar poate fi izolat, dacă se dorește, prin proceduri cunoscute în domeniu, de exemplu, compusul poate fi cristalizat și apoi colectat prin filtrare sau solventul de reacție poate fi îndepărtat prin extracție, evaporare sau decantare.

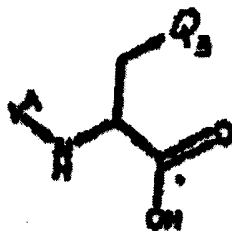
285

RO 119363 B1

290 Compusul intermediar poate fi purificat suplimentar, dacă se dorește, prin tehnici cunoscute cum ar fi cristalizare sau cromatografie pe suport solid cum ar fi silicagel sau alumină înainte desfășurării următoarei etape din schema de reacție.

Reacția A.1 este condusă prin transformarea unui acid carboxilic amino protejat având structura:

295



300

într-o anhidridă mixtă corespunzătoare în condiții cunoscute în domeniu. De exemplu, acidul carboxilic amino protejat poate fi reacționat cu un cloroformiat de alchil C₁-C₆, cum ar fi, de preferință, cloroformiat de izobutil, în prezența unui captator de acid. Captatorii de acid preferați sunt trialchilaminele, de preferință, trietilamina. Reacția se desfășoară, în mod caracteristic, într-un solvent aprotic cum ar fi acetat de etil. Alegerea solventului nu reprezintă o problemă dificilă atâta timp, cât solventul folosit este inert față de reacția în desfășurare, iar reactanții sunt solubiliți suficient, pentru a se desfășura reacția dorită. Anhidrida mixtă rezultantă este utilizată, de preferință, în Reacția A.2 fără o izolare sau purificare ulterioară.

305

Reacția A.2 se realizează în două etape. La început, o soluție de hidroxid de sodiu, acoperită cu un strat de solvent eteric, de preferință, dietileter, reacționează cu un exces mare de N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidină, pentru a forma diazometan. Hidroxidul de sodiu este, de preferință, utilizat ca soluție apoasă, având aproape patru la șase moli/l de hidroxid de sodiu. O dată ce reacția este completă, stratul organic este uscat pe un desicant, cum ar fi hidroxid de potasiu. Această soluție reacționează apoi cu anhidrida mixtă din Reacția A.1, de mai sus, pentru a forma compusul *alfa*-diazocarbonil corespunzător. Diazometanul reactant este, de preferință, utilizat în această reacție fără izolare sau purificare. Această reacție se desfășoară, în mod caracteristic, la o temperatură de la circa -50°C la aproape -100°C, de preferință -20°C.

310

315

În Reacția A.3, compusul *alfa*-diazocarbonil preparat în Reacția A.2 reacționează cu un acid cu formula H-ZZ în care ZZ este halo, în mod caracteristic, într-un solvent aprotic, cum ar fi dietileter, pentru a forma compusul *alfa*-halo carbonil. Un acid reactant preferat este acidul clorhidric, care conduce la formarea compusului *alfa*-cloro carbonil.

320

Reacția se desfășoară, în mod obișnuit, la o temperatură de la circa -30°C la circa 0°C. Alegerea solventului nu constituie o problemă atâta timp, cât este inert față de reacția în desfășurare și reactanții sunt solubiliți suficient pentru a realiza reacția dorită. Reactantul acid este, în mod normal, adăugat sub forma unui gaz anhidru în cantități mici, până când reacția pare a fi în mod substanțial completă. Reacția poate fi urmărită prin cromatografie în strat subțire.

325

În Reacția A.4, restul carbonil al compusului preparat în Reacția A.3 este redus, utilizând condițiile standard cunoscute în domeniu, pentru a forma compusul *alfa*-clor hidroxi corespunzător. De exemplu, compusul preparat în reacția A.3 este combinat cu un agent reducător într-un amestec de solvenți. Agenții reducători obișnuiți sunt borohidrura de sodiu, borohidrura de litiu, borohidrura de zinc, hidrura de diizobutilaluminiu și hidrura de sodiu bi(2-metoxi-etoxi)aluminiu. Un agent reducător, preferat, este borohidrura de sodiu. Amestecurile caracteristice de solvenți includ un amestec protic și aprotic, cum ar fi tetrahidrofuran/apă. Alegerea solventului nu constituie o problemă atâta timp, cât solventul utilizat este inert față de reacția în desfășurare și reactanții sunt solubiliți suficient pentru a se desfășura reacția dorită. Reacția se desfășoară în mod obișnuit la o temperatură de la circa -10°C, de preferință 0°C.

330

335

RO 119363 B1

În Reacția A.5, compusul *alfa*-clor hidroxi, preparat în Reacția A.4, este tratat cu o bază tare pentru a forma epoxidul corespunzător în condiții standard cunoscute în domeniu. De exemplu, compusul *alfa*-clor hidroxi poate fi reacționat cu un amestec hidroxid de potasiu/etanol, într-un solvent alcoolic, cum ar fi etanol. Reacția se desfășoară la o temperatură de la circa 0°C, la temperatura de reflux a solventului. De preferință, reacția se desfășoară la temperatura camerei.

340

În Reacția A.6, epoxidul preparat în Reacția A.5 reacționează cu un reactant heterociclic

345



350

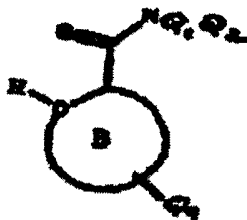
În mod obișnuit, într-un solvent alcoolic, la o temperatură caracteristică, cuprinsă de la circa 20°C la 100°C. Alegerea solventului nu constituie o problemă atâta vreme, cât solventul folosit este inert față de reacția în desfășurare, iar reactanții sunt solubili și suficient pentru a se produce reacția dorită. Solvenți caracteristici pentru această reacție includ alcoolii, de preferință, izopropanol sau etanol. Reacția se desfășoară, de preferință, la o temperatură de circa 80°C.

355

Reacția A. 7 este o reacție standard, de deprotejare a grupării aminice utilizând metode și proceduri cunoscute în domeniu pentru a se obține amina corespunzătoare, care este utilizată în Reacția I de mai sus, Această amină poate reacționa fără purificare, dar este de preferat ca, mai întâi, să fie purificată.

360

Reactanții heterociclici cu formula

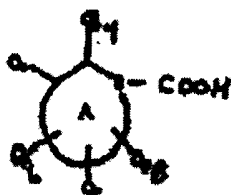


365

utilizați în Reacția A.6, pot fi preparați, utilizând proceduri și metode cunoscute în domeniu. De exemplu, reactanții heterociclici au fost preparați, în mod obișnuit, din amino acizi amino protejați corespunzător, prin activare acidă urmată de tratament cu o alchil-amină. Reacția se desfășoară în mod obișnuit în prezența unui acceptor de acid cum ar fi N-metilmorfolina. Îndepărtarea grupării protectoare a grupării amino utilizând tehnici chimice standard de deprotejare conduce apoi la formarea de reactanți heterociclici.

375

Reactantul, acid carboxilic cu formula (IB),

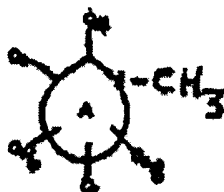


380

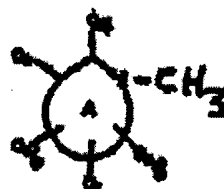
utilizat în Schema I de reacție, nedisponibil comercial, poate fi preparat utilizând proceduri cunoscute. Mai particular, acest reactant poate fi preparat prin substituția și/sau oxidarea unui compus carbociclic sau heterociclic disponibil comercial. De exemplu, compusul carbociclic sau heterociclic cu formula

385

390



395 poate fi oxidat, utilizând proceduri cunoscute în domeniu. În mod specific compusul cu formula



400

poate reacționa cu un agent de oxidare cum ar fi dioxidul de seleniu sau permanganatul de potasiu, la temperaturi cuprinse între circa 0°C la 200°C într-un solvent inert cum ar fi apa sau difenileter.

405 O a doua metodă de preparare a compușilor cu formula (IB) implică protejarea unei grupări carbociclice sau heterociclice carboxilate, substituie corespunzător cu o grupare de protecție carboxi urmată de substituie grupării carbociclice sau heterociclice, utilizând proceduri cunoscute în domeniu. Gruparea de protecție carboxi poate fi îndepărtată, utilizând proceduri cunoscute în domeniu, pentru a se obține acidul carboxilic dorit, cu formula (IB).

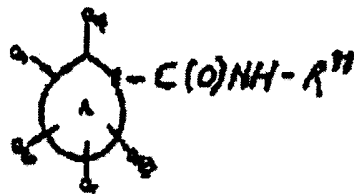
410 Termenul de "grupare de protecție carboxi" folosit în invenție se referă la substituie grupării carboxi, folosiți în mod obișnuit, pentru a bloca sau proteja funcționalitatea carboxi, în timp, se reacționează alte grupări funcționale ale compusului. Exemple de astfel de grupări de protecție carboxi includ metil, *p*-nitrobenzil, *p*-metilbenzil, *p*-metoxibenzil, 3,4-dimetoxibenzil, 2,4-dimetoxibenzil, 2,4,6-trimetoxibenzil, 2,4,6-trimetilbenzil, pentametilbenzil, 3,4-metilendioxibenzil, benazdril, 4,4'-dimetoxibenzidril, 2,2'-4,4'-tetrametoxibenzidril, *t*-butil, *t*-amil, tritil, 4-metoxitritil, 4,4'-dimetoxi-tritil, 4,4'-4,4''-trimetoxitritil, 2-fenilprop-2-il, trimetilsilil, *t*-butildimetilsilil, fenacil, 2,2,2-tricloretil, *b*-(*di*(*n*-butil)metilsilil)etil, *p*-toluensulfoniletil, 4-nitrobenzilsulfoniletil, alil, cinamil, 1-(trimetilsililmetil)prop-1-en-3-il și altele asemenea. O metodă preferată, de protejare a grupării carboxi, implică transformarea restului carboxi într-un rest amidic și apoi hidrolizarea amidei, pentru a se obține substituentul carboxi dorit. Alte exemple de astfel de grupări se găsesc în E.Haslam, *Protective Groups in Organic Chemistry*, J.G.W. Mc.Omie, Ed. Plenum Press New York, 1973, capitol 5 și T.W.Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley și Sons, New York, 1981, Capitol 5.

425 O procedură preferată, de protejare a restului carboxi, implică activarea acidă a părții carboxi, urmată de formarea unei amide. De exemplu, restul carboxi poate fi transformat într-o halogenură de acil, acil anhidridă, acil imidazol și altele asemenea, de preferință în prezența unui captator de acid pentru a forma un rest carboxi activat. Se folosește în mod caracteristic o clorură acidă disponibilă comercial înlăturând necesitatea unei activări acide suplimentare. Captatorii de acid preferați sunt trietilaminele, de preferință, trietilamina.

430 Reacția se desfășoară, în mod obișnuit, într-un solvent aprotic, cum ar fi dietileter, clorură de metilen și alții asemenea. Un solvent preferat este clorura de metilen. Alegerea solventului nu este o problemă dificilă atâta timp, cât solventul folosit este inert față de reacția în desfășurare, iar reactanții sunt solubili suficient pentru a se desfășura reacția dorită. Partea carboxi activată reacționează apoi cu o amină, R₁₁-NH₂, de exemplu, anilină într-un solvent aprotic pentru a se obține un reactant amidic

435

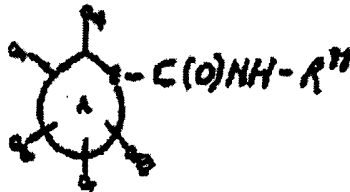
RO 119363 B1



care poate fi, mai departe, substituit conform metodelor cunoscute.

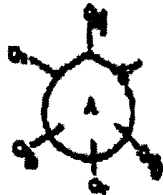
440

Reactantul amidic



445

poate fi, mai departe, substituit prin deprotonare în *orto* a grupării



450

pentru a se obține anionul corespunzător, urmată de reacția cu o gamă de reactivi, cum ar fi halogenuri de alchil sau agenți de halogenare, cum ar fi bromul. Reactantul amidic este, în general, deprotonat de două ori, utilizând doi echivalenți ai unei baze tari, cum ar fi *n*-butil litiu sau *sec*-butil litiu referitor la reactantul amidic, opțional, în prezența unui agent metallic de coordinare cum ar fi tetra-metiletilediamina (TMEDA). Reacția se desfășoară, în mod caracteristic, într-un solvent aprotic, de preferință un eter cum ar fi dietileter, tetrahidrofuran sau alții asemenea, la o temperatură de la circa -78°C până la aproape 25°C.

455

Compusul rezultat poate fi apoi hidrolizat, utilizând proceduri cunoscute în domeniu pentru a se obține acidul carboxilic reactant, substituit, dorit, având formula (IB). De exemplu, hidroliza corespunzătoare implică expunerea reactantului amidic la un acid mineral tare, acid organic sau un amestec de acid mineral/organic la o temperatură de la circa 100°C până la circa 160°C. Acizi adecvați ce se pot folosi în această reacție sunt acidul bromhidric, acidul acetic, acidul clorhidric și alții asemenea. Se poate folosi, opțional, un tub etanșat pentru a accelera viteza de reacție.

460

465

O a treia metodă de preparare a acidului carboxilic substituit, având formula (IB), implică diazotarea unei aniline, urmată de stingerea sării de diazoniu rezultate. În mod particular restul aminic al anilinei reactante este transformată într-o sare de diazoniu prin reacția cu acid azotos. Acidul azotos poate fi produs *in situ* prin tratarea nitritului de sodiu cu o soluție apoasă a unui acid tare cum ar fi acidul clorhidric sau acidul sulfuric. Această reacție se desfășoară, în mod caracteristic la sau sub 5°C. Sarea de diazoniu este apoi stinsă prin reacția cu un reactant corespunzător, pentru a se obține sistemul aromatic substituit dorit. Reactivi reprezentativi de stingere sunt apa, cianura, halogenura, acid sulfuric apos și alții asemenea. În mod caracteristic, reacția va fi încălzită pentru a facilita reacția dorită.

470

475

Sunt cunoscute o varietate de reacții în domeniu, care se pot utiliza pentru a produce substituțiile dorite pe inelele carbociclice sau heterociclice. De exemplu, există o varietate de reacții de substituție electrofile și nucleofile aromatice prezentate în capitolele 11 și 13 din March, J., *Advanced Organic Chemistry*, a treia ediție, Wiley, 1985.

480

485 Suplimentar, compușii cu formula (IB) pot fi preparați prin carboxilarea unui compus carbociclic sau heterociclic substituit corespunzător. Carboxilarea se poate realiza, utilizând un număr de reactivi diferiți. De exemplu, reactivul carbociclic sau heterociclic poate reacționa cu fosgen, clorură de oxalil, clorhidrat de uree sau clorură de N,N-dietilcarbamoil în prezența unui catalizator Friedel Crafts. O variantă a acestei metode implică reacționarea unui reactiv carbociclic sau heterociclic cu un tricolorformiat de alchil (RSCOC1) sau o clorură de carbamoil (H₂NCOCl) pentru a se obține o amidă sau un tiol ester. Amida și tiol esterul pot fi apoi hidrolizate pentru a se obține gruparea carboxi dorită. March, la 491.

490 Exemple de catalizatori Friedel-Crafts includ acizi Lewis, cum ar fi bromura de aluminiu (AlBr₃), clorura de aluminiu (AlCl₃), clorura de fier (III) (FeCl₃), tricolorura de bor (BCl₃), trifluorura de bor (BF₃) și alții asemenea. Vezi de asemenea, March. J., *Advanced Organic Chemistry*, a treia ediție, Wiley, 1985; Olah *Friedel-Crafts and Related Reactions*, Interscience, New York, 1963-1965; și Olah, *Friedel-Crafts Chemistry*, Wiley, New York, 1973.

495 După cum s-a menționat mai sus, compușii prezentei invenții sunt folosiți pentru inhibarea proteazei HIV, care este o enzimă asociată ansamblului și producției componente virale.

500 Termenul "cantitate eficientă" înseamnă o cantitate dintr-un compus, conform invenției, sau sarea sa acceptabilă farmaceutic, care este eficientă în producția și asamblarea componentelor virale mediate de proteaza HIV. Doza specifică a compusului administrat conform prezentei invenții, pentru a obține efecte de inhibare sau terapeutice, va fi, desigur, determinată de împrejurări speciale cu privire la caz, incluzând, de exemplu, compusul administrat, calea de administrare, starea care trebuie tratată și gazda sau pacientul care trebuie tratat individual. O doză zilnică caracteristică (administrată într-o singură doză sau doze divizate) conține un nivel de dozaj al compusului prezentei invenții de la circa 0,01 mg/kg până la circa 50 mg/kg de greutate corp. Dozele zilnice preferate sunt, în general, de la circa 0,05 mg/kg până la circa 20 mg/kg și, mai preferabil, de la circa 0,1 mg/kg până la circa 10 mg/kg.

510 Compușii prezentei invenții pot fi administrați printr-o varietate de căi, incluzând, căile: orală, rectală, transdermică, subcutanată, intravenoasă, intramusculară și intranasală. Compușii prezentei invenții sunt formulați, de preferință, înaintea administrării. De aceea, o altă realizare a prezentei invenții este o compoziție sau o formulare farmaceutică cuprinzând o cantitate eficientă dintr-un compus conform invenției sau dintr-o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic și un vehicul acceptabil farmaceutic, cum ar fi un diluant sau un excipient, pentru aceasta.

515 De preferință, ingredientul activ reprezintă de la 0,1 % până la 99% în greutate din formulare. Prin "acceptabil farmaceutic" se înțelege că vehicolul, cum ar fi diluantul sau excipientul, este compatibil cu celelalte ingrediente ale formulării și nu sunt dăunătoare gazdei sau pacientului.

520 Formulările farmaceutice pot fi preparate din compușii prezentei invenții prin procedee cunoscute, folosind ingrediente disponibile și cunoscute. La fabricarea compozițiilor prezentei invenții, ingredientul activ va fi, în mod obișnuit, amestecat cu un purtător sau diluat cu un purtător sau inclus în interiorul unui purtător, care poate fi de forma unei capsule, sașeț, hârtie sau alt recipient corespunzător. Când purtătorul servește drept diluant, el poate fi un material solid, semi-solid sau lichid, care acționează ca un vehicol, excipient sau mediu pentru ingredientul activ. Astfel, compozițiile pot fi sub formă de tablete, pilule, pulberi, pastile, sașețe, casete, elixiruri, suspensii, emulsii, soluții, siropuri, aerosoli, (ca un solid sau într-un mediu lichid), unguente (conținând, de exemplu, până la 10% în greutate din compusul activ), capsule moi sau tari de gelatină, supozitoare, soluții sterile injectabile, pulberi sterile compacte și altele asemenea.

Testarea Activității

S-a folosit un număr de teste, pentru a testa activitatea biologică a compușilor inhibitori ai proteazei HIV. De exemplu, testele s-au folosit pentru a analiza vitezele de inhibare proteolitică și efectele antivirale asupra liniilor celulare infectate cu HIV. Se descriu mai jos procedurile pentru aceste experimente. Rezultatele din aceste încercări sunt expuse, mai jos, în tabelul 1 sau sunt expuse în exemplele de mai sus. 535

I. Analiza primară a medicamentelor conținând compuși anti-HIV la Southern Research Institute (SRI) (Rezultatele înregistrate în Tabelul 1 sunt notate "SRI CEM (ng/ml)" sau "SRI MT2 (ng/ml)"). 540

A. Principiul Analizei Mtt

SRI are un program stabilit pentru analiza primară antivirală a compușilor prin analize de microtitrare, care măsoară capacitatea unui compus ales, de a inhiba distrugerea celulară indusă de HIV. Această analiză implică transformarea colorantului MET de tetrazoliu într-un produs de formazan colorat, cu enzime mitocondriale în celulele active metabolic. Acest sistem de analiză este folosit la SRI pentru a analiza peste 30.000 de compuși pe an. Pe scurt, analiza implică contaminarea celulelor CEM sau MT2, pe plăci cu fund rotund cu 96 de cavități. Compusul de interes se adaugă chiar înaintea contaminării. Pe durata a 6 zile de incubare la 37°C, plăcile sunt colorate cu MTT. Rezultatele analizei sunt înregistrate spectrofotometric cu un cititor de placă Molecular Devices Vmax. Rezultatele sunt analizate prin regresie liniară folosind un program de software local pentru a calcula activitatea antivirală (IC_{25} , IC_{50} , IC_{95}) și toxicitatea (TC_{25} , TC_{50} , TC_{95}) și în aceeași măsură și alte valori. 545

Analizele antivirale primare sunt realizate în mod obișnuit în celule CBM sau MT-2. SRI a descoperit că toți compușii activi au fost identificați în celule CEM, în timp ce experimentele realizate pe linia celulară MT-2 pierd o mică porție din compușii activi. 550

*B. Testele standard în celulele Cem Și Mt-2**1. Diluția compusului și depunerea pe plăci*

Medicamentele sunt solubilizate, dacă este necesar, în vehicolul corespunzător, cum ar fi, apă distilată sau DMSO. Se folosesc mănuși de cauciuc, halate și măști, pe toată durata fazelor procesului de manipulare pentru a preveni expunerea la agenți nocivi. Medicamentul se prepară în concentrația corespunzătoare și se păstrează la -20°C până când se folosește la analiza de laborator. Prima diluție a fiecărui compus se realizează într-un tub de diluție cu mediu pentru a realiza o concentrație dublă față de concentrația superioară a testului. Tuburile sterile de titrare sunt folosite apoi pentru a realiza în serie, diluții semilogaritmice pentru fiecare compus. Continuând diluția medicamentului, compusul diluat se adaugă în cavitatea corespunzătoare a unei plăci de microtitrare cu 96 de cavități. Pot fi analizate în mod convenabil până la 12 diluții pe o singură placă în triplicat cu toate controalele corespunzătoare incluzând controlul celulei, controlul virusului, controlul toxicității, controlul culorii medicamentului, controlul mediului și controlul (baza) plastic. Când testarea include numai șase diluții pot fi testate două medicamente pe o singură placă de microtitrare. Medicamentele se adaugă pe placă într-un volum final de 100 microlitri. 560

2. Celule și virus

În timpul în care sunt preparate diluțiile medicamentului, celulele sunt spălate și numărate. Viabilitatea este monitorizată prin eliminarea colorantului albastru de tripan și analiza nu se efectuează, dacă viabilitatea scade mai jos de 90%. Celulele se mențin într-o fază de creștere exponențială și sunt înjumătățite (în ziua anterioară analizei), pentru a asigura viteza de creștere exponențială. 570

Pentru analiza primară, liniile celulare utilizate sunt CE'M și MT-2. În afara altor indicații, mediul folosit este RPMI 1640 cu 10% ser fetal de vițel inactivat termic (FBS), glutamină și antibiotice. 575

RO 119363 B1

Celulele sunt înmulțite la 37°C într-o atmosferă de 5% CO₂ în aer. Virusul utilizat pentru acest experiment este HIV-1, izolați IIB și/sau RF, care sunt preparați printr-un proces de infectare acută. Pe scurt, celulele infectate cu virus sunt peletizate zilnic începând la trei zile după infecție până când virusul a distrus toate celulele din cultură. Activitatea revers transcriptazei și ELISA p24, sunt folosite pentru a identifica fracțiile cu cantitatea cea mai mare de virus.

Recoltele din aceste 24 h sunt reunite, sunt filtrate și sunt congelate la - 90°C. Anterior folosirii în analiză, fracția infecțioasă cu virus este titrată pe toate liniile de celule disponibile au scopul de a determina cantitatea de virus necesară în analiza antivirală.

În general, fracțiile produse prin metoda infecției acute necesită adăugarea unui microlitru de virus infecțios per cavitare, care rezultă în analiza medicamentelor la o multiplicare a infecției de 0,01. În acest mod, este preparat și înghețat destul virus și pentru a completa peste o mie de plăci de microtitrare, permițând testarea până la două mii de compuși dintr-un singur stoc de virus infecțios. Utilizarea unui singur stoc de viruși pentru o perioadă lungă de testare are efecte favorabile asupra repetabilității sistemelor de analiză.

Infecția cu virus a celulelor CEM și MT-2 pentru analiza antivirală se realizează într-un proces de infecție în masă. Numărul corespunzător de celule necesare completării analizei este amestecat cu virus infecțios într-un tub conic centrifugal într-un volum total mic, de 1-2 ml.

După o incubare de 4 h, celulele infectate sunt aduse la concentrația finală corespunzătoare de 5×10^4 celule per mililitru cu mediu de cultură din țesut proaspăt și se adaugă 100 μl în cavitățile de control a virusului și în cavitățile destinate experimentelor corespunzătoare. Celulele neinfectate la aceeași concentrație sunt depuse pe placă pentru controlul toxicității și pentru controalele celulelor. De asemenea, analizele pot fi realizate folosind o metodă de infectare în cavitare. În acest caz, medicamentul, celulele și virusul se adaugă în mod individual, în cavitare.

În fiecare caz, se mai adaugă pentru a obține distrugerea celulară completă în cavitățile de control al virusului până în ziua a 6.

3. Evaluarea inhibării CPE

După adăugarea de celule și medicamente pe placa de microtitrare, placa este incubată timp de 6 zile, la 37°C. Experiența a indicat faptul că incubarea pentru perioade mai lungi de timp (7-8 zile) sau utilizarea unui număr mai mare de celule alimentate (1×10^4), conduce la scăderi semnificative ale viabilității celulelor de control și la o limitare a densității optice, între controalele celulelor și ale virusului, după colorarea cu MTT.

Metoda de evaluare a analizei antivirale implică adăugarea a 20 μl de sare de tetrazoliu a MTT la 5 mg/ml în fiecare cavitare a plăcii timp de 4 - 8 h. După această perioadă de incubare, celulele sunt dislocate prin adăugare de 50 μl de 20% SDS în HCl 0,01 N.

Activitatea metabolică a celulelor viabile în cultură se reflectă într-un produs de reacție colorat, care se măsoară spectrofotometric cu un cititor de placă Molecular Devices Vmax la 570 nm. Valoarea densității optice (O.D.) este o funcție a cantității de produs formazan, care este proporțională cu numărul de celule viabile.

Cititorul de placă este în legătură directă cu un microcalculator pentru analiză în laborator, care evaluează datele de pe plăci și calculează datele de pe plăci. Informația de pe plăcii furnizează toate informațiile pertinente incluzând valorile neprelucrate ale O.D., media O.D. calculată și reducerea procentuală a CPE viral, la fel și calculele care includ TC₅₀, IC₅₀ și indicii antivirali și indicii de specificitate. În final, rezultatele includ un grafic care descrie vizual efectul compusului asupra celulelor infectate (toxicitatea) și efectul protector sau neprotector al compusului asupra celulelor infectate.

RO 119363 B1

II. Analiza pe celule integrale a compușilor anti-HIV, la Eli Lilly (Rezultatele înregistrate în Tabelul 1 sunt denumite "IC₅₀ pe celule integrale" sau "IC₉₀ pe celulă integrale" 630

a. Scopul și materialele

Scopul: De a determina IC₅₀ și CC₅₀ pentru compușii:

Reactivi și materiale

Mediul A

Mediul A [1% DMSO] (100 microlitri DMSO + 9,9 ml mediul A, SN 125 folosite pentru a infecta celulele (15 ml pentru 6 plăci) (10 ml pentru 4 plăci) 635

Celule CEM [1x10⁴] celule/ml (4 plăci = 40 ml) (6 plăci=60 ml)

DMSO (necesar: 5 ml)

35B la /10 mM/ (necesari: 70 microlitri de fiecare)

A-D la /10 mM/ în 100% DMSO 640

4 sau 6 plăci cu 96 cavități cu fund în forma de u

4 plăci cu 96 cavități cu fund plat, pentru diluții

8-10 cutii cu pipete costar sterile

Aproximativ 10 cuve cu reactiv

Costar 12-pette 645

Informație relevantă:

1000 celule/cavitate = 1 x 10⁴ celule/ml = 1000 celule/ 100 μl

200 μl = volumul total într-o cavitate.

Concentrație finală de DMSO = 0,25 %

Diluție finală de Sn 123 = 1:64 650

Compuși diluați în serie 35B, A-D, 1:3

B. Procedeu

1. Prepararea Celulelor și Depunerea Pe Placă a Celulelor, Mediului a și Mediului a (1% DMSO)

a. Se numerotează o placă cu 96 cavități cu cultură de țesut pentru fiecare compus de testat, una pentru o placă de control și una pentru compusul controlat 655

| Nr. Placă | Descriere |
|-----------|--------------------------------|
| 1 | Controale negative și pozitive |
| 2 | 35 B |
| 3 | A |
| 4 | B |
| 5 | C |
| 6 | D |

 660

b. Se numără celulele pe hemacitometru și acestea se resuspendă în 40 ml sau 80 ml de Mediu A la o concentrație de [1 x 10⁴] celule/ml. 665

Numărarea celulelor pe un Hemacitometru:

Se marchează două tuburi nunc de 1,8 ml, 1 și 2. Se pun 0,5 ml celule CEM amestecate în cavități (în faza de creștere) în tubul 1.

Se pun 50 μl PBS și 40 μl de colorant albastru tripan în tubul 2. 670

Se amestecă celulele în tubul 1, apoi se îndepărtează 10 μl de celule și se pun în tubul 2.

Se amestecă în tubul 2, apoi se îndepărtează 10 μl din celulele colorate și se pun în hemacitometru.

RO 119363 B1

- 675 Se numără celulele în pătratul centrului hemacitometrului cu microscopul stabilit pe 10X.
- Concentrația stocului de celule CEM în celule/ml este după cum urmează:
Celule numărate $\times 1 \times 10^5 =$ Concentrația de celule CEM în [celule/ml]
- c. Se adaugă 200 μ l de Mediu A la A1 al plăcilor 2-6. Acestea sunt goale.
- 680 A4-H4 al plăcii 1. Acestea sunt goale.
- d. Se adaugă 5 μ l de Mediu A în toate cavitățile rândurilor A-D ale plăcilor 2-6 cu excepția A1 (jumătatea superioară a fiecărei plăci).
- e. Se adaugă 50 μ l de Mediu A în cavitățile A1-D3 ale plăcii 1 (jumătatea superioară a plăcii).
- 685 f. Se adaugă 50 μ l Mediu A [1% DMSO] în toate cavitățile coloanelor 1-3 ale plăcii 1.
- g. Se adaugă 100 μ l de [1×10^4] celule/ml în toate cavitățile coloanelor 1-3 ale plăcii 1 și în toate cavitățile (cu excepția A1 care este goală) celorlalte plăci. Pe aceasta se depune 1000 celule/cavitate.
- h. Se pun plăcile într-un incubator, în timp ce se prepară diluțiile de medicament.
- 690 2. Prepararea medicamentelor de control și de testat
- (a) Prepararea de diluții în serie 1:3 (35B, A-D) pe placa cu 100% DMSO.
- (1) Se pun 60 μ l de DMSO în toate cavitățile coloanelor 2-12, rândurile A-E.
- (2) Se pun 70 μ l de 35 B [10 mM] în 100% DMSO în cavitatea A1:
- (3) Se pun 70 μ l de A [10 mM] în 100% DMSO în cavitatea B1.
- 695 (4) Se pun 70 μ l de B [10 mM] în 100% DMSO în cavitatea C1.
- (5) Se pun 70 μ l de C [10 mM] în 100% DMSO în cavitatea D1.
- (6) Se pun 70 μ l de D [10 mM] în 100% DMSO în cavitatea E1.
- (7) Se diluează în serie 1:3 (35B, A-D), descendent, prin coloana 12 prin transferarea a 30 μ l din Coloana 1 în Coloana 2, apoi din Coloana 2 în Coloana 3, etc., descendent prin coloana 12.
- 700 Se schimbă pipetele înaintea fiecărei diluții.
- (b) Prepararea plăcii cu diluție 1:10 în mediul A:
- (1) În rândurile A-E ale oricărei plăci se face un rând pentru prima diluție 1:10 pentru a corespunde fiecărui rând al compusului cu 100% DMSO.
- 705 35B în rândul A pentru prima diluție 1:10
- A - în rândul B pentru prima diluție 1:10
- B - în rândul C pentru prima diluție 1:10
- b - în rândul D pentru prima diluție 1:10
- D - în rândul E pentru prima diluție 1:10.
- 710 (2) Se pun 180 μ l de mediu A în toate cavitățile din rândurile A-E, care corespund rândurilor cu 100% DMSO. Sunt necesari 2,5 ml per rând.
- (3) Se îndepărtează 20 μ l din toate cavitățile fiecărui rând al rândurilor cu 100% DMSO și se transferă în rândul corespunzător 1:10.
- c. Prepararea plăcii cu diluție 1:100 în mediile A:
- 715 (1) Se prepară o placă pentru fiecare 3 compuși ce urmează a fi testați.
- (2) Se pun 225 μ l din mediul A în toate cavitățile rândurilor A, B, D, E, G și H, lăsând rândurile C și F libere. Se folosesc 20 ml din mediile A pe placă.
- (3) Se transferă 25 μ l din fiecare compus din rândul cu diluția 1:10, în cele două rânduri corespunzătoare pe placa cu diluția 1:100 schimbând pipetele înaintea fiecărui transfer.

RO 119363 B1

| Nr.Coloanei | Concentrația Medicamentului [nM] | Concentrația Medicamentului [microlitri] |
|-------------|----------------------------------|--|
| 1 | 25000 | 25,00000 |
| 2 | 8333 | 8,33333 |
| 3 | 2778 | 2,77778 |
| 4 | 926 | 0,92593 |
| 5 | 309 | 0,30864 |
| 6 | 103 | 0,10288 |
| 7 | 34 | 0,03429 |
| 8 | 11 | 0,01143 |
| 9 | 3,81 | 0,00381 |
| 10 | 1,27 | 0,00127 |
| 11 | 0,42 | 0,00042 |
| 12 | 0,14 | 0,00014 |

3. *Adăugarea de SK 123 viral pe plăci*
- Se topește Sn 123 pe baie de apă la 37°C, timp de aproximativ 10 min.
 - Se diluează Sn 125 1:16 prin adăugarea 1 ml de Sn 123 în 15 ml mediu A.
 - Se adaugă 50 μ l de Sn 123 [1:16] în cavitățile E1-H12 ale plăcilor 2-6 și în adânciturile E1-H3 ale plăcii 1.

4. *Adăugarea medicamentelor pe plăci*
- Se adaugă 50 μ l din medicamentele controlate și testate din rândurile plăcilor cu diluție 1:10 în rândurile corespunzătoare ale plăcilor finale (schimbând pipetele înaintea fiecărui transfer).

Un rând pe placa cu diluție 1:100 vor deveni 4 rânduri în placa finală. Se lasă A1 goală.

- Se incubează toate plăcile timp de 7 zile la 37°C în 5% CO₂.
- Se realizează protocolul Xtt în ziua a 7-a după cum urmează:
- Prepararea soluției Xtt/PMS: (4 plăci = 20 ml)
(6 plăci = 30 ml)

(1) Rețeta pentru 2 mM PMS:

15,3 mg PMS + 0,5 ml PBS = PMS de [100 mM]

100 μ l [100 mM] PMS + 4,9 ml PBS = PMS de [2 mM]

(2) Se încălzesc 500 ml H₂O la microunde timp de 5 min pe maximum de putere

(3) Se pun 20 sau 30 ml fenol roșu RPMI într-un tub centrifugal de 50 ml.

(4) Se pune RPMI la paharul de laborator cu apă fierbinte.

(5) Se adaugă 20 sau 30 mg XTT la RPMI fierbinte. Concentrația finală de XTT = [1 mg/ml].

(6) Se așteaptă ca XTT să se dizolve, apoi se adaugă 200 μ l de [2 mM] PMS în 10 ml soluție de XTT.

e. *Adăugarea de Xtt/PMS pe placă:*

(1) Se adaugă 50 μ l soluție de XTT/PMS în toate cavitățile tuturor plăcilor.

(2) Se acoperă plăcile și se incubează 4 h la 37°C în 5% CO₂.

RO 119363 B1

(3) Se îndepărtează plăcile din incubator și se înlocuiesc capacele cu închideri etanșe din plastic.

765 (4) Se amestecă conținuturile plăcilor

(5) Se citesc plăcile la lungimea de undă a testului, 450 mM și la lungimea de undă de referință, 650 mM.

III. Testul de fluorescență al inhibitorului proteazei HIV-1 pentru a analiza inhibarea proteazei HIV (Rezultatele înregistrate în Tabelul 1 sunt denumite "Pandex (ng/ml)")

770 Așa cum s-au utilizat aici, abrevierile sunt definite după cum urmează:

BSA - albumină serică de bovină

BOC - *t*-butoxicarbonil;

BrZ - 2-brombenziloxicarbonil;

2-ClZ- 2-clorbenziloxicarbonil;

775 DCC - dicitlohexilcarbodiimidă;

DIEA - diizopropiletilamină;

DTT - ditiotreitol;

EDTA - acid etilen-diamintetraacetic;

FITC - fluorescein izotiocarbamil;

780 HEPES - acid 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etansulfonic;

MES - acid 4-morfolinetansulfonic;

PAM - fenilacetimidometil;

TAPS - acid 3-[tri(hidroximetil)metil]amino-1-sulfonic;

TRIS-tri(hidroximetil)aminometan;

785 TOS-*p*-toluensulfonil (tosil).

A. Prepararea proteazei și a fracțiilor Gag

1. Cultura de *E.coli* K12 L507/pH P10D

Liofilizatele de *E.coli* K12 L 507/pH P10 D se obțin la Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois 61604, sub numărul de acces NRRL B-18560 (depus la 14 noiembrie 1989). Liofilizatele se decantează în tuburi care conțin 10 ml mediu LB (10 g Bacto-triptonă, 5 g extract Bacto drojdie și 10 g soluție apoasă de clorură de sodiu pe litru; pH-ul se aduce la 7,5 și se incubează peste noapte la 32°C).

O porțiune mică din cultura de peste noapte se introduce pe plăci cu LB-agar (mediu LB cu 15 g/L Bacto-agar) care conțin 12,5 μg/ml tetraciclină de așa manieră, încât să se obțină un singur izolat a coloniei de *E.coli* K12 L 507/pHP10D. Colonia unică obținută se inoculează în 10 ml mediu LB conținând 12,5 μg /ml tetraciclină și se incubează peste noapte la 32°C cu agitare puternică. Cei 10 ml de cultură de peste noapte se inoculează într-un mediu LB conținând 12,5 μg/ ml tetraciclină și se incubează la 32°C cu agitare puternică până când cultura ajunge în fază semilogaritmică.

2. Cultura de *E.coli* K 12 L507 /pH GAG

Liofilizatele de *E.coli* K 12 L 507/pH GAG se obțin la NBRL sub numărul de acces NRRL B-18561 (depus la 14 noiembrie 1989). O colonie purificată de *E.coli* K 12 L 507/pH GAG se izolează și se folosește ca un inocul pentru o cultură care a crescut până la faza semilogaritmică în conformitate cu teoria Etapei A, de mai sus, pentru *E.coli* K 12 L 507/pH P 10 D.

3. Prepararea fracției de protează

O cultură de *E.coli* K12 L 507 /pH P10 D este crescută până la faza semilogaritmică la 32°C în mediu LB conținând 12,5 μg/ ml tetraciclină. Temperatura de cultivare se ridică rapid la 40°C, pentru a indica expresia genei și celulele se lasă să crească timp de 2,5 h la această temperatură înainte ca cultura să se răcească rapid cu gheață. Celulele se centrifugează și peletul de celule se resuspendă în 20 ml soluție tampon de 50 mmoli MBS

810

RO 119363 B1

- (pH = 6) conținând 1 mmol EDTA, 1 mmol DTT, 1 mmol PMSF și 10% glicerină. (Soluție tampon A). Celulele se lizează prin sonicare folosind un Dismembrator Fischer Model 300 și o probă de tip micro. Urmare a centrifugării la 27.000 xg, supernatantul se diluează până la un volum total de 60 ml cu soluție tampon A și se încarcă într-o coloană cu QAE-Sefaroză cu 2 x 19 cm (1 ml/min, 4°C), care a fost echilibrată cu soluția tampon A. Coloana se spală în mod izocratic, timp de 180 min și apoi se eluează cu un gradient de eluent de soluție apoasă 0-1 M clorură de sodiu în soluție tampon A timp de 120 min. Activitatea enzimatică s-a măsurat prin HPLC folosind peptida sintetică Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val, după cum se descrie de Margolin et al, în Biochem. Biophys. Res. Commun. 167, 554-560 (1990); este măsurată producția peptidei p1 (Ser-Gln-Asn-Tyr). 815
- Fracțiile active se combină, se ajustează la pH = 1,2 M în sulfat de amoniu și se aplică pe o coloană cu hexil agaroză de 2 x 18 cm, care este adusă la echilibru cu soluția tampon A conținând sulfat de amoniu 1,2 M. Proba se încarcă la o viteză de curgere de 1 ml/min, la 4°C, se spală cu soluție tampon pentru a echilibra compoziția timp de 240 min (1 ml/min) și apoi se eluează folosind un gradient liniar reversibil de sulfat de amoniu 1,2-0M în soluție tampon A, timp de 120 min la aceeași viteză de curgere. Coloana se spală apoi în mod izocratic cu soluție tampon A timp de 120 min. 820
- Fracțiile active se combină, se concentrează până la 10 ml, folosind o celulă agitată Amicon, cu o membrană YM-10 și apoi se trece într-o coloană schimbătoare de cationi MonoS (1 x 10 cm) care este adusă la echilibru în soluție tampon A. Proba se încarcă cu o viteză de curgere de 1 ml/min, la 25°C. După spălarea izocratică, timp de 30 min, proteaza se eluează, folosind un gradient liniar de soluție apoasă 0-0,45 M clorură de sodiu în soluție tampon A, timp de 40 min. Coloana se spală izocratic cu soluție tampon A, conținând soluție apoasă 0,45 M de clorură de sodiu, timp de 30 min. 830
- Fracțiile active se combină și se concentrează la 200 μl, folosind o celulă agitată Amicon și o membrană YM-10 și apoi proteaza se trece într-o coloană - Superose 6 de excluziune, adusă la echilibru, cu soluție tampon conținând soluția apoasă 0,1 M clorură de sodiu. Coloana se spală izocratic în această soluție tampon la o viteză de curgere de 0,5 ml/min, în care proteaza HIV se eluează ca un singur maxim. 835
- QAE - Sefaroză și hexil agaroză se achiziționează de la Sigma Chemical Company. Superose 6 și MonoS se achiziționează de la pHarmacia. Soluțiile tampon și reactivii se obțin de la Sigma. 4. 840
- 4. Prepararea fracției gag**
- Într-o manieră analoagă, o cultură de *E. coli* K 12507 /pH GAG crește până la faza semilogaritmică la 32°C, apoi se ridică temperatura la 40°C pentru circa 4...5 h. Cultura se răcește cu gheață și se centrifughează, apoi peletul se resuspeadă în 8 ml soluție tampon de lizare conținând 5 mg/ml lizozimă. Soluția tampon de lizare cuprinde 50 mM Tri-HCl (pH = 7,8), 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 1 μg/ml E 64 și 2 μg/ml Aprotinină. Cultura se incubează circa 30... 60 min, la 4°C, apoi se supune sonicizării, în timp scurt, într-un Branson Cell Disrupter la putere 60% pentru trei explozii a câte 20 s, cu răcire între fiecare explozie. Cultura se centrifughează apoi la 15000 xg. Supernatantul care conține proteina gag neprelucrată se purifică parțial prin cromatografie de excluziune pe o coloană Sefadex G-50 și se păstrează la - 20°C în 50% glicerina și soluție tampon de lizare. 845
- B. prepararea substratului: n^a-biotin-gly-ser-gln-asn-tyr-pro- ile-val-gly-lys (n^e-fitc)-oh (a=alfa, e= epsilon).** 855
- Prepararea peptidei biotilate la capătul amino**
- Peptida-rășină protejată N^a-Boc-Gly-Ser-Gln-Asn-Tyr-(BrZ)-Pro-Ile-Val-Gly-Lys (2-ClZ)-OCH₂-PAM se sintetizează pe un aparat de sinteză a peptidei de tip Advanced Chemitech Model 200 la scala de 1,5 mmoli, folosind protocolul standard al cuplului dublu. 860

RO 119363 B1

Gruparea t-Boc cu capătul amino se îndepărtează cu 50% acid trifluoracetic în clorură de metilen și rășina rezultată se neutralizează cu 5% diizopropiletilamina (DIEA) în clorură de metilen. Apoi se adaugă 1,1 g (4,5 mmoli) biotină în 20 ml dimetilsulfoxid la rășina peptidei, urmată de 4,5 mmoli de diciohexilcarbodiimidă (DCC) în 9 ml clorură de metilen. Amestecul de reacție care rezultă se diluează până la un volum total de 40 ml folosind 11 ml clorură de metilen și apoi se lasă să reacționeze timp de aproximativ 5 h. Soluția de reacție se concentrează, rășina se spală succesiv cu dimetilsulfoxid, dimetilformamidă și clorură de metilen și apoi se neutralizează cu 5% DIEA în clorură de metilen. Această reacție se repetă de două ori, cu precizarea ca, timpul de reacție să fie de maxim până la 12 h per reacție. Analiza cu ninhidrină a rășinei indică reacția completă a biotinei cu gruparea aminică de la glicină. Rășina peptidei finale se spală intens cu dimetilformamidă și clorură de metilen și se usucă pentru a obține 4,3 g cu randament 98%.

2. Deprotejarea

Peptida se deprotejează și se îndepărtează din rășină, folosind 50 ml soluție de acid fluorhidric /*m*-crezol, la 0°C, timp de o oră. După îndepărtarea acidului fluorhidric prin distilare în vid, *m*-crezolul se extrage din amestecul de reacție folosind 100 ml dietileter. Peptida se solubilizează apoi în 50% acid acetic apos, se îngheață și se liofilizează pentru a obține 2,14 g.

3. Purificarea

Peptida brută, biotinitată la gruparea aminică terminală, se dizolvă în 200 ml soluție de acetonitril 5% în apă conținând 0,1% acid trifluoracetic și apoi se filtrează printr-un filtru cu 0,22 μ. Soluția care rezultă se trece într-o coloană cu fază reversibilă, de 2,2 x 25 cm cu octadecil-silice (Vydac C-18) care a fost adusă la echilibru cu aceeași soluție tampon. Peptida se eluează folosind un gradient liniar de 855 min, cu 7,5-25% acetonitril, la 2 ml/min, cu colectarea fracțiilor. Aceste fracții se izolează folosind HPLC analitică care se realizează pe o coloană Vydac C-18 de 4,6 x 250 mm, utilizând aceleași condiții tampon. Frațiile conținând materialul dorit se combină, se congelează și se liofilizează pentru a obține 1,206 g cu randament 62%.

Analiza aminoacidului peptidei biotinite izolate conduce la următoarele rapoarte în concordanță cu teoria: Asn 1,1; Ser 0,96; Gln 1,1; Pro 1,1; Gly 2,1; Val 0,8; Ile 0,78; Tyr 1,1; Lys 1,1, spectrometria de masă cu bombardament rapid de atom conduce la un maximum al masei moleculare a ionului, de 1288, conform cu teoria.

4. Marcarea

Peptida biotinitată purificată se marchează apoi cu un marker fluorescent la capătul C-terminal pentru utilizare în testul Pandex. Mai întâi, peptida biotinitată (1,206 g, 0,936 mmoli) se dizolvă în 100 ml borat de sodiu 0,1 M, pH = 9,5. Apoi, o soluție de 3 g (7,7 mmoli) izotiocianat de fluoresceină în 15 ml dimetilsulfoxid se adaugă la amestecul de reacție în 10 porții egale, timp de 2 h. Amestecul care rezultă se lasă să reacționeze timp de o oră după adiția finală. Soluția se ajustează la pH=3 folosind acid clorhidric 5N, rezultând formarea unui precipitat care se îndepărtează prin centrifugare.

Soluția peptidică se ajustează apoi la pH = 7,8 folosind hidrura de sodiu 5N și apoi se diluează până la 200 ml prin adăugare de acetat de amoniu 0,1 M, pH=7,5. Soluția care rezultă se filtrează apoi printr-un filtru de 0,22 μ și se încarcă într-o coloană Vydac C-18 de 2,2 x 25 cm, care a fost adusă la echilibru cu acetonitril 5% în acetat de amoniu 0,1 M (pH = 7,5). Peptida se eluează din coloană folosind un gradient liniar de 855 min cu 5 - 25% acetonitril, la 2 ml/min, cu colectarea fracțiilor. Se folosește HPLC analitică, pentru analiza fracțiilor. Frațiile conținând produsul dorit se combină apoi, se congelează și se liofilizează pentru a obține 190,2 mg (randament 12%).

RO 119363 B1

Analiza aminoacidului peptidei purificate conduce la obținerea următoarelor rapoarte, în concordanță cu teoria: Asn 1,1; Ser 1; Gln 1,1; Pro 1,1; Gly 2,1; Val 0,8; Ile 0,8; Tyr 1,1; Lys 1. Spectrometria de masă cu bombardament rapid de atomi conduce la un maxim al masei moleculare a ionului de 1678, conform cu teoria. 910

5. Analiza fluorescenței inhibitorului proteazei hiv-1

Următoarele soluții tampon și soluții sunt folosite în analiza fluorescenței inhibitorului proteazei HTV-1. 915

| | | |
|-------------------------|---------------------------------------|-----|
| Soluție tampon MES-ALB: | etan-4-morfolin, acid sulfonic pH 5,5 | |
| | NaCl 0,02 M | |
| | EDTA 0,002 M | |
| | DTT 0,001 M | |
| | 1,0 mg/ml BSA | 920 |
| Soluție tampon TBSA: | TRIS 0,02 M | |
| | NaCl 0,15 M | |
| | 1 mg/ml BSA | |

| | | |
|---------------------------------------|---|-----|
| Soluție de perle acoperite cu avidină | Soluție 0,1% de particule de fluoricon acoperite cu avidină pentru testare (avidină conjugată cu perle solide de polistiren, 0,6-0,8 microni în diametru în soluție tampon TBSA | 925 |
| | - soluție de enzimă: | |
| | 27 IU/ml de protează HIV-1 purificată în soluție tampon MES-ALB (1 IU egal cu cantitatea de enzimă necesară pentru a hidroliza 1 micromol de substrat per minut la 37°C. | 930 |

În fiecare cavitate a unei plăcii cu 96 cavități cu fund rotund se adaugă 20 μ l de soluție de enzimă urmată de 10 μ l de compus care urmează să fie evaluat într-o soluție apoasă 20% de dimetilsulfoxid. Proteaza HIV-1 purificată se obține după cum s-a descris mai sus. Soluția rezultată se incubează timp de o oră, la temperatura camerei și apoi se adaugă în fiecare cavitate 20 μ l dintr-o soluție conținând substratul preparat mai sus, în soluție tampon MBS-ALB (1,5 μ l/ml). Soluțiile se incubează apoi timp de 16 h, la temperatura camerei și apoi fiecare cavitate se diluează cu 150 μ l soluție tampon MBS-ALB. 935

În fiecare cavitate a unei a doua plăci Pandex cu 96 cavități cu fund rotund se adaugă 25 μ l de soluție de perle acoperite cu avidină. 940

Apoi, în fiecare cavitate se adaugă 25 μ l soluții incubate diluate, preparate mai sus. Soluțiile se amestecă energic și plăcile se încarcă pe o mașină Pandex, se spală, se evacuează și se citesc. Detecția probei se realizează prin excitație la 485 nm, citind epifluorescența rezultată la 535 nm. 945

Rezultatele IC₅₀ obținute în analiza fluorescenței pentru compușii prezentei invenții sunt prezentate mai jos, în Tabelele 1 și 2. Toate valorile au fost raportate la un control pozitiv care este [1S-(1R*,4R*,5S*)]-N-(1-(2-amino-2-oxoetil)-2-oxo-3-aza-4-fenilmetil-5-hidroxi-6-(2-(1-t-butilamino-1-oxometil)fenil)hexil)-2-chinolinil carboxamidă.

Rezultatele activității pentru compușii reprezentativi conținuți în prezenta invenție sunt prezentate în Tabelele 1 și 2, mai jos și în Exemplele precedente. Rezultatele în paranteze sunt pentru Exemplul 1 al Publicației Cererii de Brevet European 052600911 = 35 B în același test. 950

Tabelul 1

955 Rezultatele în paranteze sunt pentru Exemplul 1 al Publicației Cererii de Brevet European
052600911= 35 B

| Exemplul | Celulă integrală IC ₅₀ nM | Celulă integrală IC ₉₀ nM | SRI CEM ng/ml | SRI MT2 ng/ml | Pandex ng/ml |
|----------|---|---|------------------|------------------|---------------------------------------|
| 1 | 2,39 (9,93) | 19,0 (53,5) | 8,62 | 6,27 | 0,2 ^c 0,16 ^d |

960

c) 35B 9,3 ng/ml; d) 35B 0,63 ng/ml

| Exemplul | Celulă integrală IC ₅₀ nM | Celulă integrală IC ₉₀ nM | SRI CEM ng/ml | SRI MT2 ng/ml | Pandex ng/ml |
|----------|---|---|------------------|------------------|---------------------------------------|
| 1 | 2,39 (9,93) | 19,0 (53,5) | 8,62 | 6,27 | 0,2 ^c 0,16 ^d |

965

b) 35B 2,7 ng/ml; d) 35B 0,63 ng/ml

| Exemplul | Celulă integrală IC ₅₀ nM | Celulă integrală IC ₉₀ nM | SRI CEM ng/ml | SRI MT2 ng/ml | Pandex ng/ml |
|----------------------|---|---|------------------|------------------|------------------|
| Referință Exemplu | | | 1000 1380 | 1310 1500 | 462 ^d |

970

d) 35B 0,48 ng/ml

Tabelul 2

975

Exemplul 2

IC₅₀ = 14,5 nM (Celulă integrală)

IC₉₀ = 56,1 nM (Celulă integrală)

| Activitatea de inhibare | |
|-------------------------|-----------------------|
| Exemplu nr. | Analiza fluorescenței |
| Control | 1,0 |
| 1 | 0,25 |
| Referință | 962 |

980

Se dau, în continuare, preparări și exemple de realizare a invenției.

985

Abrevierile pentru termenii: punct de topire, spectru de rezonanță magnetică nucleară, spectru de masă cu impact de electroni, spectru de masă cu desorbție în câmp, spectru de masă cu bombardament rapid de atomi, spectru infraroșu, spectru ultraviolet, analiza elementară, cromatografia lichidă de înaltă performanță și croma-tografie în strat subțire sunt după cum urmează: p.t., RMN, MSIE, MS (FD), MS (FAB), IR, UV, Analiza, HPLC și TLC. Suplimentar, maximele de absorbție listate pentru spectrul IR sunt acelea de interes, nu toate maximele observate.

990

În legătură cu spectrul RMN se folosesc următoarele abrevieri: singlet (s), dublet (d), dublet de dubleți (dd), triplet (t), cuartet (q), multiplet (m) dublet de multipleți (dm), singlet larg (br.s), dublet larg (br.s), triplet larg (br.t), și multiplet larg (br.m). J indică constanta de cuplare în Hertz (Hz). În cazul în care nu sunt altfel notate, datele RMN se referă la baza liberă a compusului în cauză.

995

RO 119363 B1

Spectrele RMN sunt obținute pe un instrument Bruker Corp. 270 MHz sau pe un instrument General Electric QE-300 300 MHz. Deplasările chimice sunt exprimate în valori delta (ppm față de tetrametilsilan). Spectrul MS(FD) a fost realizat un spectrometru de tip Varin-MAT 731 utilizând emițători dendritici de carbon. Spectrul MSIE a fost obținut pe un instrument CEC-21-110 de la Consolidated Electrokinetics Corporation. Spectrul MS (FAB) a fost obținut pe un Spectrometru de tip VG ZAB-3. Spectrul UV a fost obținut cu un instrument Perkib-Elmer 281. Spectrul UV a fost obținut pe un instrument de tip Cary 118. TLC-ul s-a desfășurat pe placi de silicagel de tip E. Merck. Punctele de topire sunt fără corecție

1000

Preparația de referință

1005

A. Acid 2R-N(Benziloxicarbonil)amino-3-naft-2-iltio-propanoic

La o soluție de 1,28 g (8,00 mmoli) de naftalen-2-tiol în 30 ml de tetrahidrofuran se adăunează încet 1,77 (8,16 g) de 60% hidruură de sodiu, sub hidrogen. După agitare timp de aproximativ 15 min, se adăunează lent o soluție de N(benziloxicarbonil)serină-β-lactonă în 20 ml tetrahidrofuran. Amestecul de reacție este lăsat să reacționeze la temperatura camerei, timp de aproximativ o oră după care se concentrează sub presiune scăzută pentru a se obține un reziduu. Acest reziduu este dizolvat în acetat de etil și spălat secvențial cu 0,5 N bisulfat de sodiu și a soluție saturată de saramură. Straturile rezultante sunt separate, iar stratul organic este uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și apoi concentrat sub presiune redusă pentru a se obține un reziduu. Acest reziduu este purificat utilizând cromatografie rapidă pentru a se obține 2,08 g de solid galben pal.

1010

1015

Randament: 68%

RMN H^1 ($CDCl_3$): δ 3,42-3,61 (br.m, 2H), 5,53-5,76 (br.s, 1H), 4,85-5,08 (br.m, 2H), 5,54-5,76 (br.s, 1H), 7,06-7,97 (m, 12H).

$[\alpha]_D^{25}$ -55,72° (c 1,0, MeOH).

1020

IR (KBr): 3348, 3048, 1746, 1715, 1674, 1560, 1550, 1209, 1200, 1060 cm^{-1} .

MS(FD): m/e 381 (M^+), 381 (100).

Analiza pentru $C_{20}H_{19}NO_4S$:

Calculat: C, 66,12; H, 5,02; N, 5,67;

Găsit: C, 66,22; H, 5,04; N 3,86.

1025

B. 3R-1-Diazo-2-oxo-3-N-(benziloxicarbonil)amino-4-(naft-2-iltio) butan

La o soluție rece (-30°C) de 15,38 g (40,3 mmoli) din compusul din Preparația 2A în 230 ml de acetat de etil, se adăunează lent 5,62 ml (40,3 mmoli) de trietilamină, sub azot cu seringă. La soluția rezultantă se adăunează cu o seringă 7,84 ml (60,5 mmoli) de cloroformiat de izobutil. Într-un balon separat se adăunează atent 10 g de N-(metil)-N(nitro)-N(nitrozo)-guanidină la un amestec dublu stratificat de 170 ml de dietileter și 170 ml dintr-o soluție de 5N hidroxid de sodiu rezultând o degajare intensă de gaz. În momentul în care această reacție este completă, stratul organic este decantat de stratul apos pe hidroxid de potasiu și uscat. Această formare de diazometan și adăunare de diazometan este repetată utilizând cantități identice de dietileter și hidroxid de sodiu și 30 g de N(metil)-N(nitro)-N(nitrozo)-guanidină.

1030

1035

Diazometanul reactant rezultat este apoi adăunat la soluția de anhidridă mixtă preparată ca mai înainte, iar amestecul este lăsat să reacționeze la rece (-30°C), timp de aproximativ 20 min. După ce reacția este în mod substanțial completă, conform indicațiilor TLC, se barbotează azot în soluție utilizând o pipetă tip Pasteur finisată la foc pentru a elimina orice exces de diazometan, după care soluția este concentrată sub presiune scăzută pentru a rezulta un reziduu. Reziduu este purificat utilizând cromatografie rapidă (eluent de 10% acetat de etil în clorură de metilen). Randament: 83 %.

1040

RMN H^1 ($CDCl_3$): δ 3,32-3,46 (m, 2H), 4,40-4,67 (m, 1H), 5,00-5,09 (m, 2H), 5,44 (s, 1H), 5,76 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,25-7,86 (m, 12 H).

1045

RO 119363 B1

C. 3R-1-Clor-2-oxo-3N-(benziloxicarbonil)amino-4-(naft-2-iltio)butan

1050 O scurtă admisie (aproape 2 s) de acid clorhidric anhidru este trecută printr-o soluție rece (-20°C) de 13,62 g (33,59 mmoli) de compus din Preparația 2B în 230 ml de dietileter, rezultând într-o degajare de gaz. Această procedură este repetată, având grijă să nu se adăuneze acidul clorhidric în exces. Atunci când reacția este completă în mod substanțial, conform indicațiilor TLC, soluția este concentrată sub presiune redusă pentru a se obține un reziduu. Acest reziduu este purificat utilizând cromatografie rapidă (eluent de 10% acetat de etil în clorură de metilen) pentru a se obține 12,05 g de solid de culoare cafeniu-roșcat pal.

1055 Randament: 87 %.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,41 (dd, $J=12,6$ Hz, 1H), 3,53 (dd, $J=12,6$ Hz, 1H), 4,18 (AB q, $J=41,9$ Hz, $J = 15,9$ Hz, 2H), 4,77 (dd, $J=9$, 3 Hz, 1H), 5,04 (AB q, $J=12$ Hz, $J=10,4$ Hz, 2H), 5,59 (d, $J=7$ Hz, 1H), 7,24-7,85 (m, 12 H).

$[\alpha]_D - 80,00^\circ$ (c 1,0, MeOH).

1060 IR (CHCl_3): 3426, 3031, 3012, 1717, 1502, 1340, 1230, 1228, 1045 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 413 (M^+), 413 (100).

Analiza pentru $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{Cl}$:

Calculat: C, 63,84; H, 4,87; N, 3,38;

Găsit: C, 64,12; H, 4,95; N, 3,54.

1065 D. [3R-(3R*,4S*)]-1-Clor-2-hidroxi-3-N-(benziloxicarbonil)amino-4-(naft-2-iltio)butan

La o soluție rece (0°C) de 530 mg (1,28 mmoli) de compus din Preparația 2C, în 10 ml de tetrahidrofuran și 1 ml de apă se adăunează 73 mg (1,92 mmoli) de borohidru de sodiu. Când reacția este în mod substanțial completă, după cum indică TLC-ul, soluția este corectată la pH 3 utilizând 10 ml de soluție apoasă saturată de clorură de amoniu și 500 μl dintr-o soluție de acid clorhidric 5N. Soluția rezultantă este extrasă de două ori cu clorură de metilen, iar straturile organice reunite sunt spălate cu apă, uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și apoi concentrate sub presiune redusă pentru a se obține un reziduu. Reziduu este purificat utilizând cromatografie radială (eluent de clorură de metilen) pentru a se obține 212 mg dintr-un solid cafeniu-roșcat. Randament: 40 %.

1070

1075 RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,40 (s, 2H), 3,61-3,71 (m, 2H), 3,97 -3,99 (m, 2H), 4,99 (s, 2H), 5,16 (br.s, 1H), 7,21-7,83 (complex, 12H).

MS (FD): m/e 415 (M^+), 415 (100).

$[\alpha]_D - 47,67^\circ$ (c 0,86, MeOH).

IR (CHCl_3): 3630, 3412, 3011, 1720, 1502, 1236, 1044 cm^{-1} .

1080 Analiza pentru $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_3\text{ClS}$:

Calculat: C, 63,53; H, 5,33; N, 3,37;

Găsit: C, 63,72; H, 5,60; N, 3,64.

E. [1'R-(1'R*,1S*)]-1-[(1'-N-(Benziloxicarbonil)amino-2'-(naft-2-iltio)etil]oxiran

1085 O soluție de 31 mg (0,55 mmoli) de hidroxid de potasiu în 1 ml de etanol se adăunează la o soluție de 190 mg (0,46 mmoli) de compus din Preparația 2D, în 6 ml dintr-o soluție 1:2 etanol/ acetat de etil. Când reacția este în mod substanțial completă, conform indicațiilor TLC, amestecul de reacție este turnat într-un amestec de apă/clorură de metilen. Straturile rezultante sunt separate, iar stratul organic este spălat cu apă, uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și apoi concentrat sub presiune redusă pentru a se obține un reziduu. Reziduu este purificat utilizând cromatografie radială (eluent de 10% acetat de etil în clorură de metilen) pentru a se obține 172 mg dintr-un solid cafeniu-roșcat deschis.

1090

Randament: 99%.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,76 (br.s, 2H), 3,01 (br.s, 1H), 3,31 (d, $J=5$ Hz, 2H), 3,77 (br, s, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,22 (d, $J=6$ Hz, 1H), 7,25-7,85 (complex, 12H).

1095 $[\alpha]_D - 125,42^\circ$ (c 0,59, MeOH).

RO 119363 B1

MS (ED): m/e 379 (M⁺), 379 (100).

IR (CHCl₃): 3640, 3022, 2976, 1720, 1502, 1235, 1045 cm⁻¹.

Analiza pentru C₂₂H₂₁NO₃S:

Calculat: C, 69,63; H, 5,58; N, 3,69;

Găsit: C, 69,41; H, 5,53; N, 3,64.

F. [2S-(2R,2'R*,3'S*)]-1-[2'-Hidroxi-3'-(N-benziloxicarbonil)amino-4'-(naft-2-iltio)butil] piperidin-2-N-(t-butil)carboxamidă*

1100

O soluție de 0,51 g (1,34 mmoli) de compus din Preparația 2E și 0,26 g (1,41 mmoli) de compus din Preparația 4C în 25 ml de izopropanol se încălzește la 55°C timp de aproximativ 48 h. Amestecul de reacție rezultat este răcit și apoi concentrat sub presiune redusă pentru a se obține un material brut. Acest material este purificat utilizând cromatografie radială (placă de 4 mm; eluent 10% acetonă în clorură de metilen) pentru a se obține 104 mg dintr-o spumă albă.

1105

Randament: 14%.

RMN H¹ (CDCl₃): δ 1,29 (s, 9H), 1,44 - 1,82 (m, 6 H), 2,19 (m, 1H), 2,40 (m, 1H), 2,68 (m, 2H), 3,09 (m, 1H), 3,46 (m, 2H), 4,00 (m, 2 H), 5,01 (s, 2H), 5,73 (d, 1H), 6,01 (br.s, 1H), 7,23-7,34 (m, 5H), 7,45 (m, 3H), 7,72 -7,83 (m, 4H).

1110

MS(FD): m/e 563 (M⁺, 100).

G. [2S-(2R,2'S*,3'S*)]-1-[2'-Hidroxi-3'-amino-4'-(naft-2-iltio)butil]piperidin-2-N-(t-butil) carboxamidă*

1115

O soluție conținând 1,05 g (0,18 mmoli) de compus din Preparația 2F în 20 ml de acid bromhidric 30% în acid acetic reacționat timp de aproximativ o oră. Amestecul de reacție rezultat este concentrat, extras azeotropic de trei ori cu toluen, redizolvat în metanol conținând 4,5 ml de dietilamină și hidroxid de amoniu și apoi concentrat sub presiune redusă pentru a se obține reziduu. Reziduu este purificat utilizând cromatografie radială (placă de 1 mm) eluent de 3% metanol în clorură de metilen conținând 1% acid acetic) pentru a se obține o spumă albă.

1120

Randament: 80 %.

RMN H¹ (CDCl₃): δ 1,29 (s, 9H), 1,52-1,73 (m, 6H), 1,84 (m, 1H), 2,31-2,43 (m, 2H), 2,75-3,04 (m, 5 H), 3,17 (m, 1H), 3,4-1 (m, 1H), 3,71 (m, 1H), 6,22 (br, s, 1H), 7,47 (m, 3H), 7,73 - 7,82 (m, 4H).

1125

MS (FD): m/e 430 (M⁺, 100).

Preparația 1

Acid 2R-2-N(Benziloxicarbonil)amino-3-feniltio propanoic

Intermediarul dorit, din subtitlu, este preparat în mod substanțial în conformitate cu procedurile detaliate în Procedura de referință A utilizând 13,1 ml (127 mmoli) de tiofenol, 4,6 g (117 mmoli) dintr-o soluție de 60% hidrură de sodiu și 25,6 g (116 mmoli) de L-N (benziloxicarbonil)-serină-β-lactonă în 450 ml tetrahidrofuran pentru a se obține un reziduu. Acest reziduu este purificat utilizând cromatografie rapidă (gradient de eluent de 0-2% acid acetic într-un amestec 4:1 clorură de metilen/acetat de etil) pentru a se obține 27,9 g de solid alb.

1130

Randament: 72%.

RMN H¹ (CDCl₃): δ 7,55-7,18 (m, 10H), 5,55 (d, J=7 Hz, 1H), 5,08 (s, 2H), 4,73-4,60 (m, 1H), 3,55-3,30 (m, 2H).

1135

IR (KBr): 3304, 3035, 1687, 1532, 736 cm⁻¹.

MS (FD): m/e 332, 288, 271, 181.

1140

Analiza pentru C₁₇H₁₇NO₄S:

Calculat: C, 61,61; H, 5,17; N, 4,23;

Găsit: C, 61,69; H, 5,22; N, 4,47.

RO 119363 B1

B. 3S-1-Diazo-2-oxo-3-N-(benziloxicarbonil)amino-4-feniltio butan

1145 Compusul dorit din subtitlu este preparat în conformitate cu procedurile detaliate în Procedura de referință B, utilizând 12,1 g (37 mmoli) de compus din Preparația 1A, 5,09 ml (37 mmoli) de trietilamină, 7,13 ml (55 mmoli) clorformiat de izobutil, 146 mmoli de diazometan soluție pentru a se obține un reziduu. Soluția de diazometan este preparată utilizând 100 ml de dietileter, 150 ml de soluție de hidroxid de sodiu 5N și 21 g (146 mmoli) de N(metil)-N(nitro)-N(nitrozo)-guanidină conform, celor în Prepararea 2B. Acest reziduu este purificat utilizând cromatografie rapidă (gradient eluent de 0-5 % acetat de etil în clorură de metilen) pentru a se obține un ulei galben.

Randament: 73 %

1150 RMN H^1 ($CDCl_3$): δ 7,50 - 7,19 (m, 10 H), 5,62 (d, $J=7$ Hz, 1H), 5,47 (br.s, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,50 - 4,32 (m, 1H), 3,33 (d, $J=6$ Hz, 1H).

IR (KBr): 3012, 2115, 1720, 1501, 1367, 1228 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 356, 328, 242.

C. 3R-1-clor-2-oxo-3-N-(benziloxicarbonil)amino-4-feniltio butan

1160 Compusul dorit din subtitlul este preparat în conformitate cu procedura detaliată din Procedura de Referință C, utilizând 22,3 S (63 mmoli) de compus din subtitlul Preparației 1B și mici cantități de acid clorhidric gazos în 400 ml de dietileter pentru a se obține 21 g dintr-un solid alb. Acest solid este utilizat fără altă purificare.

1H RMN ($CDCl_3$): δ 7,50-7,15 (m, 10 H), 5,56 (dd, $J=2,6,7$ Hz, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,78 - 4,67 (m, 1H), 4,20 (d, $J=15,9$ Hz, 1H), 4,12 (d, $J=15,9$ Hz, 1H), 3,48 - 3,23 (m, 2H). IR (KBr):

1165 3349, 1732, 1684, 1515, 1266 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 363 (M^+).

Analiza pentru $C_{18}H_{18}NO_3Cl$:

Calculat: C, 59,42; H, 4,99; N, 3,85;

Găsit: C, 59,57; H, 5,09; N, 4,13.

1170 D. [2S-(2R*,3S*)]-1-Clor-2-hidroxi-3-N-(benziloxicarbonil)amino-4-feniltio butan

Compusul dorit din subtitlu este preparat în conformitate cu procedura detaliată din Procedura de Referință D, utilizând 21 g (58 mmoli) de compus din Preparația 1C și 2,4 g (63 mmoli) de borohidru de sodiu în 300 ml de tetrahidrofuran pentru a se obține un reziduu. Reziduu este purificat utilizând cromatografie rapidă (gradient eluent de 0-2 % metanol în clorură de metilen) urmată de cromatografie rapidă (gradient eluent de 0-2% acetat de etil în cloroform) și apoi recristalizat din clorură de metilen la $-78^\circ C$ pentru a se obține 8,3 g din compusul din subtitlu.

Randament: 39%.

1175 RMN H^1 ($CDCl_3$): δ 7,47-7,19 (m, 10H), 5,22-5,03 (m, 1H), 5,09,(s, 2H), 4,01-3,89 (m, 2H), 3,75-3,58 (m, 2H), 3,32 (d, $J=4$ Hz, 2H).

IR (KBr): 3321, 2951, 1688, 1542, 1246, 738 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 366 (M^+), 119.

Analiza pentru $C_{18}H_{20}NO_3Cl$:

Calculat: C, 59,09; H, 5,51; N, 3,83;

1185 Găsit: C, 59,03; H, 5,50; N, 3,96.

E. [1'R-(1'R*,1S*)]-1-[(1'-N-(benziloxicarbonil)amino-2'-feniltio)etil]oxiran

1190 Compusul dorit din subtitlu este preparat în conformitate cu procedura detaliată din Procedura de Referință E, utilizând 8,3 g (23 mmoli) de compus din subtitlul Preparației 1D, 1,4 g (25 mmoli) de hidroxid de potasiu în 400 ml de etanol pentru a se obține un reziduu. Reziduu este purificat utilizând cromatografie rapidă (gradient eluent de 0-2% acetat de etil în clorură de metilen) pentru a se obține 6,4 g de solid alb.

Randament: 85%.

RO 119363 B1

- RMN H¹ (CDCl₃): δ 7,45-7,15 (m, 10 H), 5,12 (s, 1H), 5,08 (s, 2H), 3,77-3,62 (m, 1H), 3,21 (d, J= 6 Hz, 2 H), 2,99 (m, 1H), 2,77 (m, 2 H).
IR (KBr): 3303, 3067, 1694, 1538, 1257, 741 cm⁻¹.
MS (FD) m/e 329. 1195
- Analiza pentru C₃₂H₄₅N₃O₄S:
Calculat: C, 65,63; H, 5,81; N, 4,25;
Găsit: C, 65,48; H, 5,82; N, 4,29.
- F. [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[3'-N-(benziloxicarbonil)amino-2'-hidroxi-4'-(fenil)tio]butil decahidroizochinolin-3-N-t-butyl-carboxamida* 1200
- Compusul dorit din subtitlu este preparat în concordanță cu procedura detaliată din Procedura de referință F utilizând 6,3 g (19 mmoli) de compus din subtitlul Preparației 1E, 5g, (21 mmoli) de [3S-(3R*,4aR*,8aR*)]-decahidroizochinolin-3-N-t-butylcarboxamida în 300 ml de etanol pentru a se obține un reziduu. Acest reziduu este purificat utilizând cromatografia rapidă (gradient eluent de 0-20% acetat de etil în clorură de metilen) pentru a se obține 4,3 g de solid alb. 1205
- Randament: 40%.
¹H RMN (CDCl₃): δ 7,41-7,11 (m, 10H), 5,90 (d, J=5 Hz, 1H), 5,64 (s, 1H), 5,05 (d, J=4 Hz, 2H), 4,08-3,90 (m, 2H), 3,40 (d, J=6, 2H), 3,05 (s, 1H), 2,95-2,85 (m, 1H), 2,62-2,45 (m, 2H), 2,28-2,15 (m, 2H), 2,05-1,88 (m, 2H), 1,78-1,10 (m, 7H), 1,29 (s, 9H). 1210
IR (KBr): 3330, 2925, 2862, 1706, 1661, 1520, 1454, 1246, 738, 694 cm⁻¹.
MS (FD): M/e 568 (M⁺), 467.
- Analiza pentru C₃₂H₄₅N₃O₄S:
Calculat: C, 67,69; H, 7,99; N, 7,40; 1215
Găsit: C, 67,64; H, 8,20; N, 7,45.
- G. [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[3'-amino-2'-hidroxi-4'-(fenil)tio]butil decahidroizochinolin-3-N-t-butyl carboxamida*
- Compusul dorit din subtitlu este preparat în conformitate cu procedura detaliată din Procedura de Referință G utilizând 1 g (1,8 mmoli) de compus din subtitlul Preparației 1F și 40 ml de soluție de acid bromhidric 30% în acid acetic cu excepția că materialul brut este dizolvat în 30 ml de metanol. La soluția rezultantă se adăunează 2 ml de dietilamină și 2 ml de hidroxid de amoniu concentrat și apoi amestecul este concentrat sub presiune scăzută pentru a se obține un reziduu. Acest reziduu este redizolvat în apă și acetat de etil. Straturile rezultante sunt separate și stratul organic este spălat secvențial cu o soluție apoasă de bicarbonat de sodiu și saramură, uscat peste sulfat de sodiu, filtrat și apoi redus la sec, sub presiune redusă, pentru a se obține un reziduu. Acest reziduu este purificat utilizând cromatografie rapidă (gradient eluent de 0-10% metanol în cloroform (conținând 3 picături de hidroxid de amoniu per 1000 ml de cloroform) pentru a se obține 0,54 g de spumă albă. 1220
- Randament: 71% separat. 1225
- RMN H¹ (CDCl₃): δ 7,41 - 7,16 (m, 5 H), 6,07 (s, 1H), 3,78-3,70 (m, 1H), 3,45 - 3,38 (m, 1H), 3,03-2,84 (m, 3H), 2,38-2,20 (m, 3H), 2,00-1,05 (m, 12H), 1,33 (s, 9H). 1230
IR (KBr): 2924, 2862, 1660, 1517, 1454, 1439, 737, 691 cm⁻¹.
MS (FD): m/e 434 (M⁺), 293.
- Preparația 2.* 1235
- A. 3-Metoxi-N-fenilbenzamidă*
- O soluție de 13,4 ml (147 mmoli) de anilină în 30,7 ml de trietilamină se adăunează lent la o soluție conținând 25,1 g (147 mmoli) de clorură de 3-metoxibenzoil în clorură de metilen. Amestecul de reacție rezultat este reacționat timp de aproximativ treizeci de min și apoi este diluat cu bicarbonat de sodiu 1N. Straturile rezultante sunt separate, iar stratul organic este spălat secvențial cu apă, hidroxid de sodiu 1M și apoi cu saramură, apoi este uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și apoi redus la sec sub presiune redusă pentru a se obține 31,6 g de solid albicios. 1240

B. 3-Metoxi-2-metil-N-fenilbenzamidă

1245 La o soluție rece (-70°C) de 4,54 g (20 mmoli) de compus din subtitlul Preparației 2A și 5,11 g (44 mmoli) de TMSDA în 70 ml de tetrahidrofuran anhidru se adăunează 26,9 ml dintr-o soluție 1,56 M de n-butil litu în hexan. Amestecul de reacție rezultat este încălzit la -15°C și agitat timp de aproximativ 45 min pentru a se obține o dispersie galbenă. Dispersia este răcită la -70°C și se adăunează 2,89 g (20 mmoli) de iodură de metil, rezultând la for-

1250 marea unui precipitat alb. Amestecul de reacție este agitat pe timpul nopții la temperatura camerei, stins brusc cu clorură de amoniu saturată și diluat cu dietileter. Straturile rezultante sunt separate, iar stratul organic este spălat secvențial cu clorură de amoniu saturată, apă, bicarbonat de sodiu saturat și soluții de saramură.

1255 Extractele organice sunt apoi uscate pe sulfat de sodiu și concentrate pentru a se obține un solid alb care este purificat prin cristalizare din 2:1 soluție de acetat de etil/hexan pentru a se obține 4,00 g de produs sub formă aciculară.

Randament: 99%.

RMN H^1 ($CDCl_3$): δ 2,36 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,89 (s, 1H), 6,90-7,70 (m, 8H).

1260 IR ($CHCl_3$): 3424, 3013, 2963, 2943, 2840, 1678, 1597, 1585, 1519, 1463, 1438, 1383, 1321, 1264, 1240, 1178, 1083, 1069 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 241 (M^+ , 100).

Analiza pentru $C_{15}H_{15}NO_2$:

Calculat: C, 74,67; H, 6,27; N, 5,80;

Găsit: C, 74,65; H, 6,29; N, 5,82.

1265 *C. Acid 3-Hidroxi-2-metilbenzoic*

Un amestec de 1,21 g (5,00 mmoli) de compus din subtitlul Preparației 2B, 35 ml de acid clorhidric 5N și 20 ml de soluție de acid bromhidric 30% în acid acetic sunt încălzii la reflux timp de 24 h. După răcire, amestecul de reacție este diluat cu 100 ml de acetat de etil și 100 ml de apă. Straturile rezultante sunt separate și stratul organic este spălat o dată cu apă și apoi bazificat la pH=11 utilizând hidroxid de sodiu 0,5 N. Straturile rezultate sunt separate și apoi stratul apos reacidulat la pH 1 utilizând acid clorhidric 5N. Compusul dorit este apoi extras din acest strat apos utilizând acetat de etil.

1270

Extractele sunt apoi spălate cu saramură, uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și apoi concentrate pentru a se obține un reziduu din care, după două concentrări din hexan, rezultă 750 mg dintr-un solid alb.

1275

Randament: 98%.

RMN H^1 ($DMSO-d_6$): δ 2,26 (s, 3H), 6,98 (d, J=8,03 Hz, 1H), 7,02 (t, J=7,69 Hz, 1H), 7,15 (d, J=7,37 Hz, 1H), 9,55 (br.s, 1H).

1280 IR ($CHCl_3$): 3600-2100 (br.), 3602, 2983, 1696, 1588, 1462, 1406, 1338, 1279, 1173, 1154, 1075, 1038, 920, 892, 854, 816 cm^{-1} .

MS(FD): m/e 152 (M^+ , 100).

Analizat pentru $C_8H_8O_3$:

Calculat: C, 63,15; H, 5,30;

Găsit: C, 63,18; H, 5,21.

1285 În mod alternativ, compusul dorit din subtitlu este preparat prin adăunarea a 22,6 g (0,33 moli) de azotit de sodiu în porții mici la o soluție răcită (-10°C) de 45 g (0,30 mol) de acid 3-amino-2-metilbenzoic și 106 g (58 ml; 1,08 mol) de acid sulfuric concentrat în 400 ml apă, timp în care se menține temperatura sub 7°C. Amestecul de reacție rezultat este agitat timp de aproximativ 30 de min la -10°C, turnat într-o soluție de 240 ml de acid sulfuric concentrat în 12 l apă și apoi ușor încălzit la 80°C (degajare de gaz dens între temperaturile 40 și 60°C). Când încetează degajarea gazului, amestecul de reacție este răcit la temperatura camerei, iar compusul din subtitlu este extras de cinci ori cu acetat de etil (60 ml). Fazele

1290

RO 119363 B1

organice amestecate sunt combinate cu 500 ml dintr-o soluție apoasă de carbonat de sodiu saturat. Straturile rezultante sunt separate, iar stratul apos este acidulat la pH 2 cu acid clorhidric concentrat. Compusul din titlu este apoi extras utilizând acetat de etil (500 ml), iar fazele organice reunite sunt spălate cu saramură, uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și apoi concentrate sub presiune redusă pentru a se obține un material brut. Acest material brut este purificat utilizând două recristalizări dintr-un amestec de acetat de etil/cloroform pentru a se obține 23,2 g de pulbere de culoare portocaliu deschis. Randament: 52%.

1295

Preparația 3

1300

A. Ester de 2S-N-(Benziloxicarbonil)-2-pirolidincarboxilat pentafluorfenil

La o soluție rece (0°) de 30 g (0,12 moli) de acid 2S-N (benziloxicarbonil)-2-pirolidincarboxilic și 25,8 g (0,14 mol) de pentafluorfenil în 450 ml de tetrahidrofuran, se adăunează 27,7 g (0,14 moli) de 1-(3-dimetilaminopropil-3-etilcarbodiimidă (EDC) într-o porție, urmată de adăunarea a 150 ml clorură de metilen. Amestecul de reacție rezultat a fost încălzit la temperatura camerei și a reacționat timp de aproximativ 4 h. Când reacția este completă, în mod substanțial, conform indicațiilor TLC, amestecul de reacție este concentrat sub presiune redusă, pentru a se obține un reziduu. Acest reziduu este dizolvat în 500 ml de acetat de etil și spălat secvențial cu apă, carbonat de potasiu, acid clorhidric 1N și saramură, uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și adus la sec sub presiune scăzută pentru a se obține un solid. Acest solid este redizolvat în hexan și spălat cu carbonat de potasiu, uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și redus la sec sub presiune scăzută pentru a se obține 45,95 g de compus dorit denumit în subtitlu. Randament: 92%

1305

1310

RMN H¹ (CDCl₃): δ 1,95-2,15 (m, 2H), 2,20-2,35 (m, 1H), 2,35-2,50 (m, 1H), 3,50 - 3,75 (m, 2H), 4,65-4,75 (m, 1H), 5,02-5,30 (m, 2H), 7,20 - 7,45 (m, 5 H).

1315

B. 2S-N-[Benziloxicarbonil]pirolidin-2-N(t-butil)carboxamidă

La o soluție rece (0°C) de 45,90 g (0,111 mmoli) de compus din subtitlul Preparării 3A în 100 ml de clorură de metilen anhidră sunt adăunați lent 100 ml (0,952 mmol) de t-butilamină. Amestecul de reacție este încălzit la temperatura camerei și reacționat timp de aproximativ o oră, după care este diluat cu 100 ml de clorură de metilen și apoi spălat secvențial cu carbonat de potasiu 1N, acid clorhidric 1N, carbonat de potasiu 1N și saramură, uscat pe sulfat de sodiu și apoi filtrat prin tampon utilizând 50% acetat de etil în hexan pentru a se obține 37,74 g de compus dorit care este utilizat fără o purificare ulterioară.

1320

RMN H¹ (CDCl₃): δ 0,95 - 1,50 (m, 9 H), 1,70 - 2,40 (m, 4 H), 3,30-3,60 (m, 2 H), 4,10 - 4,30 (m, 1H), 4,95-5,35 (m, 2H), 5,65 (br.s, 0,5 H), 6,55 (br.s, 1H), 7,20-7,50 (m, 5,5 H).

1325

C. 2S-Pirolidin-2N-(t-butil)-carboxamidă

Compusul din subtitlul Preparării 3B (2,71 g, 8,9 mmol) este deprotejat conform detaliilor din Preparația 1B, utilizând 500 mg de 10% paladiu-pe-carbon și hidrogen gaz (1 atmosferă) în 200 ml de etanol.

Randament: 1,53 g (-100%).

1330

RMN H¹ (CDCl₃): δ 1,35 (s, 9H), 1,60-1,75 (m, 2H), 1,76-1,90 (m, 1H), 2,00-2,15 (m, 1H), 2,58 (br.s, 1H), 2,80-3,05 (m, 2H), (3,55-3,65 (m, 1H), 7,45 (br.s, 1H).

D. [2S-(2R*,2'S*,3'R*)]-[3*-N(Benziloxicarbonil)-amino-2'-hidroxi-4'-fenilbutil]pirolidin-2-N-(t-butil)carboxamidă

O soluție conținând 122 mg (0,72 mmoli) de compus din subtitlul Preparării 3C și 200 mg (0,68 mmol) de [1S-(1R*,1'R*)]-1-[(1-N-(benziloxicarbonil)amino-2'-fenil)etil]oxiran în 10 ml de metanol este agitată pe timpul nopții. Când reacția este în mod substanțial completă, conform indicațiilor TLC, amestecul de reacție este concentrat sub presiune scăzută. Compusul dorit este purificat utilizând cromatografie pe coloană (gradient de eluent de 2-4% metanol în clorură de metilen) pentru a se obține 232,2 mg de solid amorf transparent.

1335

Randament: 55 %

1340

RO 119363 B1

$[\alpha]_D -56,97^\circ$ ($c=0,27$, MeOH).

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 1,33 (s, 9H), 1,55 - 1,95 (m, 4H), 2,05-2,25(m, 1H), 2,40-2,55 (m, 1H), 2,65-2,75 (m, 2H), 2,80-3,00 (m, 3H), 3,15-3,30 (m, 1H), 3,65 - 3,75 (m, 1H), 3,85 - 3,95 (m, 1H) 4,86 (br.d, $J=1,1$ Hz, 1H), 5,03 (s, 2H), 6,95 (m, 1H), 7,15-7,40 (m, 10H).

IR ($CHCl_3$): 3700-3100 (br.), 3434, 3031, 2976, 1720, 1664, 1604, 1512, 1455, 1394, 1367, 1343, 1233, 1156, 1107, 1063, 1028, 911 cm^{-1} .

MS(FD): m/e 468 (M^+ , 100)

E. [2,S-(2R,2'S*,3'R*)]-1-[3'-Amino-2'-hidroxi-4'-fenilbutil]pirolidin-2N-butylcarboxamidă*

Compusul din subtitlul Preparației 3D (222 mg, 0,47 mmoli) este deprotejat în mod substanțial conform detaliilor din Preparația 1B, utilizând 67 mg de 10% paladiu pe carbon și hidrogen gaz (1 at) în 15 ml etanol. Compusul dorit este purificat utilizând cromatografie pe coloană (eluent de 10% izopropanol în clorură de metilen conținând 0,75 % hidroxid de amoniu) pentru a se obține 80 mg de solid albicios.

Randament: 51%

$[\alpha]_D -55,26^\circ$ ($c=0,23$, MeOH).

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 0,80 - 3,70 (m, 25 H), 6,90 - 7,40 (m, 6H).

IR ($CHCl_3$): 3692, 3600-3200 (br.), 2975, 1657, 1603, 1522, 1497, 1455, 1393, 1366, 1232, 1198, 1137, 1049, 882 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 334 (M^+ , 100).

Exemplul de referință 1.

[3S-(3R,4aR*,8aR*,2'S*,3'R*)]-2-[2'-Hidroxi-3'-fenilmetil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-fluor-3"-hidroxifenil)pentil]decahidroizochinolin-3-N-t-butylcarboxamidă*

La o soluție rece ($-10^\circ C$) conținând 80 mg (0,20 mmoli) din compusul subtitlului de la Preparația 1B, 31 mg (0,20 mmoli) de la Preparația 11B și 27 mg (0,20 mmoli) hidrat de 1-hidroxibenzotriazol ($HOBT \cdot H_2O$) în 3 ml tetrahidrofuran anhidru, sunt adaugați 41 mg (0,20 mmoli) 1,3-diciclohexilcarbodiimidă (DCC). Amestecul de reacție este agitat timp de 36 h, la temperatura camerei și apoi este concentrat, în condiții de presiune redusă. Rezi-duul rezultat este redizolvat în acetat de etil, este filtrat prin celită, este spălat succesiv cu bicarbonat de sodiu saturat și cu soluție de sare, este uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat. Produsul brut este purificat folosind cromatografie radială (placă 1 mm; gradient eluent de 2-5% metanol în clorură de metilen) pentru a obține 79 mg de spumă albă.

Randament 73%.

$[\alpha]_D - 90,80^\circ$ ($c=0,333$, MeOH).

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 1,24 (s, 9H), 1,16-2,05 (m, 14 H), 2,20-2,40 (m, 2H), 2,55-2,70 (m, 2H), 2,90-3,04 (m, 2H), 3,10-3,25 (m, 1H), 4,03 (br.s, 1H), 4,51 (br.s, 1H), 6,01 (s, 1H), 6,90-7,35 (m, 9H).

IR ($CHCl_3$): 3580, 3550-3100 (br.), 2929, 2865, 1662, 1596, 1521, 1472, 1455, 1394, 1368, 1293, 1157, 1047, 879, 839 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 540 (M^+ , 100).

HR MS(FAB): m/e pentru $C_{31}H_{43}N_3O_4F$:

Calculat: 540, 3238; Găsit: 540,3228.

Exmplul de referință 2.

[3S-(3R,4aR*,8aR*,2'S*,3'R*)]-2-[2'-Hidroxi-3'-fenilmetil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-clor-pirid-3"-il)pentil]decahidroizochinolin-3-N-t-butylcarboxamidă*

Compusul din titlu este preparat în conformitate cu procedeul prezentat în Exemplul 1, folosind 80 mg (0,20 mmoli) din compusul subtitlului de la Preparația 1B, 31 mg (0,20 mmoli) acid 2-clornicotinic, 41 mg (0,20 mmoli) DCC și 27 mg (0,20 mmoli) $HOBT \cdot H_2O$ în 3 ml tetrahidrofuran anhidru. Produsul brut se purifică folosind cromatografie radială (placă 1 mm; gradient eluent de 0-5% metanol în clorură de metilen) pentru a obține 58 mg spumă de culoare albă.

Randament 54%.

RO 119363 B1

Apoi se adaugă DCC, și 23 mg (0,167 mmoli) de HOBT.H₂O în 4 ml de tetrahidro-
furan. Materialul rezultat brut este purificat utilizând cromatografie radială (placă de 1 mm;
eluent 3%,metanol în clorură de metilen) pentru a obține 75 mg de spumă albă. 1395

Randament 80%.

$[\alpha]_D -43,75$ (c=0,160, MeOH).

¹H RMN (CDCl₃): δ 0,87(t, 3H), 1,18(s, 9H), 1,21-2,04(m, 15H), 2,24-2,33(m, 2H), 2,49-
2,58(m, 3H), 2,66(m, 1H), 2,98(m, 2H), 3,37(m, 1H), 3,99(m, 1H), 4,52(m, 1H), 5,07(m, 1H), 1400
5,70(m, 1H), 6,43(d, J=8,32 Hz, 1H), 6,56(d, J=7,32 Hz, 1H), 6,76(d, J=7,12 Hz, 1H), 6,95(d,
J=7,78 Hz, 1H), 7,20-7,33(m, 5H).

IR (KBr): 3287 (br.), 3086, 2932, 2868, 1681, 1558, 1456, 1368, 1334, 1291, 1261, 1218,
1169, 1101, 1042, 776, 734, 552 cm⁻¹.

MS (FD): m/e 564 (M⁺, 100).

Exemplul 1. [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-Hidroxi-3'-feniltiometil-4'-aza-5'-
oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxifenil)pentil]decahidroizochinolin-3-N-t-butylcarboxamidă 1405

Compusul din titlu este preparat în conformitate cu procedeul prezentat în Exemplul
de referință, folosind 70 mg (0,16 mmoli) din compusul subtitlului de la Preparația 1G,
24,6 mg (0,16 mmoli) din compusul subtitlului de la Preparația 2C, 33 mg (0,16 m) DCC și
22 mg (0,16 mmol) HOBT.H₂O în 4 ml tetrahidrofuran. Produsul brut rezultat este purificat
folosind cromatografie radială (placă 1 mm; eluent de 3% metanol în clorură de metilen, pen-
tru a obține 54 mg spumă albă. 1410

Randament 60%.

$[\alpha]_D - 119,23$ (c=0,26,MeOH).

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,09 (s, 9H), 1,12-1,79 (m, 12H), 1,93-2,02 (m, 2H), 2,17-2,30 (m, 2H),
2,31 (s, 3H), 2,43-2,61 (m, 2H), 2,91 (m, 1H), 3,42 (m, 1H), 3,78 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 4,47
(m, 1H), 5,37 (m, 1H), 5,51 (br.s, 1H), 6,84 (m, 1H), 7,06 (m, 2H), 7,17-7,32 (m, 4H), 7,45
(m, 2H). 1415

IR (KBr): 3297, 2925, 2862, 1627, 1586, 1530, 1482, 1466, 1439,
1366, 1287, 1221, 1156, 1119, 1026, 801, 735, 689 cm⁻¹. 1420

MS (FD): m/e 568 (M⁺, 100). HR MS(FAB) pentru C₃₂H₄₆N₃O₄S:

Calculat: 568,3209; Găsit: 568,3182.

Exemplul 2. Sarea acidului metansulfonic de [3S(3R*,4aR*, 8aR*, 2'S*, 3'R*)]-2-[2'-
Hidroxi-3'-feniltiometil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxifenil)pentil]-decahidroizochinolin-3-
N-t-butylcarboxamidă 1425

Acest compus se prepară printr-un procedeu analog cu cel din Exemplul de referință
1, cu excepția etapelor de Preparațiilor 1A și 1D care au fost schimbate ca în etapa 1 de mai
jos și cu adăugarea etapei 2 de mai jos.

Într-un balon de 2 l se introduc (109,6 g) Ph₃P în 500 ml CH₂Cl₂ și amestecul este
răcit la -70°C. Este adaugată la amestec, în picături, o soluție de (66 ml) dietilazidodicarboxi-
lat în 60 ml THF, timp de 25 min. După 25 min, este adaugată, în picături, o soluție de
(100 g) N-carbobenziloxi-L-serină în 400 ml THF timp de 45 de min și urmează să se încăl-
zească la temperatura camerei într-o baie de apă timp de două ore. La amestec sunt adau-
gați 150 ml THF. Într-un alt balon, o soluție de (46 g) tiofenol într-un litru de THF, este răcită
pe o baie de gheață la 0°C și este tratată prin picurare cu o dispersie de (10 g) NaH pentru
a obține o soluție densă. După o oră, soluția brută de lactonă este adaugată prin picurare
la soluția de tiolat cu ajutorul unei pâlnii suplimentare, timp de 30 min. După 12 h, se obține
prin filtrare un precipitat alb și turta de filtrare este spălată cu THF. Substanța solidă este re-
luată în NaHSO₄ 0,4 N și EtOAc, este separată și stratul organic este spălat cu soluție de
sare, este uscat și este evaporat pentru a obține acidul 2R-2-N- (benziloxicarbonil)amino-3-
feniltio-propanoic sub forma unui ulei vâcos. 1430
1435
1440

RO 119363 B1

Substanța solidă inițială se crede a fi sarea de sodiu a produsului dorit. Astfel, randamentul și ușurința izolării acesteia pot fi îmbunătățite prin izolarea directă a sării de sodiu.

- 1445 Este adăugată (16,87 g, 46,4 mmoli) cloracetona brută, 3R-1-clor-2-oxo-5-N-(benzil-oxycarbonil)amino-4-feniltio butan, la 1 l EtOH absolut și 200 ml THF și soluția este răcită pe o baie CO₂-acetonă (T_{int} -78°C) și sunt adăugați prin picurare, timp de 1 h (T_{int} -75°C) (2,63 g, 69,5 mmoli) NaBH₄ în 200 ml EtOH absolut. Analiza TLC după adăugarea a indicat că reacția este completă. Amestecul de reacție este diluat cu 300 ml eter și este stins prin
- 1450 adăugare lentă de NaHSO₃ 0,4 N cu agitare, care produce degajare de gaz. Acest amestec este concentrat sub presiune redusă pentru a îndepărta majoritatea EtOH și este adăugată apă suplimentară. Amestecul este supus extracției cu eter și straturile organice reunite sunt spălate cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃, și cu saramură, este uscat (Na₂SO₄) și concentrat pentru a obține 15,7 g substanță solidă albă. Acest material este triturat cu hexan fierbent (300 ml) și hexanul este decantat cu atenție în timp ce este încă fierbent. Această
- 1455 operație este repetată de 10 ori (câte 300 ml), pentru a obține 10,35 g substanță solidă albă (un izomer pur prin analiza TLC). Filtratul hexanului este concentrat pentru a obține 6 g substanță solidă albă, care este îndepărtată. Substanța solidă triturată este încălzită cu 50 ml CH₂Cl₂ și circa 6 ml hexan și este filtrată fierbent. Soluția limpede este lăsată la răcire
- 1460 la 25°C și apoi este introdusă în congelator. Substanța solidă care rezultă este filtrată și este spălată cu hexan pentru a obține 7,157 g substanță solidă albă. Filtratul este reunit cu filtratul hexanic de mai sus și cu produsul brut de reacție din cele două experimentări la scară redusă (500 mg fiecare materie primă cetonică) și substanța rezultată este supusă cromatografiei pe SiO₂ (2:1 hexani-eter >1:1 hexan-eter, încărcat cu CH₂Cl₂) pentru a obține 2,62 g
- 1465 produs suplimentar. Se obține o cantitate totală de 10,31 g izomer pur de [2S-(2R*,3S*)]-1-clor-2-hidroxi-3-N-(benziloxycarbonil) amino-4-feniltio-butan (randament 50% față de acid). [α]_D = -63,60 (c=1, MeOH).

(2) Formarea sării

- 1470 O cantitate de 3,34 g de [3S-(3H*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'Hidroxi-3'-fenil-tiometil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxifenil)pentil]decahidro-izochinolin-3-N-t-butylcarboxamidă este dizolvată în 30 ml MeOH și 30 ml CH₂Cl₂ și este adăugată prin picurare o soluție de acid metansulfonic (596 mg) în 10 ml CH₂Cl₂. După 10 min, amestecul de reacție este concentrat pentru a forma o spumă. Sarea brută este reluată în 5 ml THF și este adăugată lent la un amestec de 175 ml etil eter și 25 ml hexan, sub agitare, până când rezultă o suspensie fină.
- 1475 Aceasta este răcită într-un congelator, este filtrat la rece și este spălat de câteva ori cu etil-eter, urmată de uscarea într-o etuvă de vid pentru a obține 3,75 g (randament 96%) sare a acidului metansulfonic de [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-hidroxi-3'-feniltiometil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxifenil)pentil]-decahidroizochinolin-3-N-t-butyl carboxamidă, ca pulbere albă.

- 1480 Exemplele următoare de formulări sunt numai ilustrative numai și nu intenționează să limiteze întinderea protecției invenției. Termenul "ingredient activ" reprezintă un compus conform invenției sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic.

Formulara 1

Capsulele tari de gelatină se prepară, folosind următoarele ingrediente:

| | <u>Cantitate (mg/capsulă)</u> |
|---------------------|-------------------------------|
| Ingredient activ | 250 |
| Amidon uscat | 200 |
| Stearat de magneziu | 10 |
| TOTAL | 460 mg |

RO 119363 B1

Formulara 2

1490

O tabletă se prepară, folosind ingredientele de mai jos:

| | <u>Cantitate(mg/tabletă)</u> | |
|-----------------------------------|------------------------------|------|
| Ingredient activ | 250 | |
| Celuloză, microcristalină | 400 | |
| Dioxid de siliciu, tratat cu abur | 10 | 1495 |
| Acid stearic | 5 | |
| TOTAL | 665 mg | |

Componentele sunt amestecate și comprimate pentru a obține tablete, fiecare cântărind 665 mg.

1500

Formulara 3

O soluție de aerosol se prepară, conținând componentele următoare:

| | <u>Cantitate</u> | |
|---|------------------|------|
| Ingredient activ | 0,25 | |
| Metanol | 25,75 | 1505 |
| Agent de pulverizare 22 (Clordifluormetan) | 74,00 | |
| TOTAL | 100,00 | |

Compusul activ se amestecă cu etanol și amestecul se adaugă la o porție de agent de pulverizare 22, se răcește la -30°C și se trece într-un dispozitiv de umplere. Cantitatea necesară este apoi alimentată în recipientul din oțel inoxidabil și se diluează cu restul de agent de pulverizare. Se fixează apoi supapa la recipient.

1510

Formulara 4

Tabletele, conținând fiecare 60 mg ingredient activ, se prepară, după cum urmează:

| | <u>Cantitate (mg/tabletă)</u> | |
|---|-------------------------------|------|
| Ingredient activ | 60 | 1515 |
| Amidon | 45 | |
| Celuloză microcristalină | 35 | |
| Polivinilpirolidonă (ca soluție 10% în apă) | 4 | |
| Carboximetil amidon de sodiu | 4,5 | 1520 |
| Stearat de magneziu | 0,5 | |
| Talc | 1 | |
| TOTAL | 150 | |

Ingredientul activ, amidonul și celuloza se trec printr-o sită de 45 mesh U.S. și se omogenizează complet. Soluția apoasă conținând polivinilpirolidonă se amestecă cu pulberea rezultată și amestecul se trece apoi printr-o sită de 14 mesh U.S. Granulele astfel preparate se usucă la 50°C și se trec printr-o sită de 18 mesh U.S. Carboximetil amidonul de sodiu, stearatul de magneziu și talcul se trec în prealabil printr-o sită de 60 mesh U.S. și apoi se adaugă la granulele care, după amestecare, sunt comprimate într-o mașină de tablete pentru a obține tablete, cântărind fiecare 150 mg.

1525

1530

Formulara 5

Capsulele, conținând fiecare 80 mg ingredient activ, se prepară, după cum urmează:

| | <u>Cantitate (mg/capsulă)</u> | |
|--------------------------|-------------------------------|------|
| Ingredient activ | 80 | 1535 |
| Amidon | 59 | |
| Celuloză microcristalină | 59 | |
| Stearat de magneziu | 2 | |
| TOTAL: | 200 | |

RO 119363 B1

1540 Ingredientul activ, celuloza, amidonul și stearatul de magneziu se amestecă, se trec printr-o sită de 45 mesh U.S. și se introduc în capsulele tari de gelatină în cantități de 200 mg.

Formulara 6

1545 Supozitoarele, conținând fiecare 225 mg ingredient activ, se prepară după cum urmează:

| | |
|---------------------------------------|----------|
| Ingredient activ | 225 mg |
| Gliceride ale acizilor grași saturați | 2,000 mg |
| TOTAL | 2,225 mg |

1550 Ingredientul activ se trece printr-o sită de 60 mesh U.S. și se suspendă în gliceridele acizilor grași saturați, înainte de topire, folosind căldura minimă necesară. Amestecul se trece apoi într-o formă pentru supozitoare de capacitate nominală de 2 g și se lasă să se răcească.

Formulara 7

1555 Suspensiile, conținând fiecare 50 mg ingredient activ per doză de 5 ml, se prepară după cum urmează:

| | |
|--------------------------------|---------|
| Ingredient activ | 50 mg |
| Carboximetil celuloză de sodiu | 50 mg |
| Sirop | 1,25 ml |
| 1560 Soluție de acid benzoic | 0,10 ml |
| Aromatizant | q.v. |
| Colorant | q.v. |
| Apă purificată până la total | 5 ml |

1565 Ingredientul activ se trece printr-o sita de 45 mesh U.S. și se amestecă cu carboximetilceluloza de sodiu și cu sirop pentru a forma o pastă moale. Soluția de acid benzoic, aromatizantul și colorantul se diluează cu o porție de apă și se adaugă, sub agitare. Apa necesară se adaugă apoi pentru a obține volumul necesar.

Formulara 8

1570 O formulare intravenoasă se prepară după cum urmează:

| | |
|--------------------------|----------|
| Ingredient activ | 100 mg |
| Soluție salină izotonică | 1,000 ml |

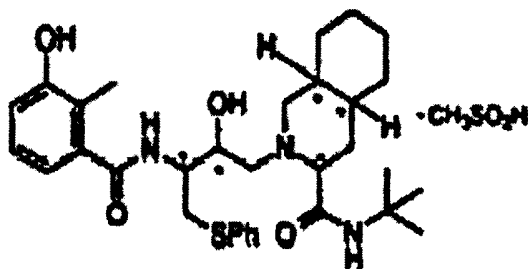
Soluția ingredientelor de mai sus, se administrează, în general, intravenos, unui subiect la o viteză de 1 ml/min.

1575

Revendicări

1. Derivat de decahidroizochinolină, cu formula:

1580



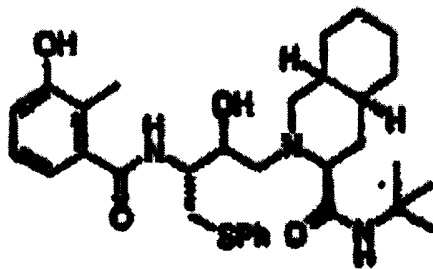
1585

sau o sare acceptabilă farmaceutic, a acesteia.

RO 119363 B1

2. Stereoizomer al compusului conform revendicării 1, care are formula:

1590



1595

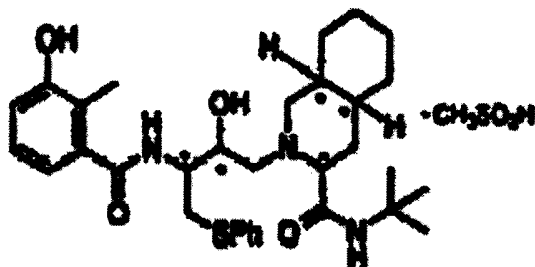
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

3. Sare în mod esențial pură conform revendicării 2.

4. Stereoizomer în mod esențial pur conform revendicării 2.

1600

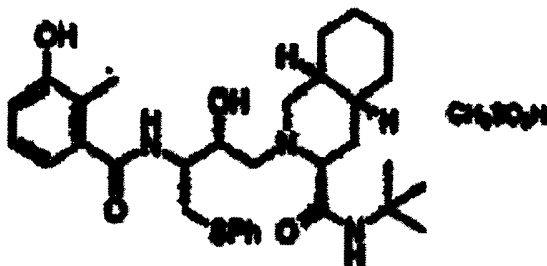
5. Derivat de decahidroizochinolină cu formula:



1605

6. Stereoizomer al compusului conform revendicării 5, care are formula

1610



1615

7. Stereoizomer în mod esențial pur conform revendicării 6.

8. Compoziție farmaceutică, cuprinzând o cantitate eficientă de compus conform oricăreia din revendicările 1...7, și un purtător acceptabil farmaceutic.

1620

9. Utilizarea unui compus definit în una din revendicările 1... 7, la fabricarea unui medicament pentru inhibarea proteazei HIV.

Președintele comisiei de examinare: chim. Hăulică Mariela

Examinator: chim. Gruia Amelia