

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 941149 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **941149**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C07C271/22
C07C237/20
C07C237/22
C07D471/14
C07D235/16
C07D285/125
C07K 5/02**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **10.03.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **10.03.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.12.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

12.03.1993 GB 9305144 23.09.1993 GB 9319667

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Sandoz AG, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Billich, Andreas, Österreich, ITÄVALTA, (AT)
2 • Charpiot, Brigitte, Österreich, ITÄVALTA, (AT)
3 • Ettmayer, Peter, Österreich, ITÄVALTA, (AT)
4 • Gstach, Hubert, Österreich, ITÄVALTA, (AT)
5 • Lehr, Philipp, Österreich, ITÄVALTA, (AT)
6 • Scholz, Dieter, Vienna, ITÄVALTA, (AT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

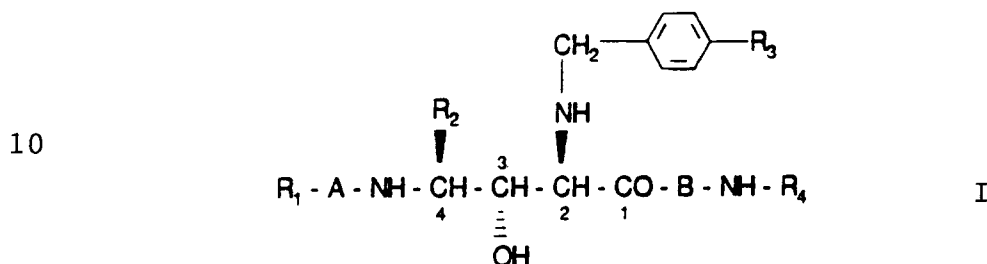
(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

2,4-diamino-3-hydroksikarboksylihapon johdannaisia

Derivat av 2,4-diamino-3-hydroxikarboxylsyra

2,4-DIAMINO-3-HYDROKSIKARBOKSYLIHAPPOJOHDANNAISIA -
2,4-DIAMINO-3-HYDROXYKARBOXYLSYRADERIVAT

Keksintö koskee 4-amino-3-hydroksikarboksyy-
5 lihappojohdannaisia. Keksintö koskee kaavan I mukaisia
yhdisteitä



joissa

15 A ja B toisistaan riippumatta tarkoittavat sidosta tai
valinnaisesti substituoitua aminoasyyliosaa;

R₁ tarkoittaa vetyä; aminoa suojaavaa ryhmää; tai ryh-
mää, jolla on kaava R₅Y, jossa

20 R₅ tarkoittaa vetyä tai valinnaisesti substi-
tuiotua alkyyli-, alkenyyli-, alkinyyli-,
aryyli-, aryylialkyyli-, heteroaryyli-,
heteroaryylialkyyli-, heterosyklyyli- tai
heterosyklyylialkyyli-ryhmää; ja

25 Y tarkoittaa -CO-; -NHCO-; -NHCS-; -SO₂-;
-O-CO-; tai -O-CS-;

R₂ tarkoittaa luonnollisen aminohapon sivuketjua; al-
kyyli-, aryylialkyyli-, heteroaryylialkyyli-, tai
sykloalkyylialkyyli-ryhmää; tai trimetyylisilyylimet-
yyliä, 2-tienyyliimetyyliä tai styryylimetyyliä:

30 R₃ tarkoittaa halogeenia, alkyyliä, alkoksia tai hyd-
roksialkoksia; ja

R₄ tarkoittaa 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyliä; (S)-2-
hydroksi-1-fenyylietyyliä; tai 2-hydroksibentsyyliä,
joka asemassa 4 valinnaisesti on substituoitu metok-
35 silla:

vapaassa muodossa tai suolan muodossa;

joita tämän jälkeen lyhyesti nimitetään " keksinnön mu-

kaisiksi yhdisteiksi"

Tähän päivään mennessä on ollut selvä tarve löytää yhdisteitä, jotka tehokkaasti estävät retrovii-
ruksia sellaisen virustartunnan saaneessa ihmisessä, ja
5 siten hoitaa tai estää niiden aiheuttamia tauteja, kuten immuunikatoa (AIDS).

Eräs ensi askel retrovirusehkäisyn aikaansaamiseksi on virusproteinaasi-inhibiittorin, joka on välttämätön viruspolypeptidi prekursorien tuottamiseksi
10 proteolyttisellä kypsymisellä, esim. HIV proteinaasin, käyttö.

Esillä olevan keksinnön mukaiset yhdisteet ovat viruksenvastaisesti vaikuttavia. Ne estävät HIV proteinaasin. Niillä on erityisen hyödyllisiä farmako-
15 logisia ominaisuuksia, erikoisesti oraalibiosoveltuvuus, jotka tekevät niistä paremmin soveltuvia tähän tarkoitukseen kuin rakenteellisesti samanlaiset yhdisteet.

R_1 on edullisesti vety, 2-pyridyylimetoksikarbonyyli-, bentsyyli-CH(OH)-karbonyyli, fenoksimetyyli-
20 karbonyyli- tai amina suojaava ryhmä, kuten esim. tert-butoksikarbonyyli tai bentsyylioksikarbonyyli; se on edullisesti tert-butoksikarbonyyli tai bentsyylioksi, edullisemmin bentsyylioksikarbonyyli.

Kun A on valinnaisesti substituoitu aminoasyyliosaa, se on edullisesti valinnaisesti substituoitu α -aminoasyyliosaa kuten esim. alaniini, leusiini, isoleusiini, asparagiini, valiini, tert-butyyliglysiini, tert-leusiini tai histidiini. Se on edullisesti luonnollisen α -aminohapon, edullisesti aminohapon, joka on
30 proteiinin normaali rakenneosa tai tert-leusiini, valinnaisesti suojattu osa. A on erityisesti L-valiini, L-tert-leusiini tai sidos, edullisemmin L-tert-leusiini.

R_2 on edullisesti luonnollisen aminohapon, edullisesti α -aminohapon, edullisesti aminohapon, joka on proteiinin normaali rakenneosa, sivuketju. Se on
35

esim. isopropyyli, aminokarbonyylimetyyli, metyyli, 1-metyyllipropyli, bentsyyli, 4-hydroksibentsyyli tai isobutyli, edullisesti bentsyyli.

Kun B on valinnaisesti substituoitu aminoasyyliosa, se on edullisesti valinnaisesti substituoitu α -aminoasyyliosa, kuten esim. fenyylialaniini, valiini, leusiini, isoleusiini,alaniini tai asparagiini. Se on edullisesti luonnollisen α -aminohapon, edullisesti aminohapon, joka on proteiinin normaali rakenneosa, valinnaisesti substituoitu osa. B on erityisesti L-valiini tai sidos, edullisemmin sidos.

R_3 on edullisesti halogeeni, metyyli tai metoksi, edullisesti metoksi.

R_4 on edullisesti 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli tai 2-hydroksibentsyyli valinnaisesti substituoitu niin kuin edellä on määritetty, edullisesti 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli.

Y on edullisesti -CO- tai -O-CO-, edullisesti -O-CO-.

R_5 on edullisesti valinnaisesti substituoitu alkyli, aryylialkyli tai heteroaryylialkyliryhmä, edullisesti alkyli; kun se on valinnaisesti substituoitu heteroaryylialkyli, se on edullisesti pyridyylialkyli, edullisesti 2-pyridyylimetyyli; kun se on valinnaisesti substituoitu aryylialkyli se on edullisesti bentsyyli-CH(OH)-; kun se on substituoitu alkyli se on edullisesti fenoksimetyyli.

Valinnaisesti substituoitu aminoasyyliosa on edullisesti substituoimaton. Kun se on substituoitu se on esim. substituoitu alkylillä, jossa on 1 - 4 hiiliatomia, kuten esim. O-tert-butyli-L-aspartyyllillä tai substituoitu typpi-atomeissa esim. (2-pyridyylimetyyli)N(metyyli)CO-, (5-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-2-yyli)SCH₂CO-, (bentstiatsoli-2-yyli)SCH₂CO-, (1-metyyli-1,3,4-triatsoli-2-yyli)SCH₂CO- tai (bentsimidatsoli-2-yyli-metyyli)N(metyyli)CO-. Sillä on edullisesti S konfiguraatio. Se on edullisesti α -aminoasyyliosa,

kuten esim. valiini tai tert-leusiini.

Valinnaisesti substituoitu alkyyli on edullisesti alkyyli, jossa on 1 - 5 hiiliatomia, edullisesti 1 - 4 hiiliatomia, esim. metyyli, etyyli, isopropyyli tai tert-butyli; siinä on erityisesti 1 - 4 hiiliatomia. Substituentti on esim. fenoksi, hydroksi, tai valinnaisesti suojattu amino.

Valinnaisesti substituoitu aryylialkyyli on esim. fenyylialkyyli, jossa on yhteensä 7 - 10 hiiliatomia, kuten esim. bentsyyli tai 2-fenyylietyyli; se on valinnaisesti substituoitu esim. hydroksilla, kuten esim. bentsyyli-CH(OH)- tai fenyyli-CH(CH₂OH)-, tai on esim. naftyylialkyyli, jossa on 1 - 4 hiiliatomia alkyleeniosassa.

Aminoa suojaava ryhmä on edullisesti bentsyylioksikarbonyyli tai tert-butoksikarbonyyli.

Valinnaisesti substituoitu heteroaryylialkyyli on edullisesti pyridyylialkyyli, erityisesti 2-pyridyylietymetyyli.

Aryyli, heteroaryyli ja aryyliosat aryylialkyylistä ja heteroaryylialkyylistä voivat olla mono- tai polysyklisiä, kuten esim. pyridyyli, naftyyli, 9-fluorenyylimetoksikarbonyyli (Fmoc) tai bentsimidatso-lyyli. Alkyleeniosa aryylialkyyli- tai heteroaryylialkyyli-ssä voi olla substituoitu esim. hydroksilla.

Heterosyklyyliryhmä ja heterosyklyylialkyyli-ryhmän heterosyklyyliosa on tyydytetty heterosyklinen ryhmä, jossa on yksi tai useampia heteroatomia, joka on valittu ryhmästä typpi, happi ja rikki. Siinä on edullisesti 5 tai 6 rengasatomia ja edullisesti jopa 3 heteroatomia.

Sykloalkyylialkyyli on edullisesti sykloheksyylialkyyli; siinä on edullisesti 1 - 4 hiiliatomia alkyleeniosassa.

Halogeeni on fluori, kloori, bromi tai jodi, edullisesti kloori tai bromi.

Alkyyli ja alkoksi, jossa edullisesti on 1 - 4

hiiliatomia, edullisemmin 1 tai 2 hiiliatomia, on edullisimmin metyyli tai metoksi.

Hydroksialkoksi on edullisesti ω -hydroksialkoksi, jossa on 2 - 4 hiiliatomia, erityisesti 2-hydroksietoksi.

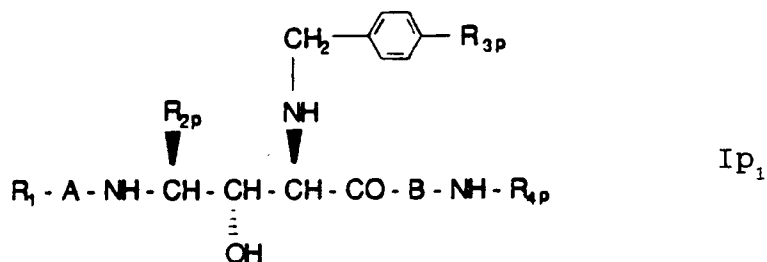
Suola on esim. happoadditiosuola kuten esim. hydrokloridi.

Kaavan I mukaisissa yhdisteissä on useita kiraalisia keskuksia ja ne voivat siksi esiintyä useina stereoisomeerinä. Keksintö tuo esiin kaikki stereoisomeerit samoin kuin raseemiset seokset, jos ei muuta mainita. Isomeerit voidaan hajottaa tai erottaa tavanno-
maisilla tekniikoilla esim. kromatografisesti. Kuten
kaavasta I käy ilmi konfiguraatio hiiliatomissa asemas-
sa 2 on R, asemissa 3 ja 4 se on S.

Edullinen aliryhmä keksinnön mukaisia yhdisteitä ovat kaavan I mukaiset edellä määritetyt yhdisteet, joissa R_4 on 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli, vapaassa muodossa tai suolan muodossa; toisessa aliryhmässä R_4 on (S)-2-hydroksi-1-fenyylitetyyli; vielä toisessa aliryhmässä R_4 on 2-hydroksibentsyyli tai edullisesti 2-hydroksi-4-metoksibentsyyli.

Vielä eräs aliryhmä keksinnön mukaisia yhdisteitä muodostavat yhdisteet, joilla on kaava Ip_1

25



30

joissa

R_{2p} tarkoittaa samaa kuin edellä R_2 sillä ehdolla, että sykloalkyylialkyyli tarkoittaa sykloheksyylialkyyliä,

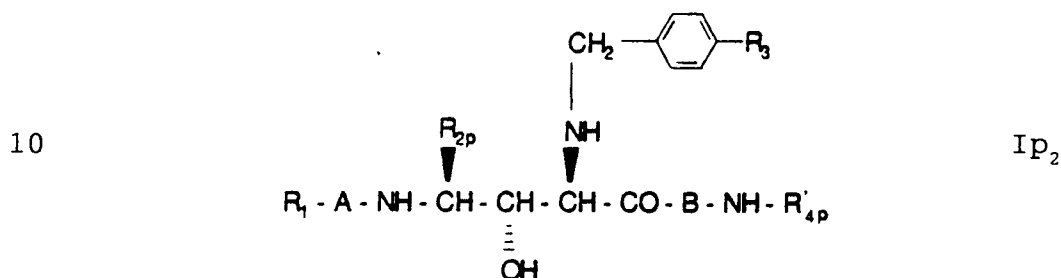
35

R_{3p} tarkoittaa alkoksia tai hydroksialkoksia.

R_{4p} tarkoittaa 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyliä tai

(S)-2-hydroksi-1-fenyylietyyliä; ja jäljelle jäävät substituentit tarkoittavat samaa kuin edellä on määritetty, vapaassa muodossa tai suolan muodossa.

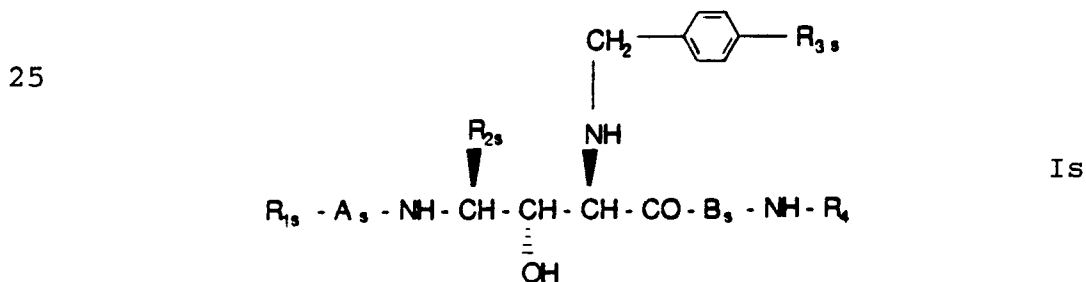
- 5 Vielä eräs aliryhmä keksinnön mukaisia yhdisteitä muodostavat yhdisteet, joilla on kaava Ip_2



joissa

- 15 R'_{4p} tarkoittaa 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyliä; (S)-2-hydroksi-1-fenyylietyyliä; tai 2-hydroksi-4-metoksibentsyyliä; ja jäljelle jäävät substituentit tarkoittavat samaa kuin edellä on määritetty, vapaassa muodossa tai suolan muodossa.

20 Vielä eräs aliryhmä keksinnön mukaisia yhdisteitä muodostavat yhdisteet, joilla on kaava Is



30 joissa

- A_s tarkoittaa sidosta, L-tert-leusinoxyliä, joka valinnaisesti on substituoitu typpiatomissa (5-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-2-yyli)- $\text{SCH}_2\text{CO}-$), (bentstiatsoli-2-yyli) $\text{SCH}_2\text{CO}-$ tai (1-metyyli-1,3,4-triatsoli-2-yyli) $\text{SCH}_2\text{CO}-$; L-valinoxyliä, joka valinnaisesti on substituoitu typpiatomissa (2-pyridyylimetyyli) $\text{N}(\text{metyyli})-\text{CO}-$ tai (bentsimidatsoli-2-yylimetyyli) $\text{N}(\text{metyyli})-\text{CO}-$
- 35

tyyli)-CO; L-isoleusinoyyliä; L-aspartyyliä, joka valinnaisesti on substituoitu vapaassa karboksyyliosassa alkyyllilla, jossa on 1 - 4 hiiliatomia; L-asparaginoyyliä; tai cis-1-aminosyklopent-2-yylikarbonyyli tai cis-1-aminosykloheks-2-yylikarbonyyli osaa, joka valinnaisesti on substituoitu typpiato-

missa (5-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-2-yyli)SCH₂CO-:
 B_s tarkoittaa sidosta tai L-valinoyyliä;
 R_{1s} tarkoittaa vetyä; tert-butoksikarbonyyliä bentsyylioksikarbonyyliä; tai ryhmää, jolla on kaava

R_{5s}Y_s-, jossa
 R_{5s} tarkoittaa isobutyryyliä, 2-hydroksi-4-metoksyfenyyliä, imidatso[1,2-a]pyrimidiini-2-yyliä, imidatso[1,2-a]tetrahydropyrimidiini-2-yyliä, imidatso[1,2-a]pyrimidiini-2-yylimetyyliä, tai 2-(bentsimidatsoli-2-yyli)etyyliä;

Y_s tarkoittaa -CO-; -NHCO-; tai -O-CO-;

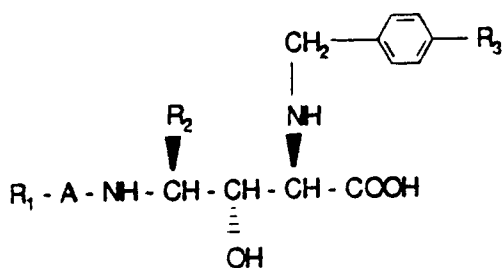
R_{2s} tarkoittaa bentsyyliä;

R_{3s} tarkoittaa klooria, bromia, metyyliä, metoksia, etoksia, tai 2-hydroksietoksia; ja

R_{4s} tarkoittaa samaa kuin edellä, vapaassa muodossa tai suolan muodossa.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa menetelmällä, johon kuuluu

a) yhdisteen, jolla on kaava



II

jossa substituentit ovat samoja kuin edellä määritetyt, reagoiminen yhdisteen kanssa, jolla on kaava H-B-NH-R₄, jossa B ja R₄ ovat samoja kuin edellä määritetyt tai

b) yhdisteen, jolla on kaava I,

jossa R_1 on joku muu kuin vety tai $HY-$,
valmistamista varten vastaavan yhdisteen I, jolla on
kaava I,

- jossa R_1 on vety tai $HY-$,
5 substituoinen tarkoituksenmukaisesti;
ja siellä missä esitetty

tuloksena saadun kaavan I mukaisen suojatussa muodossa
olevan yhdisteen suojan poistaminen, tai tuloksena
saadun kaavan I mukaisen suojaamattomassa muodossa
10 olevan yhdisteen tarkoituksenmukainen suojaaminen, ja
tuloksena saadun kaavan I mukaisen yhdisteen talteen
ottaminen vapaassa muodossa tai suolan muodossa.

Keksinnön mukaisia menetelmämuunnoksia voi-
daan saada aikaan kytkemällä aminohappoja tavallisella
15 tavalla. Menetelmämuunnosta a):ta varten, kaavan $H-B-$
 $NH-R_4$ mukainen yhdiste voi olla valinnaisesti suojatussa
ja/tai substituoidussa muodossa, tai voidaan käyttää
reagenssien esterit- tai amidimuotoja. Menetelmämuunnos-
ta b):tä varten reaktio saadaan sopivasti aikaan vas-
20 taavalla N-terminaali suojatulla ja/tai substituoidulla
aminohapolla, tai yhdisteellä, jolla on kaava R_1-A-Z ,
jossa Z tarkoittaa poislähtevää ryhmää, kuten nitro-
fenolia tai N-hydroksisukkini-imidiä ja R_1 on sama kuin
edellä on määritetty.

25 Keksinnön mukaiset menetelmämuunnokset voidaan
saada aikaan esimerkiksi liuottimessa, joka on inertti
reaktio-olosuhteiden aikana, kuten amidi, esim. dime-
tyyliformamidi, tai eetteri, esim. tetrahydrofuraani,
reaktiolämpötiloissa, jotka ovat n. huoneen lämpötila
30 (joka on edullisin) ja reaktioseoksen kiehumispisteen
välillä.

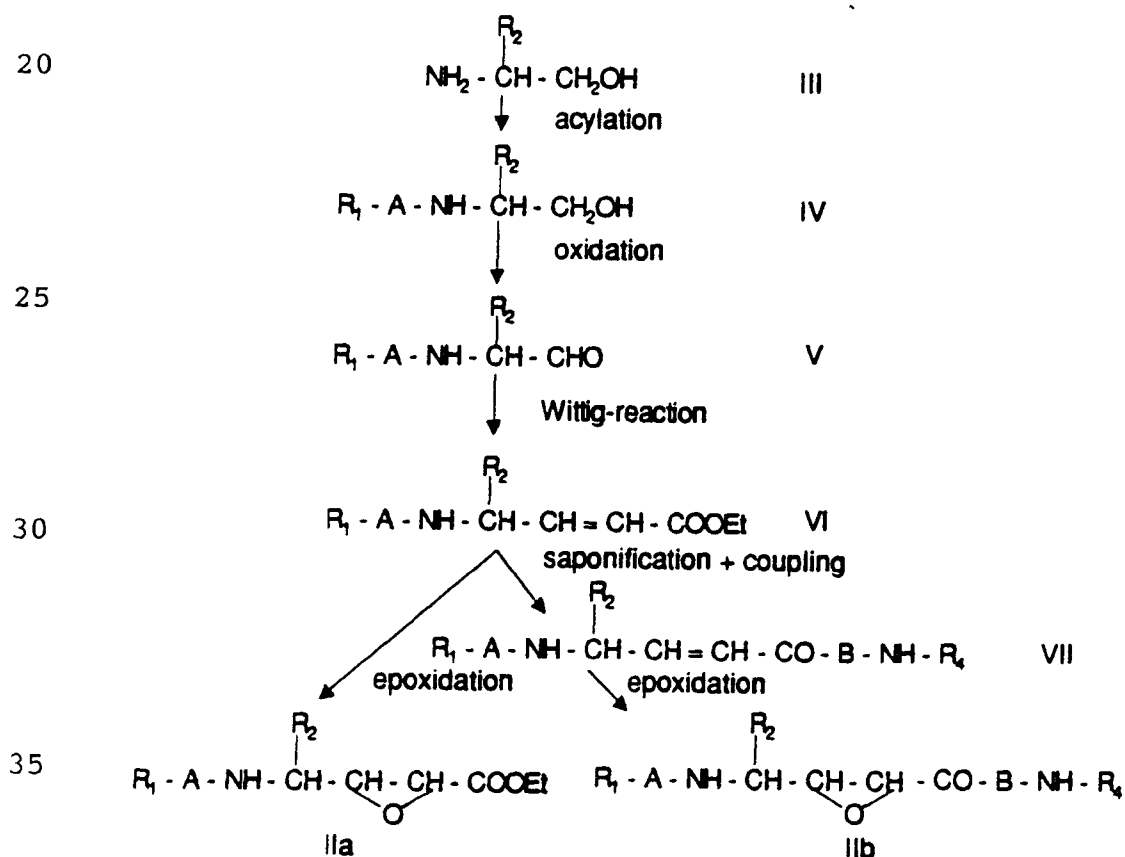
Lopputuotteet voidaan eristää ja puhdistaa
tunnettujen menetelmien mukaisesti esim. kromatografi-
sesti.

35 Lähtöaineet voidaan valmistaa tavallisella
tavalla. Kaavan II mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa
esim. avaamalla kaavan IIc mukaisten yhdisteiden,



jossa R_6 tarkoittaa valinnaisesti suojattua hydroksi- tai $-B-NH-R_4$ ryhmää ja jäljelle jäävät substituentit tarkoittavat samaa kuin edellä on määritetty, epoksi- rengasta sopivan bentsyyliamiinin läsnäollessa. Tämä voidaan tehdä tavallisella tavalla esim. liuottimessa, joka on inertti reaktio-olosuhteiden aikana, kuten esim. tetrahydrofuraanissa tai alkoholissa, esim. eta- nolissa, reaktiolämpötilassa, joka on välillä n. $-50^{\circ}C$ ja reaktioseoksen kiehumispiste, edullisesti välillä -
20° - n. $80^{\circ}C$.

Kaavan IIc mukainen lähtöaine voidaan valmistaa esim. seuraavan reaktiokaavan mukaisesti:



Tässä reaktiokaavassa substituentit ovat samo-
ja kuin edellä määritetyt. Reaktiokaavan yksittäiset
reaktiovaiheet voidaan suorittaa sellaisissa reaktio-
olosuhteissa, joita tavallisesti käytetään näissä reak-
tioissa, jolloin eri välituotteet voidaan kun on tar-
koituksenmukaista antaa reagoida eteenpäin ilman lisä-
eristystä.

Jäljellä jäävät lähtöaineet ja välituoteyhdis-
teet ovat joko tunnettuja tai voidaan valmistaa tun-
nettujen menetelmien mukaisesti tai analogisesti tun-
nettujen menetelmien mukaisesti tai analogisesti niin
kuin esimerkeissä on esitetty. 1(S)-amino-2(R)-hydrok-
si-indaani voidaan valmistaa esim. niin kuin on esitet-
ty kirjallisuudessa, julkaisuissa (J. Am. Chem. Soc. 73
[1951] 1639; J. Med. Chem. 35 [1992] 1685), tai rasee-
misen trans-1-amino-2-hydroksi-indaanin diastereomee-
risten suolojen, esim. (+)-O,O'-dibentsoyyliviinihapon
happosuolojen, fraktionoidun kiteyttämisen kautta.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä, mutta
eivät rajoita sitä. Kaikki lämpötilat on annettu °C.
Aminohappojen lyhennykset seuraavat kansainvälisiä
(IUPAC) sääntöjä. Seuraavia lyhennyksiä on käytetty:

	b	=	vapaassa emäs muodossa
25	BOC	=	tert-butoksikarbonyyli
	Bz	=	bentsyyli
	ch	=	hydrokloridi suolamuodossa
	dch	=	dihydrokloridi suolamuodossa
	depr.	=	suojauksen poisto
30	Et	=	etyyli
	Ex.	=	esimerkki
	iBu	=	2-metyyllipropyli
	Me	=	metyyli
	m.p.	=	sulamispiste
35	OMe	=	metoksi
	Phe	=	fenyli
	prot.	=	suojaus

tLeu = tert-leusinoxyli =
 -NHCH[-C(CH₃)₃]CO-
 Z = bentsoxylioksykarbonyyli

5 Esimerkki 1: 4(S)-tert-butoksykarbonyyliamino-3(S)-
hydrokxy-2(R)-(4-metoksybentsoxyliamino)-5-fenyyli-pen-
taanihappo-1(S)-amino-2(R)-hydrokxy-indaani-amidi
 (menetelmä muunnos a)

[A,B = sidos; R₁ = BOC; R₂ = Bz; R₃ = OMe R₄ =
 10 2(R)-hydrokxy-indaani-1(S)-yyli]

390 mg 4(S)-tert-butoksykarbonyyliamino-3(S)-
 hydrokxy-2(R)-(4-metoksybentsoxyliamino)-5-fenyyli-pen-
 taanihappo (kaavan II mukainen yhdiste) liuotetaan 50
 ml dimetyyliformamidia. Lisätään 130 mg 1(S)-amino-
 15 2(R)-hydrokxy-indaania, 120 mg hydroksibentsootriatsolia
 ja 170 mg N-etyyli-N'-(3-dimetyyliaminopropyyli)-karbo-
 di-imidihydrokloridia ja seosta sekoitetaan 3 vuoro-
 kautta huoneen lämpötilassa. Liuotin haihdutetaan pois,
 lisätään etyyliasetattia, liuosta pestään 1 N HCl,
 20 tyydytettyllä NaHCO₃-liuoksella ja kyllästetyllä suola-
 liuoksella, kuivataan ja liuotin haihdutetaan pois.
 Saadaan otsikon mukainen yhdiste (m.p. 183 - 185°C
 sykloheksaani/etyyliasetaatista 1/2).

Lähtöaine voidaan valmistaa seuraavalla taval-

25 la:

a) 4(S)-tert-butoksykarbonyyliamino-5-fenyyli-pent-
2(E)-eenihappoetyyliesteri (kaava VI)

3.12 ml oksalyylikloridia liuotetaan 40 ml
 kuivaa dikloorimetaania ja jäädytetään lämpötilaan
 30 -55°C. Tämän jälkeen 2.81 ml dimetyylisulfoksidia lisä-
 tään varovasti tiputtamalla ja sen jälkeen lisätään
 6.98 g BOC-L-fenyylialaninolia liuotettuna 40 ml di-
 kloorimetaania ja 3.125 ml dimetyylisulfoksidia lämpö-
 tilassa -50°C. Reaktioseosta sekoitetaan lämpötilassa
 35 -60°C 1 tunti, annetaan reagoida trietyyliamiinin kans-
 sa ja sekoitetaan kunnes se saavuttaa huoneen lämpöti-
 lan. Laimmennetaan 200 ml dikloorimetaanin kanssa,

- jonka jälkeen seos pestään 1 N HCl, kuivataan ja liuotin haihdutetaan pois. Jäännös liuotetaan tolueeniin, 6.32 g etoksikarbonyylimetyleenitrifenyylifosforaania lisätään ja reaktioseosta lämmitetään lämpötilassa 80°C yhden tunnin. Liuottimen pois haihduttamisen jälkeen jäännös erotetaan kromatografisesti silikageelillä (liuotin: tolueeni/etyyliasettaatti 4/1) (m.p. 47°C.)
- b) 4(S)-tert-butoksikarbonyyliamino-2(S),3(R)-epoksi-5-fenyyli-pentaanihapon etyyliesteri (kaava IIc)
- 10 3 g 4(S)-tert-butoksikarbonylamino-5-fenyyli-pent-2(E)-eenihappoetyyliesteriä liuotetaan 30 ml dikloorimetaania. 1.37 g m-klooriperbentsoehappoa lisätään ja reaktioseosta sekoitetaan 5 vuorokautta. Liuottimen haihduttamisen jälkeen jäännös erotetaan kromatografisesti silikageelillä (liuotin: tolueeni/etyyliasettaatti 4/1) (m.p. 55 - 61)
- 15 c) 4(S)-tert-butoksikarbonyyliamino-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyyliamino)-5-fenyyli-pentaanihapon etyyliesteri
- 20 12.8 g 4(S)-tert-butoksikarbonyyli-2(S),3(R)-epoksi-5-fenyyli-pentaanihappoetyyliesteriä liuotetaan 100 ml etanolia. 10 g 4-metoksibentsyyliamiinia lisätään ja liuosta sekoitetaan lämpötilassa 70°C 12 tuntia. Liuotin haihdutetaan pois ja jäännös erotetaan kromatografisesti silikageelillä (liuotin: sykloheksaani/etyyliasettaatti 3/1) (öljy).
- 25 d) 4(S)-tert-butoksikarbonyyliamino-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyyliamino)-5-fenyyli-pentaanihappo (kaava II)
- 30 9 g 4(S)-tert-butoksikarbonyyliamino-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyyliamino)-5-fenyyli-pentaanihappoetyyliesteriä liuotetaan 300 ml tetrahydrofuraania ja 22 ml 1 N vesipitoista natriumhydroksidiliuosta lisätään. Reaktioseosta sekoitetaan 16 tuntia huoneen lämpötilassa ja laimennetaan 300 ml vettä. Tetrahydrofuraani haihdutetaan pois ja vesiliuos pestään etyyliasetaatilla. Happamaksi tekeminen 1 N HCl
- 35

johtaa valkoiseen sakkaan, joka suodatetaan pois ja kuivataan (m.p. 203 - 206°C).

Esimerkki 2: 4(S)-(bentsyylioksikarbonyyli-L-tert-leu-
sinoyyli)amino-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyy-
 5 liamino)-5-fenyyli-pantaanihappo-1(S)-amino-2(R)-hyd-
roksi-indaani-amidi (menetelmämuunnos b)

[A = L-tLeu; B = sidos; R₁ = Z; R₂ = Bz; R₃ = OMe; R₄ = 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli]

360 mg N-metyylimorfoliinia lisätään liuok-
 10 seen, jossa on 850 mg 4(S)-amino-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-
 metoksibentsyyliamino)-5-fenyyli-pentaanihappo-1(S)-
 amino-2(R)-hydroksi-indaani-amididihydrokloridia (esi-
 merkin 3 yhdiste) 20 ml:ssa dimetyyliformamidia. Lisä-
 tään 480 mg N-bentsyylioksikarbonyyli-L-tert-leusiinia,
 15 290 mg 3,4-dihydro-3-hydroksi-4-okso-1,2,3-bentsotriat-
 siinia ja 340 mg N-etyyli-N'-(3-dimetyyliaminopropyy-
 li)karbodi-imidihydrokloridia ja liuosta sekoitetaan 3
 vuorokautta huoneen lämpötilassa. Liuotin haihdutetaan
 pois, lisätään etyyliasetaattia, seosta pestään 1 N
 20 HCl, tyydytetyllä NaHCO₃-liuoksella ja tyydytetyllä
 suolaliuoksella. Orgaaninen kerros kuivataan, liuotin
 haihdutetaan ja jäännös erotetaan kromatografisesti
 silikageelillä (liuotin: sykloheksaani/etyyyliasetaatti
 1/2) Saadaan otsikossa mainittu yhdiste [m.p. 146-
 25 148°C eetteristä; $[\alpha]_D^{20} = -28.9^\circ (c = 1, CH_3OH)$; m.p.
 hydrokloridi: 128 - 134°C eetteristä; $[\alpha]_D^{20} = -16.8^\circ (c$
 $= 1, CH_3OH)$].

Esimerkki 3: 4(S)-amino-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksi-
bentsyyliamino)-5-fenyyli-pantaanihappo-1(S)-amino-
 30 2(R)-hydroksi-indaani-amidi (suojauspoisto)

[A, B = sidos; R₁ = H; R₂ = Bz; R₃ = OMe; R₄ =
 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli]

6 g 4(S)-tert-butoksikarbonyyliamino-3(S)-
 hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyyliamino)-5-fenyyli-pen-
 35 taanihappo-1(S)-amino-2(R)-hydroksi-indaaniamidi (esi-
 merkin 1 yhdiste) liuotetaan seokseen, jossa on 20 ml
 dikloorimetaania ja 4 ml metanolia. 300 ml 3 N HCl-li-

uosta dietyylieetterissä lisätään ja seosta sekoitetaan 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Valkoinen sakka suodataan pois, pestään dietyylieetterillä ja kuivataan vakuumissa. Saatu yhdiste on dihydrokloridisuolan muodossa (m.p. 147 - 151°C).

Esimerkki 4: N-{4(S)-[(-bentsyylioksikarbonyyli-tert-leusinooyyli)amino]-3-(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyyliamino)-5-fenyyli}pentanoyyli-L-valiini-N-[(2-hydroksi-4-metoksi)bentsyyli]amidi (suojaus)

10 [A = L-tLeu; B = L-Val; R₁ = Z; R₂ = Bz; R₃ = OMe; R₄ = 2-OH,4-OMe-Bz]

182 mg 4(S)-[(N-(L-tert-leusinooyyli)amino)-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyyliamino)-5-fenyyli]pentanoyyli-L-valiini-N-[(2-hydroksi-4-metoksi)bentsyyli]amidi (esimerkin 30 yhdiste) liuotetaan 20 ml dimetyyliformamidia. 34 µl trietyyliaminia ja 62,3 mg N-(bentsyylioksikarbonyylioksi)-sukkiini-imidia lisätään ja seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 3 vuorokautta. Liuotin haihdutetaan pois ja jäännös erotetaan kromatografisesti silikageelillä (liuotin: etyyliasetaatti/metanoli 98/2). Saadaan otsikossa mainittu yhdiste (m.p. 82 - 89°C).

Seuraavat keksinnön mukaiset lisäesimekkejä esitettävällä tavalla:

Esim.						menetelmä	
no.	R ₁	A	R ₃	B	R ₄	muunnos	m.p.
A)	$\frac{R_2}{R_2} = \text{Bz:}$						
5	BOC	sidos	OMe	sidos	(S)-CH(Phe)CH ₂ OH	a)	b 65 - 68°C
6	BOC	sidos	O(CH ₂) ₂ OH	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	a)	b 77 - 82°C
7	BOC	sidos	OEt	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	a)	b 65 - 69°C
8	BOC	sidos	Br	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	a)	b 186 - 189°C
9	BOC	sidos	Cl	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	a)	b 180 - 183°C
10	BOC	L-tLeu	OMe	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	a)	b 180 - 195°C
11	BOC	L-tLeu	OMe	L-Val	2-OH, 4-OMe-Bz	a)	b 85 - 92°C
12	BOC	L-tLeu	OMe	L-Val	2-OH-Bz	a)	b 83 - 92°C
13	Z	L-tLeu	OMe	sidos	(S)-CH(Phe)CH ₂ OH	b)	b 143 - 147°C
14	Z	L-tLeu	O(CH ₂) ₂ OH	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	b)	b 109 - 113°C
15	Z	L-tLeu	OEt	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	b)	b 104 - 109°C
16	Z	L-tLeu	Cl	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	b)	b 134 - 136°C
17	Z	L-tLeu	Br	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	b)	b 148 - 151°C
18	Z	L-Val	OMe	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	b)	b 81 - 91°C
19	H	L-Val ¹⁾	OMe	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	b)	b 70 - 76°C
20	H	L-tLeu ²⁾	OMe	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	b)	b 88 - 95°C
21	H	L-tLeu ²⁾	OMe	L-Val	2-OH, 4-OMe-Bz	b)	b 95 - 98°C
22	Z	L-Val	OMe	L-Val	2-OH, 4-OMe-Bz	b)	b 78 - 82°C
23	H	sidos	OMe	sidos	(S)-CH(Phe)CH ₂ OH	depr.	dch 134 - 136°C
24	H	sidos	O(CH ₂) ₂ OH	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	depr.	
25	H	sidos	OEt	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	depr.	
26	H	L-Val	OMe	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	depr.	dch 185 - 190°C
27	H	sidos	Br	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	depr.	dch 151 - 156°C
28	H	sidos	Cl	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	depr.	dch 160 - 164°C
29	H	L-tLeu	OMe	sidos	2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli	depr.	dch 185 - 190°C
30	H	L-tLeu	OMe	L-Val	2-, 4-OMe-Bz	depr.	dch 178 - 181°C
31	H	L-tLeu	OMe	L-Val	2-OH-Bz	depr.	dch R _f = 0.1 ⁸⁾
32	Z	L-tLeu	OMe	L-Val	2-OH-Bz	prot.	b 73 - 80°C

Esim. no.	R ₁	A	R ₃	Menetelmä muunnos	m.p.
B)	R ₂ = Bz; B = sidos; R ₄ = 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli:				
33	imidatso[1,2-a]pyrimidiini-2-yyli-CO-	L-tLeu	OMe	b)	104 ~ 110°C
34	(2,4-di-OMe-Phe)-NHCO-	L-tLeu	OMe	b)	102 ~ 105°C
35	2-(bentsimidatsoli-2-yyli)etyyli-CO-	L-tLeu	OMe	b)	130 ~ 134°C
36	iBu-OCO-	sidos	OMe	b)	123 ~ 125°C
37	imidatso[1,2-a]tetrahydropyrimidiini-2-yyli-CO-	L-tLeu	OMe	b)	118 ~ 125°C
38	imidatso[1,2-a]pyrimidiini-2-yyli-CO-	L-tLeu	OMe	b)	110 ~ 120°C
39	H	1-tLeu ³⁾	OMe	b)	90 ~ 95°C
40	H	L-tLeu ⁴⁾	OMe	b)	95 ~ 108°C
41	Z	L-Val	OEt	b)	138 ~ 140°C
42	Z	L-Val	O(CH ₂) ₂ OH	b)	86 ~ 87°C
43	Z	L-iLeu	OMe	b)	112 ~ 115°C
44	Z	L-(O-tBu)Asp	OMe	b)	70 ~ 75°C
45	Z	L-Asp	OMe	b); depr.	111 ~ 114°C
46	Z	L-Asn	OMe	b)	158 ~ 162°C
47 ⁵⁾	BOC	cis-1-aminosyklopent-2-yylico-	OMe	b)	79 ~ 82°C
48 ⁶⁾	BOC	cis-1-aminosyklopent-2-yylico-	OMe	b)	70 ~ 78°C
49 ⁵⁾	BOC	cis-1-aminosykloheks-2-yylico-	OMe	b)	78 ~ 86°C
50 ⁶⁾	BOC	cis-1-aminosykloheks-2-yylico-	OMe	b)	82 ~ 93°C
51 ⁵⁾	H	cis-1-aminosykloheks-2-yylico-	OMe	depr.	103 ~ 107°C
52 ⁶⁾	H	cis-1-aminosykloheks-2-yylico-	OMe	depr.	128 ~ 138°C
53 ⁵⁾	H	cis-1-aminosyklopent-2-yylico-	OMe	depr.	98 ~ 102°C
54 ⁶⁾	H	cis-1-aminosyklopent-2-yylico-	OMe	depr.	115 ~ 120°C

Esim. no.	R ₁	A	R ₃	Menetelmä	
				muunnos	m.p.
55 ⁵⁾	H	cis-1-aminosyklopent-2-yyliCO- ²⁾	OMe	b)	b 75 - 83°C
56 ⁶⁾	H	cis-1-aminosyklopent-2-yyliCO- ²⁾	OMe	b)	c 83 - 90°C
57	(2-OH, 4-OMe-Phe)-NHCO-	L-Val	OMe	b)	b 95 - 105°C
58	BOC	sidos	Me	a)	b 71 - 73°C
59	H	sidos	Me	depr.	dch 145 - 151°C
60	Z	L-tLeu	Me	b)	b 88 - 93°C
61	H	L-Val ⁷⁾	OMe	b)	b 106 - 109°C
1) substituoitu N-atomissa (2-pyridyylimetyyli)N(CH ₃)CO-:lla 2) substituoitu N-atomissa (5-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-2-yyli)SCH ₂ CO-:lla 3) substituoitu N-atomissa (bentstiatsoli-2-yyli)SCH ₂ CO:lla 4) substituoitu N-atomissa (1-metyyli-1,3,4-triatsoli-2-yyli)SCH ₂ CO-:lla 5) isomeeri A suhteessa sykloalkyykirenkaan konfiguraatioon 6) isomeeri B suhteessa sykloalkyykirenkaan konfiguraatioon 7) substituoitu N-atomissa (bentsimidatsoli-2-yylimetyyli)N(CH ₃)CO-:lla 8) tolueni/etyyliasetatissa 1/2					

Muita välituotteitaA) Yhdisteitä, joilla on kaava II

- Analogisesti niin kuin esimerkissä 1 on esitetty voidaan valmistaa seuraavia kaavan II mukaisia
- 5 yhdisteitä, joissa $R_2 = Bz$ ja R_1, A , ja vast. R_3 ovat:
- BOC, sidos ja 2-hydroksietoksi (m.p. 218 - 221°C);
 - BOC, sidos ja etoksi (m.p. 191 - 194°C);
 - BOC, L-tLeu ja OMe (m.p. 124 - 125°C)
 - BOC, sidos ja Br (m.p. 214 - 217°C);
 - 10 - BOC, sidos ja Cl (m.p. 111 - 115°C).

B) BOC-L-tert-leucinoyyli-L-phenyylialaninoli

- 25 g tert-butyylisikarbonyyli-L-tert-leu-
siiniä liuotetaan 250 ml kuivaa dimetyyliformamidia,
lisätään 16.36 g fenyylialaninolia, 14.62 g hydroksi-
15 bentsotriatsolia ja 24.9 g N-etyyli-N'-(3-dimetyy-
liaminopropyyli)karbodi-imidihydrokloridia. Seosta
sekoitetaan yksi vuorokausi. Sakka suodatetaan pois,
pestään huolellisesti etyyliasetaatilla ja kuivataan
vakuumissa (m.p. 198 - 201°C).

20 C) L-valiini-[(2-hydroksi-4-metoksi)bentsyyliamidia) 2-hydroksi-4-metoksi-bentsaldehydioksimi

- 10 g 2-hydroksi-4-metoksi-bentsaldehydia liuo-
tetaan 200 ml etanolia. Lisätään 6.9 g hydroksyy-
liaminihydrokloridia ja 13.7 ml trietyyliamiinia ja
25 seosta sekoitetaan 5 tuntia huoneen lämpötilassa. Liuo-
tin haihdutetaan pois ja jäännös liuotetaan etyy-
liasetaattiin ja orgaaninen kerros pestään $NaHCO_3$ -liuok-
sella ja vedellä. $MgSO_4$ kuivatuksen jälkeen liuotin
haihdutetaan pois ja jäännöstä käytetään ilman lisäpuh-
30 distusta seuraavaan vaiheeseen.

b) 2-hydroksi-4-metoksi-bentsyyliamiini

- 11.1 g 2-hydroksi-4-metoksi-bentsaldehydioksi-
mia liuotetaan 400 ml metanolia, jossa on 40 ml muura-
haishappoa. 1 g palladiumia hiilessä lisätään ja liuos-
35 ta hydrataan 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Suodatuksen
jälkeen, liuotin haihdutetaan pois ja jäännös erotetaan
kromatografisesti silikageelillä (liuotin: etyyliase-

taatti/metanoli 5/1 + 2 % NH_3 -liuosta) saadaan öljy:

^1H -NMR(DMSO): 3.67 (s, 3H); 3.78 (bs, 2H); 4.70 (bs, 1H, vaihtuva); 6.25 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H); 6,30 (s, 1H); 6.95 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H).

5 c) N-tert-butylioksikarbonyyli-L-valiini[(2-hydroksi-4-metoksi)bentsyyli]amidi

306 mg 2-hydroksi-4-metoksi-bentsyyliaminia lisätään liuokseen, jossa on 676 mg tert-butylioksikarbonyyli-L-valiini-p-nitrofenyyliesteriä 10 ml dime-
 10 tyyliformamidia argonkaasu atmosfäärissä. Reaktioseosta sekoitetaan 2 vuorokautta huoneen lämpötilassa. Liuot-
 timen pois haihduttamisen jälkeen jäännös liuotetaan etyyliasetaattiin ja pestään 0.1 N NaOH-liuoksella, vedellä ja tyydytetyllä suolaliuoksella. Orgaaninen
 15 kerros kuivataan MgSO_4 :lla, liuotin haihdutetaan pois ja jäännös erotetaan kromatografisesti silikageelilla (liuotin:tolueni/etyylasetaatti 2/1) Saaliina saatu tuote on kiinteä aine (m.p. 41 - 45°C).

d) L-valiini[(2-hydroksi-4-metoksi)bentsyyli]amidi

20 Liuos, jossa on 400 mg N-tert-butylioksikarbonyyli-L-valiini[(2-hydroksi-4-metoksi)bentsyyli]amidia ja 1.5 ml trifluorietikkahappoa 10 ml:ssa dikloorimetaania sekoitetaan 5 tuntia huoneen lämpötilassa. Dikloorimetaani poistetaan, jäännös liuotetaan etyy-
 25 liasetaattiin ja pestään useita kertoja 5 % NaHCO_3 -liuoksella ja sitten tyydytetyllä suolaliuoksella. Orgaaninen kerros kuivataan MgSO_4 :lla liuotin haihdutetaan pois ja saaliina saatu aine on öljy:

^1H -NMR(CDCl_3): 0.80 (d, $J=10\text{Hz}$, 3H); 1.00 (d, $J=10\text{Hz}$, 3H); 2.25-2.40 (m, 1H); 3.23 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H); 3.76 (s, 3H); 4.20-4.40 (m, 2H); 6.37 (dd, $J=2.6\text{Hz}$, $J=8.3\text{Hz}$, 1H); 6.50 (d, $J=2.6\text{Hz}$, 1H); 6.98 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H); 8.24 (bs, 1H).

35 D) L-valiini[(2-hydroksi)bentsyyli]amidi

Saadaan analogisesti niin kuin kohdassa C) on esitetty öljyn muodossa:

$^1\text{H-NMR}$: δ =0.79 (d, 3H); 1.00 (d, 3H); 2.37 (dsep, 1H); 3.30 (d, 1H); 4.20-4.41 (m, 2H); 6.81 (t, 1H); 7.08 (d, 1H); 7.20 (d, 1H); 8.22 (bs, 1H).

Kaavan I mukaiset yhdisteet vapaassa muodossa tai farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan muodossa esim. happoadditiosuolan muodossa, joita seuraavassa nimitetään lyhyesti "keksinnön mukaisia aineita", omaavat mielenkiintoisia farmaseuttisia ominaisuuksia. Niitä esitetään siksi käytettäväksi lääkkeinä. Erityisesti ne osoittavat antiviruksen vaikutusta, erityisesti HIV-proteinaasia estävää vaikutusta, jolloin ne omaavat vain matalan tai ei olemassa olevan estävän vaikutuksen ihmisen proteinaaseja, kuten esim. reniiniä tai pepsiiniä, vastaan. Lisäksi niillä on voimakas oraallinen biosoveltuvuus verrattuna tavallisiin peptidisiin anti-HIV proteinaasiaineisiin. Niiden tehokkuus voidaan esittää seuraavilla kokeilla:

1. Peptidikokeen jakautuminen HIV-proteinaasilla

HIV-proteinaasin estyminen mitataan niin kuin kirjallisuudessa on esitetty julkaisuissa: A. Richards et al., J. Biol. Chem. **265**, 7733 - 7736 (1990) ja L. H. Philip et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **171**, 439 - 444 (1990). Lyhyesti sanottuna peptidiä H-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Nph-Glu-Ala-Nle-NH₂ (jossa Nph on p-nitrofenyyllialaniini ja Nle on norleusiini) käytetään substraattina rekombinantti HIV-1- ja HIV-2-proteinaasille. Jakautuminen tapahtuu Leu- ja Nph-tähteiden välillä. Reaktiota voidaan seurata spektrofotometrisesti ekstinktion pienenemisenä 300 nm kohdalla joka havaitaan jakautumisessa.

Tässä kokeessa keksinnön mukaiset aineet osoittavat K_1 -arvoja, jotka HIV-1-proteinaasilla ovat välillä n. 3 nM - n. 1 μM ja HIV-2-proteinaasilla välillä n. 8 nM - n. 10 μM .

2. Solukoe

HIV-1 (HTLV III_g)-indusoidun sytopaattisen tehon estyminen mitataan MT4-soluissa niin kuin kirjal-

lisuudessa julkaisussa (R. Pauweis et al., J. Virol. Meth. 20 309 - 321 [1988]) on esitetty. Lyhyesti sanotuna HTLV-1 transformoitu T4 solulinja, MT4; joka aikaisemmin on osoitettu olevan hyvin salliva HIV infektiolle, toimii maalisolulinjana. HIV-indusoidun sytopaattisen tehon estyminen käytetään loppupisteenä. Sekä HIV- että valeinfektoitujen solujen elinvoimaisuus määrätään spektrofotometrisesti 3-(4,5-dimetyylitiatso-
li-2-yyli)-2,5-difenyyli-tetratsoliumbromidin (MTT) in situ reduktion kautta. Vertaamalla aineen eri pitoisuuksien vaikutuksia HIV- vastaan vale-infektoituihin soluihin voidaan sytotoksiset (TC_{50}) ja virus-estävät (IC_{50}) pitoisuudet määrittää.

Tässä kokeessa keksinnön mukaiset aineet
15 osoittavat IC₅₀-arvoja, jotka ovat n. 10 nM - 1 μM.

3. Oraalinen biosoveltuvuus koe hiirillä

Niin kuin kirjallisuudesta tiedetään peptideihin perustuvilla lääkkeillä on luonteenomaisesti huono oraallinen biosoveltuvuus. Koska HIV potilaille osataan odottaa pitkäaikainen proteinaasilääkitys, on tärkeätä, että tehokas lääke on oraalisesti biosoveltuva. Tämä on ollut tärkeimpänä esteenä tehokkaiden lääkkeiden kehitykselle tässä peptidirakenneluokassa. Yllättävästi keksinnön mukaiset aineet osoittavat oivallisen biosoveltuvuuden suun kautta annetun annostuksen jälkeen. Tämä voidaan osoittaa seuraavalla kokeella:

Suun kautta tapahtuvaa annostusta varten valmistetaan liuos koeaineesta (25 mg/ml) sopivaan liuottimeen kuten esim. Cremophor RH40^R/Maisine^R/propyleeniglykoli/etanoli (38/32/15/15). Naaras Balb/c hiirien annettaan paastoa 24 tuntia ennen kokeen aloittamista ja kokeen aikana vettä annetaan mieltymyksen mukaisesti. Eri aikoina lääkkeen antamisen jälkeen otetaan verikokeita uhraamalla eläimet anestesiassa leikkaamalla niiden kaulalaskimo, josta seuraa kaulan sijoiltaan meno. Näytteet kerättään heparinisoituihin putkiin (tyyppillisesti 0.4 - 0.6 ml). Näytteiden analysoimiseen

käytettään kiinteää faasiuuttamista ja HPLC:aa. Näytteissä oleva lääkepitoisuus lasketaan pienimmän neliösumman lineaarinen regressioanalyysin avulla piikitetyn veren standardien piikin pinta-alan suhde (estäjä/sisäinen standardi) vastaan pitoisuus. Pitoisuus vastaan aikatiedot lasketaan trapetsisäännön mukaisesti "pinta-ala käyrän alla" (AUC) arvo.

Tässä kokeessa keksinnön mukaiset aineet osoittivat AUC-arvoja aina n. 25 $\mu\text{M.h}$ - n. 160 $\mu\text{M.h}$ 125 mg/kg annoksella.

Keksinnön mukaiset aineet on siis indikoitu käytettäväksi lääkeaineina, erityisesti anti-HIV-protei-naasi aineina, esim. retroviirusinfektioiden ennakotorjuntaan ja hoitoon. Tällaista käyttöä varten tehokasta annosta tulee tietysti vaihdella riippuen tietystä käytetystä aineesta, antotavasta ja toivotusta hoidosta. Yleisesti saadaan kuitenkin riittävä tulos kun ainetta annetaan päivittäisenä annoksena, joka on n. 0.02 mg/kg - n. 50 mg/kg eläimen ruuminpainoa, sopivasti jaettuna annoksiin, joita annetaan päivittäin kahdesta neljään annosta. Päivittäinen kokonaisannos on n. 1 mg - n. 3500 mg, edullisesti n. 10 mg - n. 2000 mg, edullisemmin n. 500 mg - n. 1500 mg, sopivimmin n. 600 mg annettuna kerran tai kahdesti päivässä.

Aineet voidaan antaa samalla tavalla kuin tämänlaisissa indikaatioissa käytettyjä tunnettuja standardeja. Vaikuttaa todennäköiseltä, että metaboli-soituminen tapahtuu tunnettujen mallien mukaisesti rakenteellisesti läheisesti yhteen kuuluvien yhdisteiden esim. keksinnön mukaisten aineiden, jossa R_4 on 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyli, mukaisesti alkaen 3-tai 4-asemassa olevan indanyyliosan hydroksylaatiolla.

Esimerkin 2 mukainen aine, se on 4(S)-(bentsyylioksikarbonyyli-L-tert-leusinyyli)amino-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyyliamino)-5-fenyyli-pentaanihappo-1(S)-amino-2(R)-hydroksi-indaani-amidi vapaassa muodossa tai farmaseuttisesti hyväksyttävän suo-

lan muodossa on keksinnön mukainen edullinen aine anti-HIV-proteinaasi aineeksi. Se estää HIV-1 proteinaasin $K_1 = 9.5 \text{ nM}$ ja HIV-2 proteinaasin $K_1 = 50 \text{ nM}$, ja lisäksi sillä on erinomainen imeytyminen suun kautta otettuna.

- 5 Se on spesifinen retrovirusentsymeille koska se ei estä endogeeniä proteinaasia kuten renini ja kathepsiini D. Solukokeessa sillä on IC_{50} , joka on $0.25 \mu\text{M}$. On esitetty, että tällä anti-HIV indikaatiolla tämä aine voidaan antaa samanlaisina annostus muotoina, samanlaisina tai pienempinä annoksina kuin tavallisesti käytettyjä, joilla on tunnettuja standardeja tällaisia indikaatioita varten.

- Aineet voidaan sekoittaa tavallisiin kemoterapeuttisesti hyväksyttäviin laimennusaineisiin ja kantajiin ja antaa esim. parenteraalisesti tai suoraan suoneen, edullisesti suun kautta, sellaisina muotoina kuin tabletteina tai kapselsina. Vaikuttavan aineen pitoisuutta voidaan tietysti vaihdella riippuen esim. käytettävästä aineesta, toivotusta hoidosta ja muodon luonteesta.

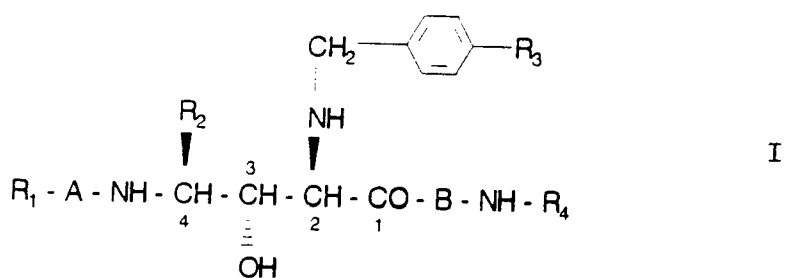
- Keksintö koskee lisäksi menetelmää lääkkeen valmistamiseksi, erityisesti lääkkeen retrovirus tauteja vastaan, johon kuuluu keksinnön mukaisen aineen sekoittaminen yhteen ainakin yhden farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimennusaineen kanssa ja sellaisen aineen käyttö lääkkeen valmistuksessa, erityisesti lääkkeen retrovirus tauteja vastaan.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi

5

10



jossa

A ja B toisistaan riippumatta tarkoittavat sidosta tai valinnaisesti substituoitua aminoasyyliosaa;

15 R_1 tarkoittaa vetyä; aminoa suojaavaa ryhmää; tai ryhmää, jolla on kaava R_5Y , jossa

R_5 tarkoittaa vetyä tai valinnaisesti substituoitua alkyyli-, alkenyyli-, alkinyyli-, aryyli-, aryylialkyyli-, heteroaryyli-, heteroaryylialkyyli-, heterosyklyyli- tai heterosyklyylialkyyli-ryhmää; ja Y tarkoittaa $-\text{CO}-$; $-\text{NHCO}-$; $-\text{NHCS}-$; $-\text{SO}_2-$; $-\text{O}-\text{CO}-$; tai $-\text{O}-\text{CS}-$;

20 R_2 tarkoittaa luonnollisen aminohapon sivuketjua; alkyyli-, aryylialkyyli-, heteroaryylialkyyli-, tai sykloalkyylialkyyli-ryhmää; tai trimetyylisilyylimetyyliä, 2-tienyyylimetyyliä tai styryylimetyyliä;

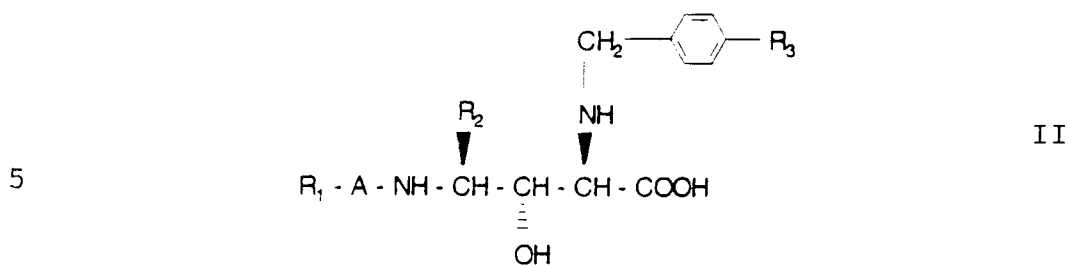
R_3 tarkoittaa halogeenia, alkyyliä, alkoksia tai hydroksialkoksia; ja

30 R_4 tarkoittaa 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyliä; (S)-2-hydroksi-1-fenyylietyyliä; tai 2-hydroksibentsyyliä, joka asemassa 4 on valinnaisesti substituoitu metoksilla:

vapaassa muodossa tai suolan muodossa;

35 johon kuuluu

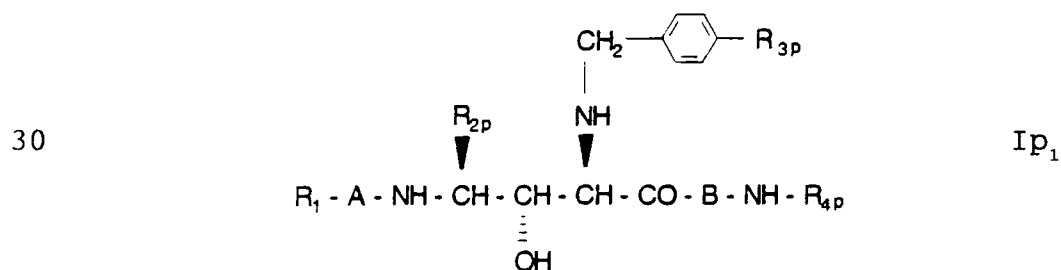
a) yhdisteen, jolla on kaava II



10 jossa substituentit ovat samoja kuin edellä määritetyt, reagoiminen yhdisteen kanssa, jolla on kaava $\text{H}-\text{B}-\text{NH}-\text{R}_4$, jossa B ja R_4 ovat samoja kuin edellä määritetyt tai

b) yhdisteen, jolla on kaava I, jossa R_1 on joku muu kuin vety tai $\text{HY}-$, valmistamista varten vastaavan
 15 yhdisteen I, jolla on kaava I, jossa R_1 on vety tai $\text{HY}-$, substituoiminen tarkoituksenmukaisesti, ja siellä, missä esitetty tuloksena saadun kaavan I mukaisen suojatussa muodossa olevan yhdisteen suojan poistaminen, tai tuloksena saadun kaavan I mukaisen
 20 suojaamattomassa muodossa olevan yhdisteen tarkoituksenmukaisen suojaaminen, ja tuloksena saadun kaavan I mukaisen yhdisteen talteen ottaminen vapaassa muodossa tai suolan muodossa.

25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä yhdisteen, jolla on kaava Ip_1 valmistamiseksi



jossa

35 R_{2p} tarkoittaa samaa kuin R_2 patenttivaatimuksessa 1 sillä ehdolla, että sykloalkyylialkyyli tarkoittaa sykloheksyylialkyyliä,

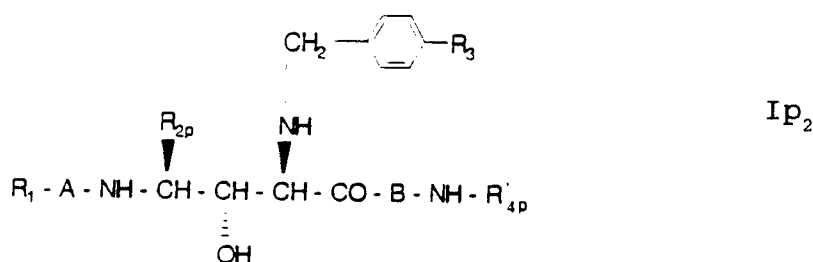
R_{3p} tarkoittaa alkoksia tai hydroksialkoksia.

R_{4p} tarkoittaa 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyliä tai (S)-2-hydroksi-1-fenyylietyyliä; ja jäljelle jäävät substituentit tarkoittavat samaa kuin on määritetty patenttivaatimuksessa 1,

vapaassa muodossa tai suolan muodossa.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä yhdisteen, jolla on kaava Ip_2 valmistamiseksi

10



15

jossa

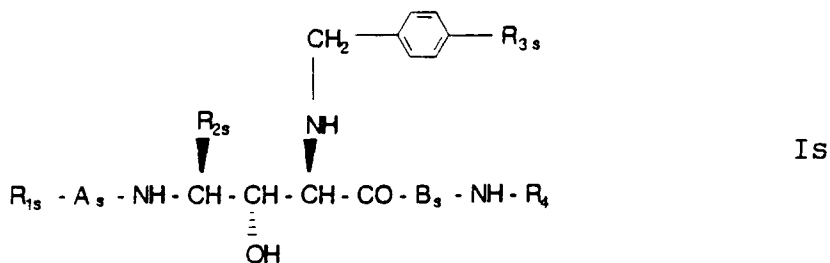
R'_{4p} tarkoittaa 2(R)-hydroksi-indaani-1(S)-yyliä; (S)-2-hydroksi-1-fenyylietyyliä; tai 2-hydroksi-4-metoksibentsyyliä; ja

20

jäljelle jäävät substituentit tarkoittavat samaa kuin patenttivaatimuksessa 1 on määritetty, vapaassa muodossa tai suolan muodossa.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä yhdisteen, jolla on kaava Is valmistamiseksi

25



30

jossa

35 A_s tarkoittaa sidosta, L-tert-leusinooyyliä, joka valinnaisesti on substituoitu typpi-atomeissa (5-metyyli-1,3,4-tiadiatsoli-2-yyli)- $\text{SCH}_2\text{CO}-$), (bentstiatso-

- li-2-yyli)SCH₂CO- tai (1-metyyli-1,3,4-triatsoli-2-yyli)SCH₂CO-; L-valinoyyli valinnaisesti substioitu typpiatomissa (2-pyridyylimetyyli)N(metyyli)-CO- tai (bentsimidatsoli-2-yylimetyyli)N(metyyli)-CO;
- 5 L-isoleusinoyyli; L-aspartyyli valinnaisesti substituoitu vapaassa karboksyyliosassa alkyyllilla, jossa on 1 - 4 hiiliatomia; L-asparaginoyyli; tai cis-1-aminosyklopent-2-yylikarbonyyli tai cis-1-aminosykloheks-2-yylikarbonyyli osa valinnaisesti
- 10 substituoitu typpiatomissa (5-metyyli-1,3,4-tia-diatsoli-2-yyli)SCH₂CO-:
- B_s tarkoittaa sidosta tai L-valinoyyliä;
- R_{1s} tarkoittaa vetyä; tert-butoksikarbonyyliä tai bentsyylioksikarbonyyliä; tai ryhmää, jolla on kaava
- 15 R_{5s}Y_s- jossa
- R_{5s} tarkoittaa isobutyyliä, 2-hydroksi-4-metoksi-fenyliä, imidatso[1,2-a]pyrimidiini-2-yyliä, imidatso[1,2-a]tetrahydropyrimidiini-2-yyliä, imidatso[1,2-a]pyrimidiini-2-yylimetyyliä, tai
- 20 2-(bentsimidatsoli-2-yyli)etyyliä;
- Y_s tarkoittaa -CO-; -NHCO-; tai -O-CO-;
- R_{2s} tarkoittaa bentsyyliä;
- R_{3s} tarkoittaa klooria, bromia, metyyliä, metoksia, etoksia, tai 2-hydroksietoksia; ja
- 25 R_{4s} tarkoittaa samaa kuin patenttivaatimuksessa 1, vapaassa muodossa tai suolan muodossa.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä 4-(S)-(bentsyylioksikarbonyyli-L-tert-leusinoyyli)amino-3(S)-hydroksi-2(R)-(4-metoksibentsyyli-amino)-5-fenyyli-pentaanin hapon 1(S)-amino-2(R)-hydroksi-indaaniamidin valmistamiseksi, vapaassa muodossa tai suolan muodossa.
- 30 6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen yhdiste, jolla on kaava I vapaassa muodossa tai suolan muodossa, aina kun se valmistetaan patenttivaatimuksen
- 35 1 mukaisen menetelmän mukaisesti.
7. Menetelmä lääkkeen valmistamista varten retrovirustauteja vastaan, johon kuuluu kaavan I mukai-

sen vapaassa muodossa tai farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan muodossa olevan yhdisteen sekoittaminen yhteen ainakin yhden farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimennusaineen kanssa.