

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036732**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.14

(51) Int. Cl. **C07K 5/097** (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)

(21) Номер заявки
201891184

(22) Дата подачи заявки
2016.11.15

(54) ИНГИБИТОРЫ ЖЕЛАТИНАЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **15382567.4**

(32) **2015.11.16**

(33) **EP**

(43) **2018.11.30**

(86) **PCT/EP2016/077632**

(87) **WO 2017/085034 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИПРОТЕОС С.Л (ES)

(72) Изобретатель:
**Прадес Косано Рохер, Секо Морал
Хесус, Тарраго Клуа Мария Тереза
(ES)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EP-A1-0345359
WO-A1-9815525
ODAKE S. ET AL.: "VERTEBRATE
COLLAGENASE INHIBITOR. I. TRIPEPTIDYL
HYDROXAMIC ACIDS" CHEMICAL AND
PHARMACEUTICAL BULLETIN,
PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, JP,
vol. 38, no. 4, 1 April 1990 (1990-04-01), pages
1007-1011, XP008041883, ISSN: 0009-2363, the
whole document, table I

WO-A2-9222523
SERRA P. ET AL.: "MMP-2 selectivity
in hydroxamate-type inhibitors", CURRENT
MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 19, no. 7, 1 January
2012 (2012-01-01), pages 1036-1064, XP009189849,
ISSN: 1875-533X, the whole document

WHITTAKER M. ET AL.: "DESIGN
AND THERAPEUTIC APPLICATION OF
MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS",
CHEMICAL REVIEWS, AMERICAN CHEMICAL
SOCIETY, US, vol. 99, 8 September 1999
(1999-09-08), pages 2735-2776, XP002370773,
ISSN: 0009-2665, DOI: 10.1021/CR9804543, the
whole document

SWARNAKAR SNEHASIKTA ET AL.: "The
gelatinases and their inhibitors: the structure-activity
relationships", MATRIX METALLOPROTEINASE
INHIBITORS,, vol. 103, 1 January 2012
(2012-01-01), pages 57-82, XP009189848, ISSN:
1023-294X, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к ингибиторам желатиназы, к способам их получения, к фармацевтическим композициям, содержащим их, и к их применению в терапии и/или профилактике состояний, где ингибирование желатиназ является эффективным, например эпилепсии, шизофрении, болезни Альцгеймера, аутизма (в частности, связанного с синдромом ломкой X хромосомы), умственной отсталости, расстройств настроения, таких как биполярные расстройства, депрессии, сосудистых заболеваний, таких как ишемический инсульт и атеросклероз, воспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и воспалительное заболевание кишечника, лекарственной зависимости, нейропатической боли, заболеваний легких, таких как астма и хроническая обструктивная болезнь легких, злокачественных новообразований и сепсиса.

B1**036732****036732****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к ингибиторам желатиназы, к способам их получения, к фармацевтическим композициям, содержащим их, и к их применению в терапии и/или профилактике состояний, при которых целесообразно ингибирование желатиназ, таких как эпилепсия, шизофрения, болезнь Альцгеймера, аутизм (в частности, связанный с синдромом ломкой X хромосомы), умственная отсталость, расстройства настроения, такие как биполярные расстройства, депрессия, сосудистые заболевания, такие как ишемический инсульт и атеросклероз, воспалительные заболевания, такие как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и воспалительное заболевание кишечника, лекарственная зависимость, нейропатическая боль, заболевания легких, такие как астма и хроническая обструктивная болезнь легких, злокачественное новообразование и сепсис.

Уровень техники

Все больше сведений указывает на то, что внеклеточный матрикс (ЕСМ) действует не только в качестве опорной структуры, но и оказывает значительное влияние на развитие и регенерацию нейронов, синаптическую пластичность, возбудимость нейронов и гомеостатическую регуляцию активности нейрональной сети. Действительно, ЕСМ глубоко влияет на поведение сети, следовательно, на физиологические процессы, такие как когнитивные функции. Желатиназы относятся к семейству матриксинов (ММР), которые образованы цинк-зависимыми эндопептидазами, способными разрушать белки ЕСМ, и большим количеством не-ЕСМ белков, таких как факторы роста, цитокины, хемокины, рецепторы клеточной поверхности, ингибиторы сериновой протеиназы и другие ММР. ММР являются либо секретируемыми, либо мембранно-связанными протеазами и играют важную физиологическую роль в репродукции, росте, развитии, ангиогенезе, иммунном ответе, заживлении ран и физиологии мозга. Повышенная экспрессия ММР, в частности, желатиназы (ММР-2 или желатиназы А и ММР-9 или желатиназы В) имеет место при ряде патологических состояний, включая прогрессирование опухоли, нейродегенерацию, инсульт, воспаление и вирусные инфекции.

Первоначальные исследования, касающиеся ММР-9 желатиназы в мозге, были сначала сфокусированы на его возможной роли в различных патологических состояниях с дегенеративным компонентом. Позже было отмечено, что ММР-9 играет важную роль в физиологии мозга, особенно в качестве ключевой молекулы синаптической пластичности. Эти результаты привели к исследованиям, продемонстрировавшим возможное участие ММР-9 в нейропсихиатрических состояниях, таких как эпилепсия, шизофрения, болезнь Альцгеймера, аутизм (в частности, связанный с синдромом ломкой X хромосомы), умственная отсталость, биполярные расстройства, расстройства настроения, такие как биполярные расстройства, депрессия и лекарственная зависимость.

Были описаны изменения в сигнальном пути глутамата, приводящие к aberrантной синаптической пластичности при шизофрении. Было показано, что ММР-9 регулирует глутаматные рецепторы и модулирует физиологическую и морфологическую синаптическую пластичность. Посредством полиморфизма функционального гена, чувствительности генов к антипсихотикам и уровням в плазме крови, ММР-9 недавно связали с шизофренией. Это заболевание предполагает нарушения восприятия и познания, кульминацией чего является триада положительных, отрицательных и когнитивных симптомов, которые, как полагают, отражают изменения в нейронных схемах, искажение синаптической связи и изменения дендритных шипов. Примечательно, что хромосомная область 20q11-13, в которой расположен ген ММР-9, активно изучалась с точки зрения психических расстройств и связана с шизофренией. ММР-9 влияет на функцию гиппокампа и префронтальной коры и является интересной молекулой-кандидатом, которая, возможно, связана с шизофренией, состоянием, при котором чаще всего обнаруживают патологические изменения в префронтальной коре головного мозга. Кроме того, некоторые из целевых белковых кандидатов, которые вовлечены в шизофрению, имеют функциональные связи с ММР-9 или с белками, взаимодействующими с ММР-9, такими как рецепторы нейротрофического фактора мозга (BDNF) и N-метил-D-аспартат (NMDA) среди прочих. Аномально повышенные уровни ММР-9 были обнаружены в плазме крови пациентов с шизофренией, о чем сообщалось несколькими авторами (Yamamori, H. et al., *Neurosci Lett.*, 2013, (556):37-41).

Все больше данных указывают на участие ММР в патогенезе эпилепсии. Это заболевание представляет собой расстройство мозга, характеризующееся устойчивой предрасположенностью к генерации эпилептических припадков и нейробиологическими, когнитивными, психологическими и социальными последствиями этого состояния. Было показано, что продолжительные судороги связаны с высокими уровнями ММР-9 в сыворотке крови. Что еще более важно, недавние исследования тканей головного мозга, полученные при хирургии эпилепсии, показали повышенную иммунореактивность ММР-9 при эпилептических пароксизмах при фокальной кортикальной дисплазии (Konopka, A. et al., *Epilepsy Res.*, 2013, (1-2):45-58) и туберозном склерозе (Li, S. et al., *Brain Res.*, 2012, (1453):46-55), а также при эпилептогенных кортикальных или гиппокампальных поражениях пациентов с эпилепсией височной доли без основных цитоархитектонических аномалий. Используя объективный метод антител на микрочипах, была обнаружена повышенная экспрессия ММР-1, -2, -3, -8, -10 и -13, в дополнение к ММР-9, в ткани у пациентов с фокальной кортикальной дисплазией (Konopka, A. et al., *Epilepsy Res.*, 2013, (1-2):45-58). Однако экспрессия этих протеиназ была не столь выраженной и/или не столь постоянной среди пациен-

тов, как экспрессия MMP-9. Среди этих других MMP особенно сильным было повышение активности MMP-2 у взрослых пациентов.

Расстройства аутистического спектра (ASD) идентифицируют по кластеру симптомов в трех основных областях: социальное взаимодействие, язык и диапазон интересов, но в большинстве случаев их этиология неизвестна. Синдром ломкой X хромосомы (FXS) является ведущей генетической причиной аутизма, так как у большого процента индивидуумов с FXS (46%) одновременно диагностируется ASD. Сообщалось о высокой активности MMP-9 в плазме крови у индивидуумов с FXS (Leigh, MJ et al., *J Dev Behav Pediatr*, 2013, (34): 1849-1857), тогда как повышенные количества белка MMP-9 были обнаружены в амниотической жидкости у матери с ASD (Abdallah, M. W. et al., *Autism Res*, 2012, (5): 428-433). Поэтому существует четкая связь между высокими уровнями MMP-9 и ADS.

MMP-9 также участвует в лекарственной зависимости, биполярном расстройстве и депрессии у человека. Одна связь была сделана на основании анализа полиморфизма гена MMP-9 при C(-1562)T, который является функциональным, так как приводит к более высокой или более низкой экспрессии MMP-9. Сообщалось, что зачастую на основании этого полиморфизма можно отличить здоровых индивидов от пациентов, страдающих либо биполярными расстройствами, либо шизофренией (Han, H. et al., *Psychiatry Res*, 2011, (190):163-164). Этот полиморфизм связан также с алкогольной зависимостью (Samochowiec A et al, *Brain Res*, 2010, 1327:103-6). Помимо этого было обнаружено, что полиморфизм гена MMP-9 модулирует когнитивную функцию префронтальной коры у мужчин с биполярным расстройством. Сообщалось о повышении уровней MMP-9 у молодых пациентов во время биполярной депрессии (Rybakowski, J.K., et al., *J Affect Disord*, 2013, (146):286-289). Высокие уровни MMP-9 в плазме крови были обнаружены при депрессии, эти уровни в сыворотке коррелируют с тяжестью депрессии (Yoshida, T. et al., *PLoS One*, 2012, (7):e42676).

Утверждалось также, что MMP-9 связан с дегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера (AD). Было показано, что MMP участвует в образовании и клиренсе пептидов A β при AD. Действительно, повышенные уровни MMP-9 наблюдались в ткани мозга и крови пациентов с AD, в частности в реактивных астроцитах, окружающих амилоидные бляшки, что дает возможность предположить локальную реакцию ткани на скопление бляшек. В ряде исследований было зафиксировано, что эта металлопротеиназа участвует в катаболизме A β *in vitro* и *in vivo*, и это единственный фермент, способный разрушать фибриллы A β *in vitro* и бляшки A β *in situ*. Кроме того, сообщалось, что MMP-9 участвует в опосредуемом рецептором высвобождении sAPP- α и проявляет подобную α -секретазе активность в мозге *in vivo* (Fragkouli, A., et al., *J Neurochem*, 2012, (121):239-251). Синтетические ингибиторы MMP-2/MMP-9 уменьшают опосредованную A β гибель нейронов в первичных культурах (Mizoguchi, H., et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, (331):14-22). В том же исследовании лечение GM6001 было нейропротективным при интрацеребровентрикулярном введении A β и улучшало когнитивную функцию у мышей. Кроме того, у мышей с нокаутом MMP-9 не было нарушений памяти, вызываемых инъекциями A β у мышей дикого типа.

Было также установлено, что MMP-9 участвует в процессах и болезненных состояниях, отличных от тех, которые связаны с синаптической пластичностью. Эти состояния включают сосудистые заболевания, болезни легких и воспалительные заболевания, а также злокачественные новообразования. В связи с этим MMP-9 и в меньшей степени MMP-2 были связаны с сосудистыми заболеваниями, такими как ишемический инсульт и атеросклероз, нейропатической болью, воспалительными заболеваниями, такими как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и воспалительное заболевание кишечника, рассеянным склерозом, сепсисом, злокачественными новообразованиями, заболеваниями легких, такими как астма и хроническая обструктивная болезнь легких.

Ишемический инсульт является следствием дефицита кровоснабжения (в результате местного тромбоза или артериальной эмболии), вызывающего снижение тканевой оксигенации и, как следствие, нарушение биоэнергетики, что может привести к гибели клеток как некротического, так и апоптотического характера. Восстановление кровообращения после временной гипоперфузии приводит к сильной воспалительной реакции, которая может усугубить поражение ткани. Накопление воспалительных клеток затем отвечает за высокие уровни активных форм кислорода и азота, а также провоспалительных цитокинов в ишемической ткани. Резкое увеличение MMP-9 на всех уровнях его экспрессии и активности является отличительной чертой последствий инсульта. MMP-9 участвует в таких событиях как долговременная пластичность, реорганизация сосудов и ангиогенез, иммунный ответ и воспаление, происходящих после инсульта. Было показано, что блокирование MMP, в частности MMP-9, включая мышей с нокаутом, защищает от ишемического инсульта и его последствий (Chaturvedi, M., et al., *Mol. Neurobiol.*, 2014, (49):563-573).

Лечение нейропатической боли, вызванной множественными повреждениями нервной системы, является клинической трудностью, так как основной механизм развития нейропатической боли остается плохо понятным. Однако в недавних исследованиях сообщается, что для возникновения нейропатической боли у крыс и мышей на ранних и поздних фазах повреждения нерва требуются разные MMP. После травмы спинного нерва MMP-9 демонстрирует быстрое и временное повышение активности в трав-

мированных дорзальных ганглиях (DRG), что соответствует невропатической боли на ранней фазе, тогда как MMP-2 показывает отложенную реакцию в клетках-сателлитах DRG и спинальных астроцитах, что соответствует невропатической боли на поздних фазах. Интратекальное введение ингибиторов MMP-9 или TIMP-1, эндогенного тканевого ингибитора MMP-9 задерживает развитие механической аллодинии (центральная болевая сенсibilизация после болезненной стимуляции) в первые дни (<10) после травмы. Однако ингибирование MMP-9 не оказывает влияния на аллодинию при введении через 10 дней после травмы головного мозга, что указывает на критическую роль MMP-9 в развитии невропатической боли на ранней фазе. По сравнению с MMP-9 активация MMP-2 после травмы спинного нерва показывает отсроченные симптомы. Интратекальное введение TIMP-2, эндогенного ингибитора MMP-2 или небольших синтетических ингибиторов MMP-2 частично ослабляет аллодинию на 1-й день после травмы, но почти полностью блокирует аллодинию в течение последующих десяти дней. Это указывает на участие MMP-2 в невропатической боли на поздней фазе. (Kawasaki, Y., et al., *Nature Medicine*, 2008, (3):331-336).

В процессе воспалительной реакции перенос лейкоцитов через тканевые барьеры, в том числе через базальные барьерные мембраны, возможен только в том случае, если эти клетки снабжены ферментами, которые могут перестраивать ЕСМ. Поэтому MMP являются важными эффекторными молекулами воспалительных клеток.

MMP могут действовать как переключатели или как сложный поворотный механизм при остром и хроническом воспалении, при аутоиммунных заболеваниях, когда они запускаются при сосудистых заболеваниях, и в регенеративной фазе после воспаления. Таким образом, биология MMP важна на фазах выявления, протекания и прекращения острых и хронических воспалительных и ишемических процессов и, следовательно, ингибиторы MMP могут на них влиять. Ингибиторы MMP были протестированы на многих животных моделях острого и хронического воспаления, таких как эндотоксический шок, рассеянный склероз и ревматоидный артрит. Бактериемия, септический и эндотоксический шок являются наиболее частыми причинами смерти в больницах в настоящее время. Компоненты стенок бактериальных клеток вызывают системный ответ за счет активации toll-подобных рецепторов, что приводит к чрезмерной продукции воспалительных цитокинов и ферментов. Мыши с дефицитом MMP-9 имеют измененную резистентность к индуцированной бактериями токсичности, тогда как мыши с дефицитом ингибиторов протеазы более восприимчивы к эндотоксическому шоку.

Рассеянный склероз представляет собой многофакторное заболевание, которое зависит от генетической предрасположенности, факторов окружающей среды и иммунологических эффекторных механизмов, которые повреждают центральную нервную систему. MMP-9 является иммунной эффекторной молекулой при рассеянном склерозе (Opdenakker, G., et al., *Lancet Neurol.*, 2003, (2):747-756). Функция MMP-9 заключается в миграции клеток через соединительные ткани и стенки сосудов и повреждении гематоэнцефалического барьера. MMP-9 также лизирует белковые субстраты, такие как миелиновые белки, молекулы клеточной адгезии, цитокины и хемокины, которые связаны с рассеянным склерозом и другими неврологическими заболеваниями. Свидетельства, которые подтверждают отрицательную роль MMP-9 при воспалительных повреждениях ЦНС, были получены на животных моделях. В мышинной модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE), в модели рассеянного склероза, при развитии болезни как желатиназа MMP-2, так и желатиназа MMP-9 активировались (Gijbels, K., et al., *J. Neurosci. Res.*, 1993, (36):432-440). Молодые мыши с дефицитом MMP-9 обладают устойчивостью к развитию EAE. Мыши, с нокаутом по двум генам *Mmp2/Mmp9*, полностью устойчивы к развитию EAE. Фармакологическое ингибирование активности MMP улучшает течение EAE в ряде исследований, в которых использовались ингибиторы MMP (Hewson, A., et al., *Inflamm. Res.*, 1995, (44):345-349). Использование ингибиторов MMP может также быть эффективным при терапии ревматоидного артрита. MMP-9 участвует в разрушении коллагена II при ревматоидном артрите, что приводит к открытию доступа к иммунодоминантным эпитопам и их высвобождению. Кроме того, MMP являются важными при миграции воспалительных лейкоцитов. Это говорит о том, что ингибиторы MMP могут быть использованы в терапии ревматоидного артрита, что было подтверждено на разных моделях животных (Agrawal, S., et al., *J. Exp. Med.*, 2006, (203):1007-1019).

Атеросклероз и связанные с ним заболевания, в том числе инфаркт миокарда и инсульт, часто сравнивают с хроническими воспалительными заболеваниями. Это основано на результатах гистопатологии, таких как активация пенистых макрофагов, локальная продукция цитокинов и хемокинов и вовлеченность MMP. Использование животных моделей с генетически измененными мышами (как трансгенными, так и с нокаутом) укрепило мнение о том, что MMP имеют важное значение при сосудистых патологиях (Janssens, S., et al., *Cardiovasc. Res.*, 2006, (69):585-594, и Tayebjee, M. H., et al., *Curr. Med. Chem.*, 2005, (12):917-925). Сообщалось, что уровни MMP-9 повышаются с усилением идиопатической фибрилляции предсердий (Li, M. et al., *J. Int. Med. Res.*, 2014, (1): 224-230) и связаны с развитием аневризмы аорты (Newman, K. M., et al., *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology*, 1994, (8): 1315-1320). Ингибирование MMP-9 подавляет рост аневризмы аорты (Lindeman, J. H., et al., *Circulation*, 2009, (119):2209-2216). Внезапная смерть после инфаркта миокарда может происходить при разрыве сердца, при процессе, в котором участвуют MMP. В исследованиях на мышах была показана решающая роль желатиназ в балансе с эндогенными тканевыми ингибиторами металлопротеаз (TIMP). Инфаркт миокар-

да может быть обращен при лечении мышей пероральным ингибитором MMP-2 (Matsumura, S., et al., J. Clin. Invest., 2005, (115):559-609).

MMP-9 играет ключевую роль в патогенезе хронического воспалительного заболевания, включая язвенный колит и болезнь Крона (Abraham, C, et al., N Eng J Med. , 2009, (361): 2066-2078), и его активация в тканях толстой кишки, как было показано, совпадает с активными вспышками воспалительного заболевания кишечника у людей (Gao, Q., et al., Dig Liver Dis., 2005, (37):584-592). В соответствии с данными образцов, полученных у человека, наблюдалась повышенная экспрессия и активация белка MMP-2 и MMP-9 в воспаленной ткани толстой кишки на мышиных моделях воспалительного заболевания кишечника. Кроме того, было показано, что колит ослабляется у мышей с нокаутом MMP-9, а также у мышей с двойным нокаутом MMP-2 и MMP-9. Таким образом, сопутствующее ингибирование MMP-2 и MMP-9 является терапевтически эффективным при воспалительном заболевании кишечника (Grag, P., et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 2009, (284):15353-15357).

Смертность от злокачественных новообразований связана прежде всего с неспособностью предотвратить метастазы. Новые данные подчеркнули роль MMP на ранних стадиях распространения злокачественных новообразований (Kessenbrock, K., et al., Cell, 2010, (141):52-67). Ферменты, которые разрушают ECM, давно считаются важными для прогрессирования опухоли. Предполагается, что опухолевые клетки производят ферменты, которые разрушают матричные барьеры, окружающие опухоль, обеспечивая инвазию в окружающие соединительные ткани, вход и выход из кровеносных сосудов и метастазирование в отдаленные органы. MMP обладают способностью разрушать все структурные компоненты ECM. Более того, MMP активируются практически во всех опухолях человека и животных, а также в большинстве линий опухолевых клеток (Coussens, L. M., et al., Science, 2002, (295): 2387-2392). MMP-9 связан с раковой инвазией. У пациентов со злокачественным новообразованием наблюдаются повышенные уровни MMP-9 в ткани и крови, что делает MMP-9 привлекательными мишенями для лечения злокачественных новообразований, поскольку способность MMP-9 разрушать коллаген и ламинин коррелирует с его способностью регулировать миграцию клеток, повышать ангиогенез и рост опухоли (Bjorklund, M., et al., Biochim Biophys Acta, 2005, (1755): 37-69).

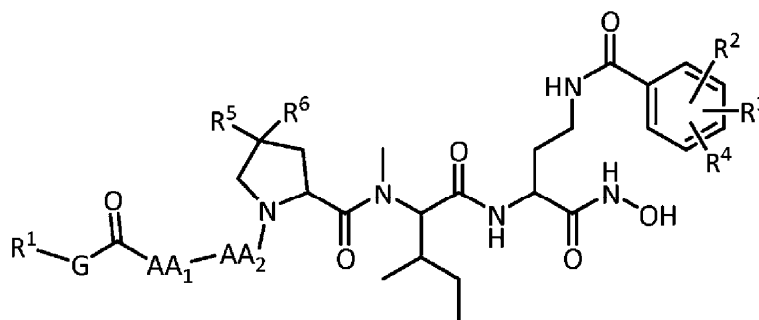
При патологических состояниях в легких MMP и их физиологические ингибиторы (TIMP) аномально сверхэкспрессируются и продуцируются в дыхательных путях набором различных структурных клеток. Изменения в этих биологических активностях приводят к ряду серьезных результатов при заживлении ран и направленной миграции клеток. Считается, что разбалансировка различных MMP в результате стимулирования структурными или воспалительными клетками участвует в патофизиологии многих заболеваний легких, включая астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), фиброз легких и рак легких (Demedts, I. K., et al., Curr Opin Pharmacol, 2005, (5): 257-63). Процесс воспаления характеризуется перестройкой экстрацеллюлярного матрикса и накоплением коллагена, что в свою очередь требует увеличения уровней MMP-9 (Kelly, E. A., et al., Am J Respir Crit Care Med, 2000, (162):1157-1161). Считается, что селективное ингибирование MMP-9 способствует терапевтическому эффекту в этих связанных хронических воспалительных заболеваниях легких, как это недавно было доказано при лечении ХОБЛ (Xie, S.S., et al., J Int Med Res, 2014, (42): 1272-1284).

Согласно этим экспериментальным свидетельствам существует настоятельная потребность в поиске новых соединений, которые были бы мощными ингибиторами MMP-2 и MMP-9 и были бы селективными по отношению к другим MMP, таким как коллагеназы (MMP-1), стромелины (MMP-3) и матрилизины (MMP-7).

Краткое описание изобретения

Авторам настоящего изобретения удалось обнаружить, что соединения формулы (I) способны ингибировать MMP-2 и MMP-9 желатиназы с высокой активностью и являются селективными в отношении к их способности ингибировать другие MMP, такие как коллагеназы (MMP-1), стромелины (MMP-3) и матрилизины (MMP-7). Эти два свойства делают соединения по настоящему изобретению идеальными кандидатами для использования при терапии эпилепсии, шизофрении, болезни Альцгеймера, аутизма (в частности, связанного с синдромом ломкой X хромосомы), умственной отсталости, биполярных расстройств, расстройств настроения, таких как биполярные расстройства, депрессии, сосудистых заболеваний, таких как ишемический инсульт и атеросклероз, воспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и воспалительное заболевание кишечника, ломки, нейропатической боли, заболеваний легких, таких как астма и хроническая обструктивная болезнь легких, злокачественного новообразования и сепсиса, поскольку, как объяснялось выше, MMP-2 и MMP-9, как известно, участвуют в указанных заболеваниях, и также известно, что селективность является желательным свойством для снижения уровня вторичных эффектов, возникающих при использовании неселективных ингибиторов желатиназы.

Следовательно, один аспект изобретения относится к соединениям, имеющим формулу (I):



(I)

где

AA₁ либо отсутствует, либо является остатком аминокислоты, выбранной из группы, включающей N-метил-фенилаланин, N-метил-триптофан, N-метил-тирозин и N-метил-изолейцин,

AA₂ либо отсутствует, либо является остатком аминокислоты, выбранной из группы, включающей N-метил-фенилаланин, N-метил-аланин, N-метил-β-аланин и N-метил-лейцин,

G представляет собой линейный или разветвленный алкиленовый остаток, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, где одна или несколько невинциальных метиленовых групп (-CH₂-) в указанном остатке могут быть заменены на соответствующий атом кислорода (-O-),

R¹ выбран из группы, включающей водород и фенил,

R², R³ и R⁴ независимо выбраны из группы, включающей водород и фтор,

R⁵ и R⁶ независимо выбраны из группы, включающей водород и фтор, или его солям.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам получения соединения формулы (I), как определено выше, или фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или сольвата.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединение формулы (I), как определено выше, или фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или сольват и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или носитель.

Другой аспект настоящего изобретения относится к соединению формулы (I), как определено выше, или к его фармацевтически приемлемой соли для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для профилактики и/или лечения эпилепсии, шизофрении, болезни Альцгеймера, аутизма (в частности, связанного с синдромом ломкой X хромосомы), умственной отсталости, биполярного расстройства, расстройства настроения, такого как биполярные расстройства, депрессии, сосудистых заболеваний, таких как ишемический инсульт и атеросклероз, воспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и воспалительное заболевание кишечника, лекарственная зависимость, заболевания легких, таких как астма и хроническая обструктивная болезнь легких, злокачественного новообразования и сепсиса.

Другой аспект этого изобретения относится к способу лечения или профилактики эпилепсии, шизофрении, болезни Альцгеймера, аутизма (в частности, связанного с синдромом ломкой X хромосомы), умственной отсталости, биполярных расстройств, расстройств настроения, таких как биполярные расстройства, депрессии, сосудистых заболеваний, таких как ишемический инсульт и атеросклероз, воспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и воспалительное заболевание кишечника, лекарственной зависимости, заболевания легких, таких как астма и хроническая обструктивная болезнь легких, злокачественного новообразования и сепсиса, предпочтительно у млекопитающих, где терапевтическое количество соединения формулы (I), как определено выше, или фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или сольвата вводят пациенту, нуждающемуся в указанном лечении.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению соединения формулы (I), как определено выше, или фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или сольвата для изготовления лекарственного средства, в частности для профилактики и/или лечения заболевания, выбранного из группы, включающей эпилепсию, шизофрению, болезнь Альцгеймера, аутизм (в частности, связанный с синдромом ломкой X хромосомы), умственную отсталость, биполярные расстройства, расстройства настроения, такие как биполярные расстройства, депрессию, сосудистые заболевания, такие как ишемический инсульт и атеросклероз, воспалительные заболевания, такие как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и воспалительное заболевание кишечника, наркоманию, нейропатическую боль, заболевания легких, такие как астма и хроническая обструктивная болезнь легких, злокачественное новообразование и сепсис.

Подробное описание изобретения

В контексте настоящего изобретения термин "остаток аминокислоты" формулы N(Me)H-R-COOH следует понимать как бирадикальный -N(Me)-R-CO-.

В контексте настоящего изобретения термин "алкилен" используется для обозначения линейного

или разветвленного углеводородного остатка формулы $-C_nH_{2n}-$.

В контексте настоящего изобретения, когда в алкиленовой группе один или несколько невинциальных метиленов ($-CH_2-$) считаются замененными на соответствующие атомы кислорода ($-O-$), подразумевается, что один или несколько указанных метиленов отсутствуют, а их место занято соответствующим(ми) атомом(ми) кислорода, образующим(ми) эфирную ($-O-$) связь, при условии, что две винциальные метиленовые группы не могут одновременно быть заменены на атомы кислорода, то есть полученная цепь не может содержать пероксидную группу ($-O-O-$). Как следствие, эмпирическая формула указанного модифицированного остатка алкилена будет $C_mH_{2m}O_x$. Неограничивающими примерами указанных групп являются н-пропокси, 1-[2-(2-этоксипропокси)этоксипропил] и 2-метоксипропоксиметил.

В контексте настоящего изобретения, когда для остатка аминокислоты или аминокислоты стереоизомерия не указана, следует понимать, что делается ссылка на любой из возможных стереоизомеров упомянутой аминокислоты или аминокислотного остатка. Например, ссылка на изолейцин (Ile) включает D-изолейцин и L-изолейцин.

В контексте настоящего изобретения используются некоторые сокращения и акронимы, и их значения приведены ниже.

Alloc: аллилоксикарбонил.

Dab: 2,4-диаминобутановая кислота.

DBU: 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен.

DCM: дихлорметан.

DIEA: N,N-диизопропилэтиламин.

DMF: диметилформамид.

DMCO: диметилсульфоксид.

DIC: N, N'-диизопропилкарбодиимид.

EDC: 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид.

Fmoc: фторенилметилоксикарбонил.

HFIP: гексафтор-2-пропанол или гексафторизопропанол.

HOAt: 1-гидрокси-7-азабензотриазол.

ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВЭЖХ-МС: высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией.

MeOH: метанол.

Oxuma pure: этил циано(гидроксимино)ацетат.

RyBOP: бензотриазол-1-ил-окситрипиридинофосфоний гексафторфосфат.

TBTU: о-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий тетрафторборат.

TFU: трифторуксусная кислота.

TIS: триизопропилсилан.

Tris: трис(гидроксиметил)аминометан или 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол.

Термин "соль" следует понимать как любую форму активного соединения, используемого в соответствии с настоящим изобретением, в которой указанное соединение находится в ионной форме или заряжено и связано (ассоциировано) с противоионом (катионом или анионом) или находится в растворе. Это определение также включает соли четвертичного аммония и комплексы активной молекулы с другими молекулами и ионами, в частности комплексы, образованные посредством ионных взаимодействий. Определение включает, в частности, физиологически приемлемые соли; этот термин следует понимать как эквивалент "фармакологически приемлемых солей" или "фармацевтически приемлемых солей".

Термин "фармацевтически приемлемые соли" в контексте настоящего изобретения означает любую соль, которая является физиологически переносимой (обычно это означает, что она не является токсичной, в частности в результате наличия противоиона) при надлежащем использовании для лечения, применяемого или используемого, в частности для людей и/или млекопитающих. Эти физиологически приемлемые соли могут быть образованы с катионами или основаниями, и в контексте настоящего изобретения понятно, что они являются солями, образованными по меньшей мере одним соединением, используемым в соответствии с изобретением (обычно кислотой (депротонированной), такой как анион) особенно при использовании для людей и/или млекопитающих. Эти физиологически приемлемые соли также могут быть образованы с анионами или кислотами, и в контексте настоящего изобретения понятно, что они являются солями, образованными по меньшей мере одним соединением, используемым в соответствии с изобретением, обычно протонированным, например с протонированным азотом, таким как катион, и по меньшей мере одним физиологически переносимым анионом, особенно при использовании для людей и/или млекопитающих. Это определение, в частности, включает в контексте настоящего изобретения соль, образованную физиологически переносимой кислотой, то есть соли конкретного активного соединения с физиологически переносимыми органическими или неорганическими кислотами, особенно при использовании для людей и/или млекопитающих.

Фармацевтически приемлемые кислоты включают неорганические кислоты, такие как хлористоводородную, серную, фосфорную, дифосфорную, бромистоводородную, йодистоводородную и сульфатную кислоты, и органические кислоты, такие как лимонную, малеиновую, яблочную, миндальную,

аскорбиновая, щавелевую, янтарную, винную, уксусную, метансульфоновую, этансульфоновую, бензолсульфоновую и п-толуолсульфоновую кислоты. Фармацевтически приемлемые основания включают гидроксиды щелочных металлов (например, натрия или калия), щелочноземельных металлов (например, кальция или магния) и органические основания (например, алкиламины, арилалкиламины и гетероциклические амины).

Другими предпочтительными солями в соответствии с изобретением являются соединения четвертичного аммония, в которых эквивалент аниона (X-) ассоциирован с положительно заряженным атомом N. X- может быть анионом различных минеральных кислот, таким как, например, хлорид, бромид, йодид, сульфат, нитрат, фосфат, или анионом органической кислоты, таким как ацетат, малеат, фумарат, цитрат, оксалат, сукцинат, тартрат, малат, манделат, трифторацетат, метансульфонат и п-толуолсульфонат. X- предпочтительно представляет собой анион, выбранный из хлорида, бромида, йодида, сульфата, нитрата, ацетата, малеата, оксалата, сукцината и трифторацетата. Более предпочтительно X- представляет собой хлорид, бромид, трифторацетат или метансульфонат.

Термин "сольват" в соответствии с настоящим изобретением следует понимать как означающий любую форму активного соединения в соответствии с изобретением, в которой указанное соединение связано нековалентной связью с другой молекулой (обычно полярного растворителя), включая, в частности, гидраты и алкоголяты, как, например, метанолат. Предпочтительным сольватом является гидрат.

Любое соединение, являющееся пролекарством соединения формулы (I), также входит в объем изобретения. Термин "пролекарство" используется в самом широком смысле и охватывает те производные, которые преобразуются *in vivo* в соединения по изобретению. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваются ими, производные и метаболиты соединений формулы (I), которые включают биогидролизуемые фрагменты, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые фосфатные аналоги. Предпочтительно пролекарствами соединений с карбоксильными функциональными группами являются низшие алкиловые эфиры карбоновой кислоты. Карбоксилатные эфиры обычно образуются путем этерификации какой-либо из карбоксильных групп, присутствующих в молекуле. Пролкарства обычно могут быть получены с использованием известных методов, таких как описанные в работах Burger "Medicinal Chemistry and Drug Discovery" 6th ed. (Donald, J., Abraham ed., 2001, Wiley), "Design and Applications of Prodrugs" (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers) и Krogsgaard-Larsen et al. "Textbook of Drug design and Discovery" Taylor & Francis (April 2002).

Соединения по настоящему изобретению, представленные вышеописанной формулой (I), могут включать энантимеры и/или диастереоизомеры, в зависимости от наличия хиральных центров. Отдельные изомеры, энантимеры или диастереоизомеры и их смеси подпадают под объем настоящего изобретения.

Кроме того, какое-либо упомянутое в настоящем документе соединение может существовать в виде таутомеров. В частности, термин "таутомер" относится к одному из двух или более структурных изомеров соединения, которые существуют в равновесии и легко преобразуются из одной изомерной формы в другую. Обычными таутомерными парами являются амин-имин, амид-имидная кислота, кето-енол, лактам-лактим и т.д.

Если не указано иное, соединения по изобретению также должны включать изотопно-меченные формы, т.е. соединения, которые отличаются только наличием одного или нескольких изотопно-обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие данные структуры, за исключением замены по меньшей мере одного атома водорода на дейтерий или тритий, или замены по меньшей мере одного атома углерода на ^{13}C - или ^{14}C -обогащенный углерод, или замены по меньшей мере одного атома азота на ^{15}N -обогащенный азот, входят в объем настоящего изобретения.

Соединения формулы (I) или их соли или сольваты предпочтительно представлены в фармацевтически приемлемой или по существу чистой форме. Под фармацевтически приемлемой формой понимают среди прочего фармацевтически приемлемый уровень чистоты, не считая обычные фармацевтические добавки, такие как разбавители и носители, и не содержащую вещества, которые считаются токсичными при нормальных дозах. Степенью чистоты для лекарственного вещества являются предпочтительно около 50%, более предпочтительно около 70%, наиболее предпочтительно около 90%. В предпочтительном варианте осуществления она составляет около 95% для соединения формулы (I) или его солей, сольватов или пролекарств.

Как отмечалось ранее, термин "фармацевтически приемлемые соли, сольваты, пролекарства" относится к любой(му) соли, сольвату или какому-либо другому соединению, которые при введении реципиенту способны предоставить (прямо или косвенно) соединение, описанное в настоящем документе. Однако следует принять во внимание, что фармацевтически неприемлемые соли, сольваты и пролекарства соединений формулы (I) также подпадают под объем изобретения, поскольку они могут быть использованы при получении фармацевтически приемлемых солей, сольватов и пролекарств указанных соединений. Получение солей, сольватов и пролекарств может быть осуществлено способами, известными в данной области.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения группа AA₁ представляет собой остаток аминокислоты, выбранной из группы, включающей N-метил-триптофан и N-метил-изолейцин.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения группы AA_1 и AA_2 отсутствуют.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения G выбран из группы, включающей $-CH_2-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_5-$, $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$, $-(CH_2)_7-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_2-CH_2-CH_3)-$, $-O-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_{13}-$ и $-CH_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-$.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения R^1-G выбран из группы, включающей CH_3- , $CH_3-(CH_2)_2-$, $CH_3-CH(CH_3)-CH_2-$, $CH_3-(CH_2)_6-$, $CH_3-(CH_2)_4-$, $CH_3-CH_2-CH_2-CH(CH_2-CH_2-CH_3)-$, фенил- $O-(CH_2)_3-$, $CH_3-(CH_2)_6-O-(CH_2)_3-$ и $-CH_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-$.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения R^1-G выбран из группы, включающей $CH_3-(CH_2)_2-$, $CH_3-CH(CH_3)-CH_2-$, фенил- $O-(CH_2)_3-$, $CH_3-(CH_2)_6-$, $CH_3-(CH_2)_4-$ и $CH_3-CH_2-CH_2-CH(CH_2-CH_2-CH_3)-$. Соединения, определенные в этом варианте осуществления, особенно хороши для прохождения гематоэнцефалического барьера.

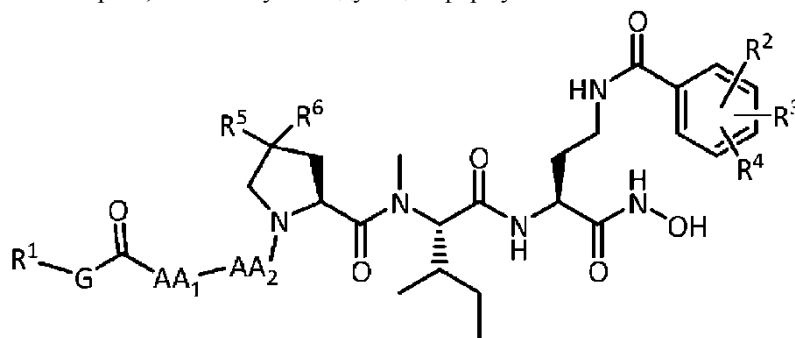
В другом варианте осуществления настоящего изобретения один из R^2 , R^3 и R^4 представляет собой водород.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения один из R^2 , R^3 и R^4 представляет собой водород и два других являются атомами фтора.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фенильная группа, замещенная R^2 , R^3 и R^4 , представляет собой 3,5-дифторфенил.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения R^5 и R^6 , оба представляют собой водород.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединения формулы (I), определенные выше, имеют стереоизомерию, показанную следующей формулой:



В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления предпочтительные варианты, описанные выше для разных заместителей объединены. Настоящее изобретение относится также к таким комбинациям предпочтительных замещений в приведенных выше формулах.

Конкретные отдельные соединения по изобретению, подпадающие под формулу (I), включают перечисленные далее соединения:

(2S)-1-ацетил-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(4-фторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-1-ацетил-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-1-гексаноил-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-1-бутаноил-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(3-метилбутаноил)пирролидин-2-карбоксамид

(2S)-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-оксаноилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-N-[(1S,2S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4,4-дифтор-1-гексаноил-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(2-пропилпентаноил)пирролидин-2-карбоксамид

(2S)-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(4-феноксипентаноил)пирролидин-2-карбоксамид

(2S)-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4,4-дифтор-N-метил-1-(4-феноксипентаноил)пирролидин-2-карбоксамид

(2S)-1-[(2S)-2-[ацетил(метил)амино]-3-фенилпропаноил]-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-1-[(2S)-2-[ацетил(метил)амино]пропаноил]-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-1-[3-[ацетил(метил)амино]пропаноил]-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-1-[(2S)-2-[2-[бутаноил(метил)амино]-3-(1H-индол-3-ил)пропаноил]метиламино]-4-метилпентаноил]-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид

(2S)-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-бензамидо-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-гексаноилпирролидин-2-карбоксамид

(2S,4R)-N-[(1S)-1-[[(1S)-3-бензамидо-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4-фтор-N-метил-1-пентаноилпирролидин-2-карбоксамид

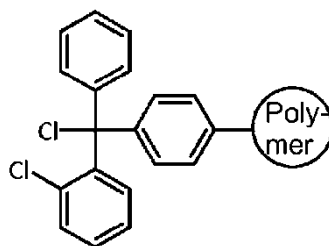
или их фармацевтически приемлемые соли, изомеры, пролекарства или сольваты.

Соединения формулы (I), определенные выше, могут быть получены с помощью доступных способов синтеза, как показано на следующей общей схеме.

Подробное описание путей синтеза соединений формулы (I)

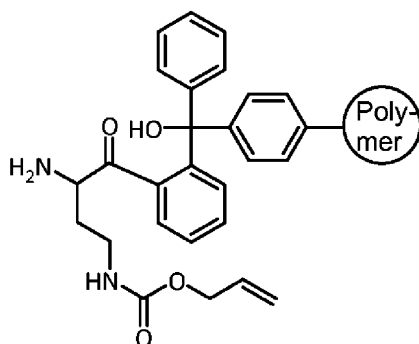
Альтернатива I.

Полимерный носитель, подходящий для связывания N α -Fmoc-N γ -Alloc-2,4-диаминомасляной кислоты (Fmoc-Dab(Alloc)-OH) через ее карбонильную группу и для получения при отщеплении C-концевой группы карбоновой кислоты, такой как 2-хлортитрильная смола (III), помещают в шприц, снабженный полиэтиленовым пористым диском (реакционный сосуд). Смоле дают набухать с помощью промывок соответствующими органическими растворителями, такими как дихлорметан (DCM) и диметилформамид (DMF).



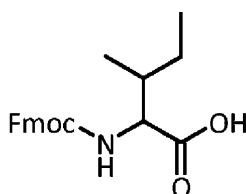
(III)

После набухания полимерной подложки Fmoc-Dab(Alloc)-OH присоединяют к смоле с использованием аминного основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин (DIEA), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение 1 ч. После чего без фильтрования смеси добавляют безводный метанол для закрытия оставшихся непрореагировавших участков смолы. После фильтрования и промывки Fmoc удаляют, получая продукт формулы (IV) путем обработки раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ. Фильтраты и промывки собирают в объемной колбе для количественного определения достигнутой загрузки смолы после закрепления первой аминокислоты посредством УФ-измерений. Удаление Fmoc оценивают также с использованием теста Кайзера.



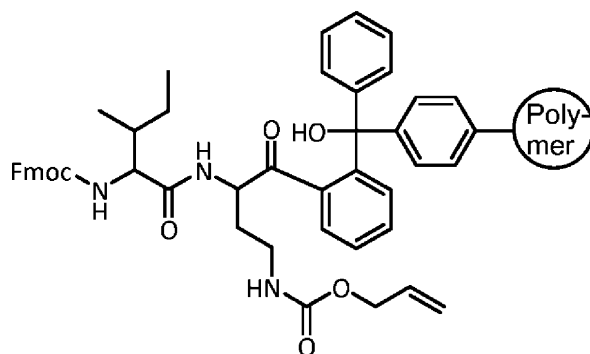
(IV)

Соединение формулы (V):



(V)

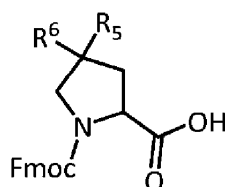
присоединяют к соединению формулы (IV) с получением продукта формулы (VI)



(VI)

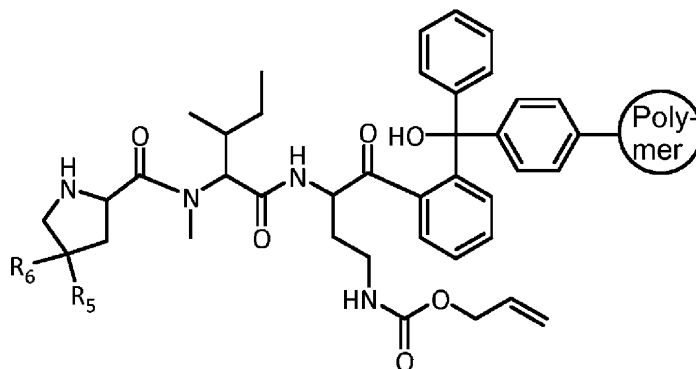
с использованием активирующего агента, такого как гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окситрипирдинофосфония (PyBOP), в присутствии или в отсутствие добавки, такой как 1-гидрокси-7-азабензотриазол (HOAt), и аминного основания, такого как DIEA, в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции от 1 до 2 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо.

Защитную группу Fmoc из соединения формулы (VI) удаляют раствором аминного основания, та-



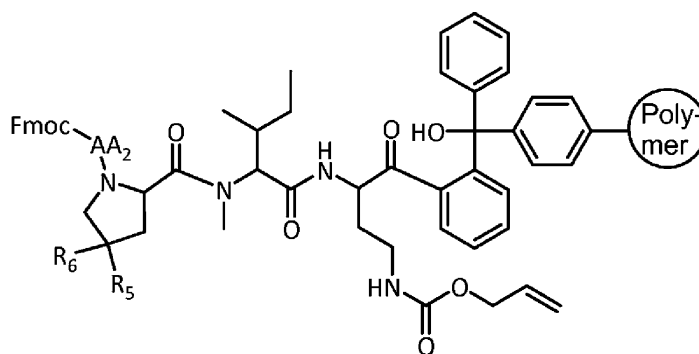
(X) ,

где R^5 и R^6 определены выше, связывают с получением продуктов (XI) с использованием активирующего агента, такого как PyBOP, в присутствии или в отсутствие добавки, такой как HOAt, и аминного основания, такого как DIEA, в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции от 1 до 2 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо. Защитную группу Fmoc из соединения формулы (X) удаляют раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ, с получением соединения формулы (XI):



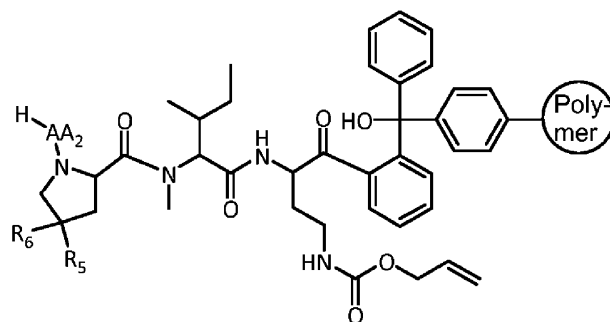
(XI) .

Fmoc-AA₂-OH, где AA₂ является таким, как указано выше, закрепляют на продукте формулы (XI) с получением продукта формулы (XII)



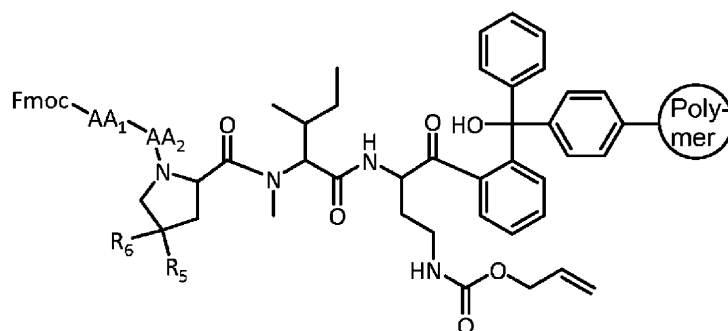
(XII)

с использованием активирующего агента, такого как PyBOP, в присутствии или в отсутствие добавки, такой как HOAt, и аминного основания, такого как DIEA, в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции от 1 до 2 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо. Защитную группу Fmoc из AA₂ удаляют раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ, с получением соединения формулы (III):



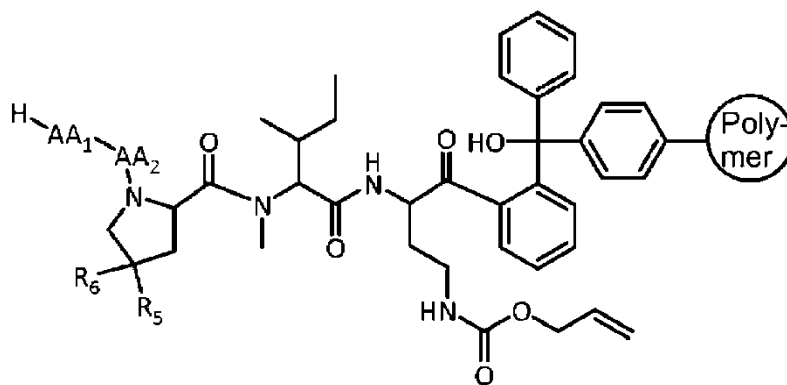
(XIII) .

Фмос- AA_1 -OH, где AA_1 является таким, как указано выше, присоединяют к продукту формулы (XII) с получением продукта формулы (XIV)



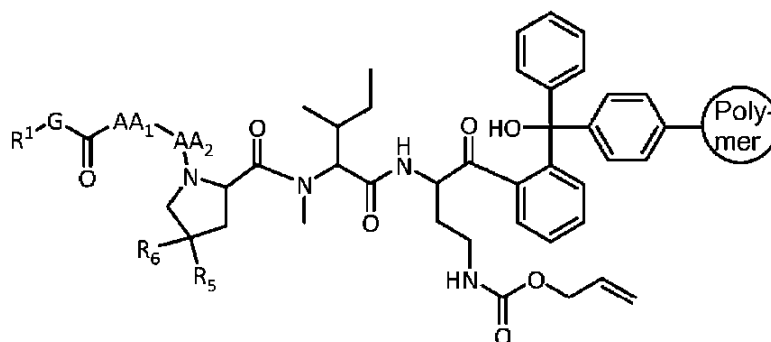
(XIV)

с использованием активирующего агента, такого как PyBOP, в присутствии или в отсутствие добавки, такой как HOAt, и аминного основания, такого как DIEA, в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции от 1 до 2 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо. Защитную группу Фмос из AA_1 удаляют раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ, с получением соединения формулы (XV):



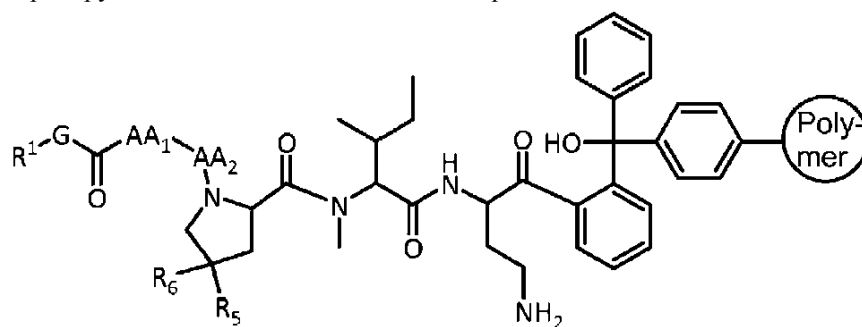
(XV) .

Амино группу соединения формулы (XV) защищают группой R^1 -G-CO- с получением соединения формулы (XVI). Процедуру защиты проводят с активированной формой карбоновой кислоты R^1 -G-COOH, такой как ангидрид формулы R^1 -G-CO-O-CO-G- R^1 или галогенангидрид формулы R^1 -G-CO-X (где R^1 и G являются такими, как указано выше, и X, предпочтительно, представляют собой Cl, Br или I), в присутствии аминного основания, такого как DIEA, в присутствии или в отсутствие активирующего агента, такого как PyBOP, в присутствии или в отсутствие такой добавки, как HOAt. Степень завершенности реакции контролируется тестом Кайзера.



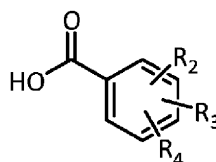
(XVI)

Защитную группу alloc у соединения формулы (XVI) удаляют с получением соединения формулы (XVII) путем суспендирования соединения формулы (XVI) в органическом растворителе, таком как DCM, и добавления к нему фенилсилана, при этом в суспензию барботируют N_2 . Затем добавляют тетра-кис(трифенилфосфин)палладий (0) и барботирование N_2 -продолжают в течение 5 мин. После этого реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Степень удаления защитной группы alloc контролируют с использованием теста Кайзера.



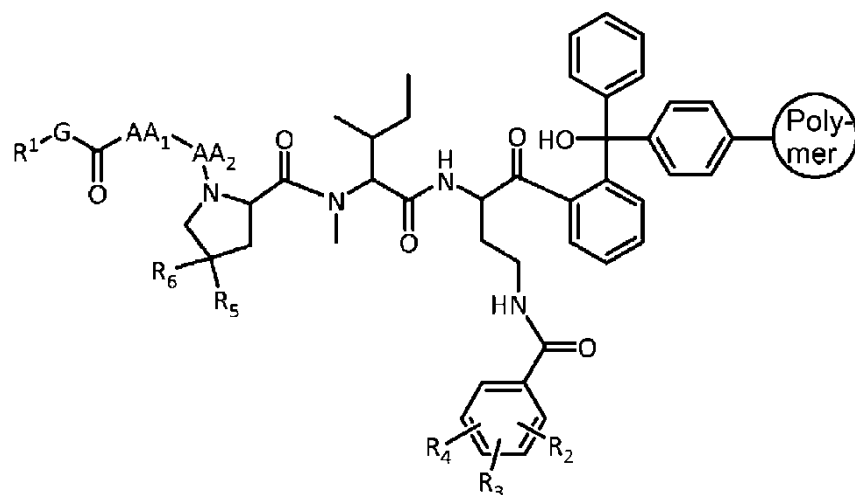
(XVII)

Затем продукт формулы (XVII):



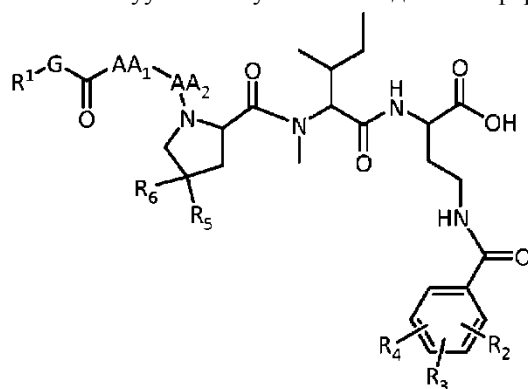
(XVIII),

где R^2 , R^3 и R^4 имеют значения, указанные выше, связывают с аминогруппой боковой цепи фрагмента диаминобутановой кислоты соединения формулы (XVII), используя 3 экв. соединения формулы (XVIII), 3 экв. N, N'-диизопропилкарбодиимида (DIPCDI) и 3 экв. HOAt в ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ, MeOH и DCM. Степень завершения реакции связывания контролируют с использованием теста Кайзера. Стадию повторного связывания соединения формулы (XVIII) проводят, когда колориметрический тест показывает, что реакция связывания не полностью завершена. Эта стадия дает соединение формулы (XIX):



(XIX) .

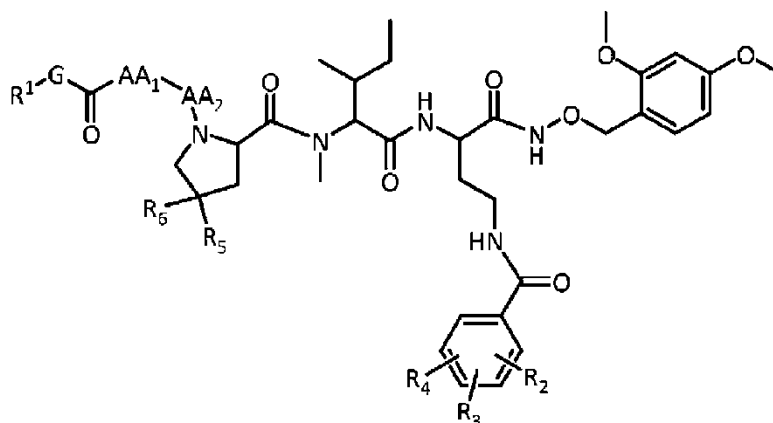
Соединение формулы (XIX) отщепляют от смолы с использованием гексафтор-2-пропанола (HFIP). Смолу промывают несколько раз DCM и сушат. Соединение формулы (XX) получают добавлением смеси HFIP/DCM (1:4) к соединению формулы (XIX). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин. Реакционную смесь фильтруют и промывают HFIP/DCM и затем DCM. Стадию отщепления и промывки повторяют в тех же условиях еще два раза. После этого полученные фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме с получением соединения формулы (XX):



(XX) .

Соединение формулы (I) может быть получено из соединения формулы (XX) различными способами, ниже показано два способа, используемые для синтеза в примерах.

Способ А: 3,5 экв. промежуточного O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина подвергают взаимодействию с 1 экв. соединения формулы (XX) с использованием 1,3 экв. 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC·HCl) и 1,3 экв. добавочной HOAt в присутствии 5 экв. амина, такого как N-метилморфолин в DCM или эквивалентном органическом растворителе. Смеси оставляют взаимодействовать в течение 20 ч при комнатной температуре с получением соединения формулы (XXI). Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС. После завершения реакции реакционную смесь промывают KHSO_4 , NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором (по 3 раза). Полученный органический слой сушат, используя сульфат магния, фильтруют и выпаривают в вакууме.



(XXI)

В заключение соединение формулы (I) получают путем обработки соединения формулы (XXI) смесью трифторуксусная кислота (ТФУ)/вода/триизопропилсилан (TIS) (95:2,5:2,5) в течение 1 ч. Полное завершение реакции контролируют с использованием ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС. Сырое соединение формулы (I) очищают с использованием ВЭЖХ, когда это необходимо.

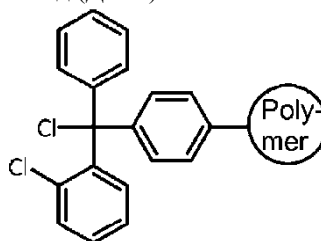
Способ В: 1 экв. соединения формулы (XX) смешивают с 1,1 экв. изобутилхлорформиата и 2,5 экв. свежеполученного раствора гидроксиламина (*) в присутствии аминного основания, такого как N-метилморфолин, в холодном (-20°C) сухом тетрагидрофуране.

Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при температуре -20°C, давая температуре достичь 0°C в течение 2 ч и затем оставляя ее на ночь при температуре 5°C. Протекание реакции контролируют с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). После завершения реакции растворитель выпаривают в вакууме с получением соединения формулы (I). После этого полученный сырой продукт растворяют в этилацетате и промывают KHSO_4 , NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают.

(*) Раствор гидроксиламина получают растворением 3 экв. гидрохлорида гидроксиламина с 1 экв. КОН в MeOH при температуре 0°C. Полученную смесь перемешивают в течение 15 мин при температуре 0°C. KCl выпадает в осадок, и его удаляют фильтрованием. Полученный фильтрат используют как таковой.

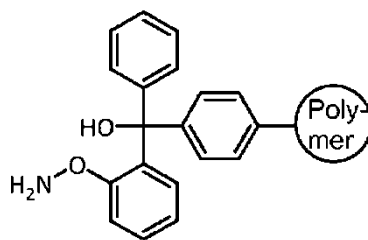
Альтернатива II.

Полимерную подложку, подходящую для присоединения к Fmoc-NH-OH через его спиртовую группу и для получения при расщеплении группы гидроксисоединения, такую как 2-хлортитрильная смола (III), помещают в шприц, снабженный полиэтиленовым пористым диском (реакционный сосуд). Смоле дают набухать с помощью промывок соответствующими органическими растворителями, такими как дихлорметан (DCM) и диметилформамид (ДМФ).



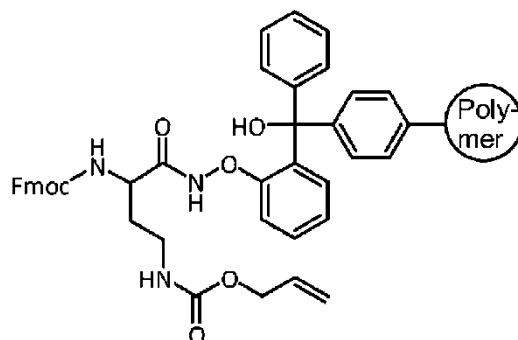
(III)

После набухания полимерной подложки Fmoc-NH-OH присоединяют к смоле с использованием аминного основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин (DIEA), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После чего без фильтрования смеси добавляют безводный метанол для закрытия оставшихся непрореагировавших участков смолы. После фильтрования и промывки Fmoc удаляют, получая продукт формулы (XXII) путем обработки раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ. Фильтраты и промывки собирают в мерной колбе для количественного определения достигнутой загрузки смолы после прикрепления линкера к полимерной подложке посредством УФ-измерений. Удаление Fmoc оценивают также с использованием теста Кайзера.



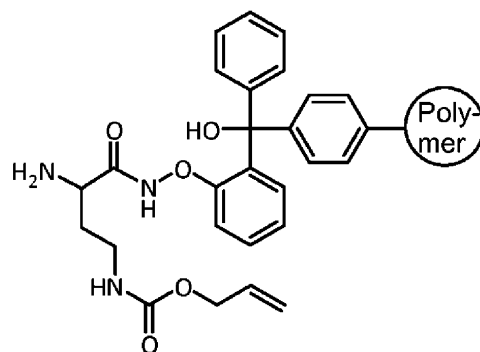
(XXII)

$\text{N}\alpha$ -Fmoc-N γ -Alloc-2,4-диаминобутановую кислоту (Fmoc-Dab(Alloc)-OH) присоединяют к полимерной подложке формулы (XXII) с получением продукта формулы (XXIII) с использованием связующего агента, такого как N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC), в присутствии или в отсутствие добавки, такой как этилциано(гидроксимино)ацетат (Охута риге), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции 1 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо.



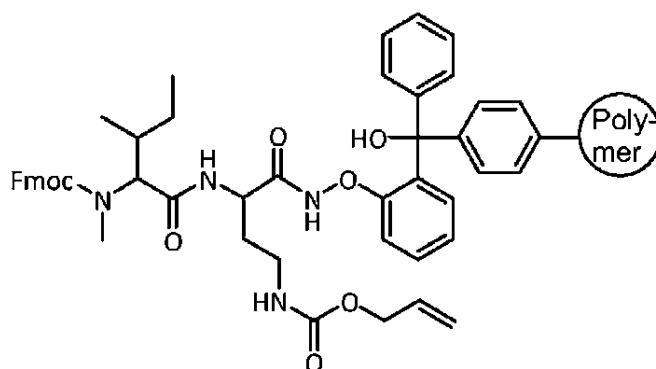
(XXIII)

Защитную группу Fmoc из соединения формулы (XXIII) удаляют раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ, с получением соединения формулы (XXIV):



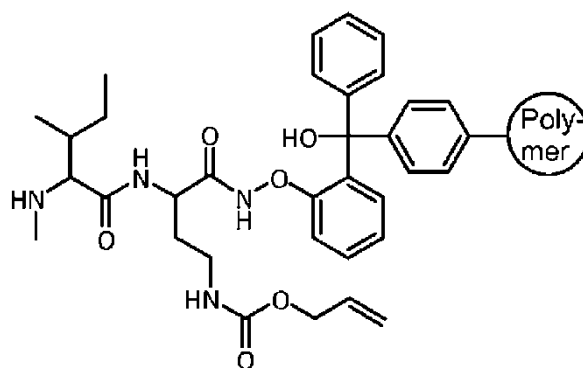
(XXIV) .

$\text{N}\alpha$ -Fmoc-метил изолейцин (Fmoc-NMeIle-OH) присоединяют к соединению формулы (XXIV) с получением продукта формулы (XXV) с использованием активирующего агента, такого как N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC), в присутствии или в отсутствие добавки, такой как этилциано(оксимино)ацетат (Охута риге), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции 1 час. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо.



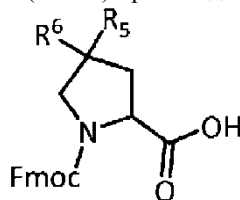
(XXV)

Защитную группу Fmoc из соединения формулы (XXV) удаляют раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ, с получением соединения формулы (XXVI):



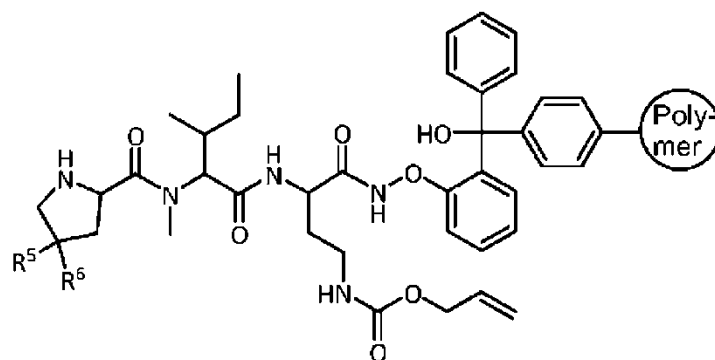
(XXVI) .

После получения формулы соединения (XXVI) производное N α -Fmoc-пролина формулы (X)



(X) ,

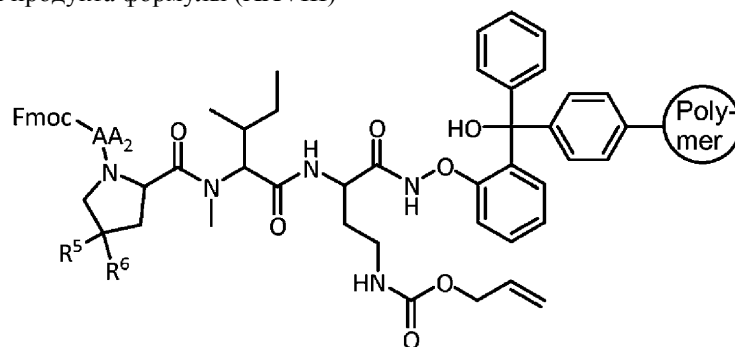
где R⁵ и R⁶ имеют значения, указанные выше, связывают с получением продукта формулы (XXVII) с использованием связующего агента, такого как N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC), в присутствии или в отсутствие добавки, такой как этилциано(гидроксимино)ацетат (Охута руге), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции 1 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо. Защитную группу Fmoc из соединения формулы (X) удаляют раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ, с получением соединения формулы (XXVII):



(XXVII) .

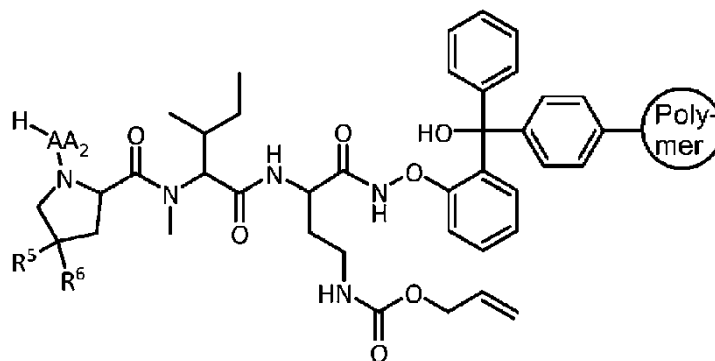
Fmoc-AA₂-OH, где AA₂ имеет значения, указанные выше, закрепляется на продукте формулы

(XXVII) с получением продукта формулы (XXVIII)



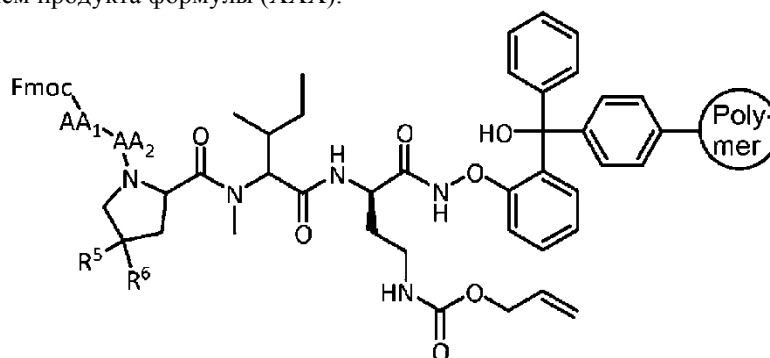
(XXVIII)

с использованием связующего агента, такого как N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC), в присутствии или в отсутствие добавки, такой как этилциано(гидроксимино)ацетат (Охута риге), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции 1 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо. Защитную группу Fmoc из AA₂ удаляют раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ, с получением соединения формулы (XXIX):



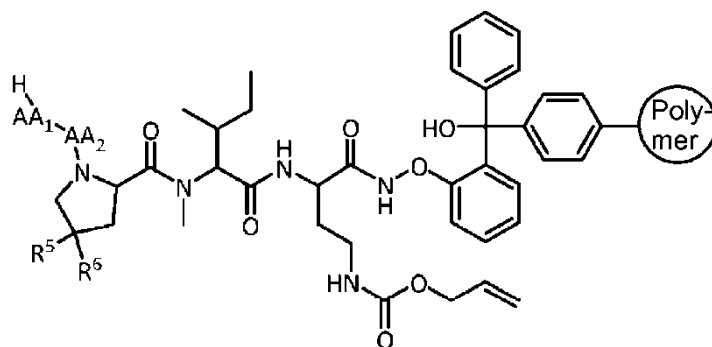
(XXIX) .

Fmoc-AA₁-OH, где AA₁ имеет значения, указанные выше, присоединяют к продукту формулы (XXIX) с получением продукта формулы (XXX):



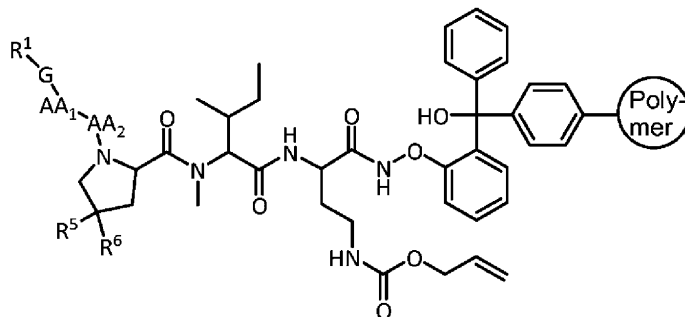
(XXX)

с использованием связующего агента, такого как N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC), в присутствии или в отсутствие добавки, такой как этилциано(гидроксимино)ацетат (Охута риге), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции 1 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо. Защитную группу Fmoc из соединения формулы (XXX) удаляют раствором аминного основания, таким как раствор пиперидина в ДМФ и/или смесь пиперидин/DBU/толуол/ДМФ, с получением соединения формулы (XXXI):



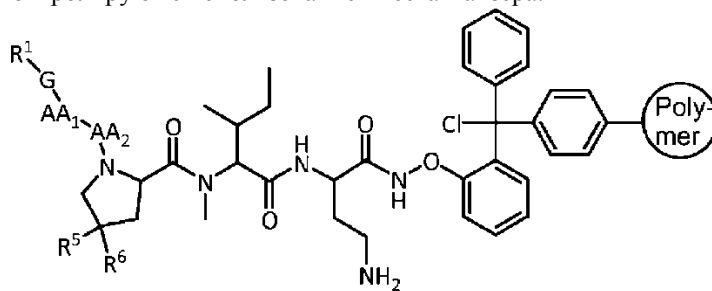
(XXXI).

Группу R¹-G-, где R¹ и G такие, как указано в настоящем документе выше, присоединяют к соединению формулы (XXXI) с использованием связующего агента, такого как N,N'-диизопропилкарбодимид (DIC), в присутствии или в отсутствие добавки, такой как этилциано(гидроксимино) ацетат (Oxuma pure), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции 1 ч. Степень связывания можно контролировать с использованием теста Кайзера, и повторное связывание осуществляют в тех же условиях, если это необходимо.



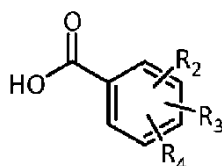
(XXXII)

Защитную группу alloc у соединения формулы (XXXII) удаляют с получением соединения формулы (XXXIII) путем суспендирования соединения формулы (XXXII) в органическом растворителе, таком как DCM, и добавления к нему фенилсилана, при этом в суспензию барботируют N₂. Затем добавляют тетракис(трифенилфосфин)палладий (0), и барботирование N₂ продолжают в течение 5 мин. После этого реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Степень удаления защитной группы alloc контролируют с использованием теста Кайзера.



(XXXIII)

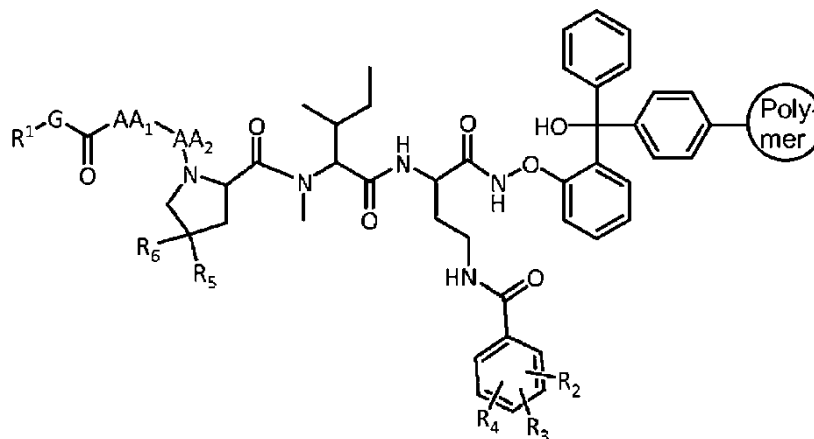
Затем продукт формулы (XVIII)



(XVIII),

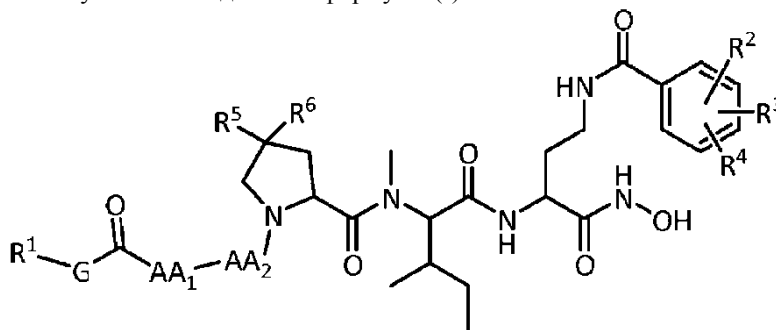
где R², R³ и R⁴ имеют значения, указанные выше, соединяют с аминогруппой боковой цепи фрагмента диаминобутановой кислоты соединения (XXXIII) с использованием связующего агента, такого как N, N'-диизопропилкарбодимид (DIC), в присутствии или в отсутствие добавки, такой как этил циано-

но(гидроксиимино)ацетат (Охута риге), в подходящем органическом растворителе, таком как ДМФ. Смесь перемешивают в течение всего времени реакции 1 ч. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ, MeOH и DCM. Степень завершения реакции связывания контролируют с использованием теста Кайзера. Стадию повторного связывания соединения формулы (XVIII) проводят, когда колориметрический тест показывает, что реакция связывания не полностью завершена. Эта стадия дает соединение формулы (XXXIV).



(XXXIV)

Соединение формулы (XXXIV) отщепляют от смолы с помощью добавления кислоты, такой как трифторуксусная кислота (ТФУ), в DCM (ТФУ/DCM 5:95). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин. По истечении этого времени смолу отфильтровывают и промывают несколько раз ТФУ/DCM (5:95) и затем DCM. После этого полученные фильтраты объединяют, и растворитель выпаривают в вакууме с получением соединения формулы (I):

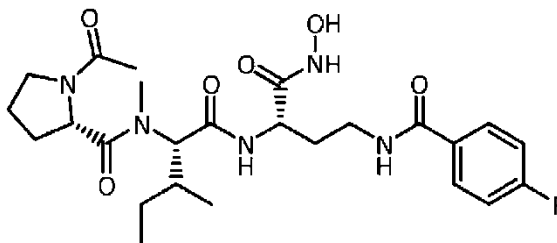


(I).

Примеры

Пример 1.

(2S)-1-ацетил-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(4-фторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамида:



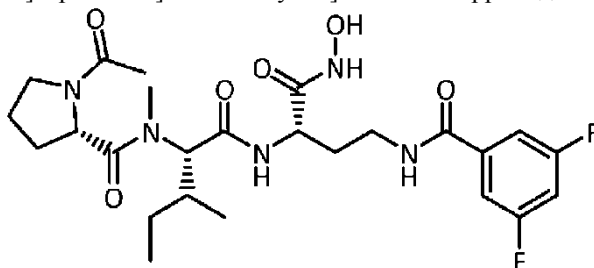
0,8 экв. коммерчески доступного Fmoc-L-Dab(Alloc)-OH и DIEA (4 экв.) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают, и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Nα-Fmoc-L-изолейцина (Fmoc-L-Ile-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле, и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc

удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для N-метилирования аминогруппы фрагмента Ile свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM, и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования аминогруппы Ile ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-Pro-OH, для этой цели 3 экв. аминокислоты 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле, и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин, и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 4-фторбензойной кислоты на боковую цепь фрагмента Dab к смоле добавляют 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. TBTU и 6 экв. DIEA в ДМФ. Реакции дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM, и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют, и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt, и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным солевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 1. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 2.

(2S)-1-ацетил-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-
(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид:



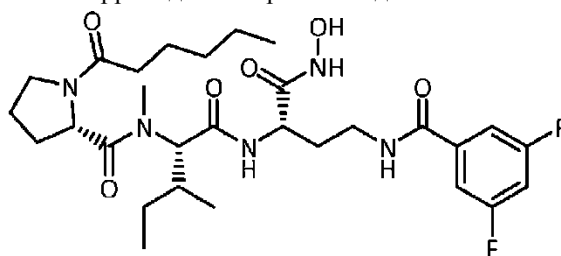
0,8 экв коммерчески доступного Fmoc-L-Dab(Alloc)-OH и DIEA (4 экв) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Fmoc-L-Ile-OH 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к

смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для N-метилирования аминогруппы фрагмента He свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-Метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования аминогруппы He ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-Pro-OH, для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты на боковую цепь фрагмента Dab к смоле добавляют 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. TBTU и 6 экв. DIEA в ДМФ. Реакции дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют, и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt, и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 2. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 3.

(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-1-гексаноил-N-метилпирролидин-2-карбоксамид:



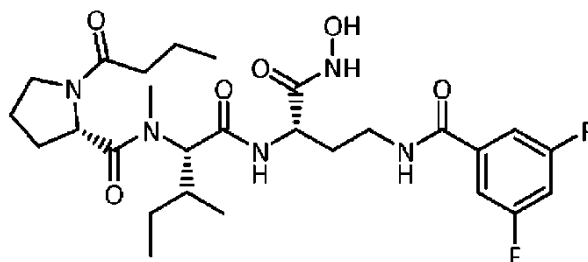
0,8 экв. коммерчески доступного Fmoc-L-Dab(Alloc)-OH и DIEA (4 экв.) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают, и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Fmoc-L-Ile-OH 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в не-

большом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле, и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для N-метилирования аминогруппы фрагмента Ile свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM, и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования аминогруппы Ile ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-Pro-OH, для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Гексановую кислоту присоединяют к Pro-фрагменту, добавляя к смоле 20 экв. кислоты, 10 экв. связывающего реагента DPCDI и 10 экв. добавочной HOAt. Реакционную смесь перемешивают вручную с перерывами в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты на боковую цепь фрагмента Dab к смоле добавляют 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. TBUTU и 6 экв. DIEA в ДМФ. Реакции дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют, и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют, и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксифенил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC-HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt, и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5), и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 3. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 4.

(2S)-1-бутаноил-N-[(1S)-1-[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид:



0,8 экв. коммерчески доступного Fmoc-L-Dab(Alloc)-OH и DIEA (4 экв.) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин

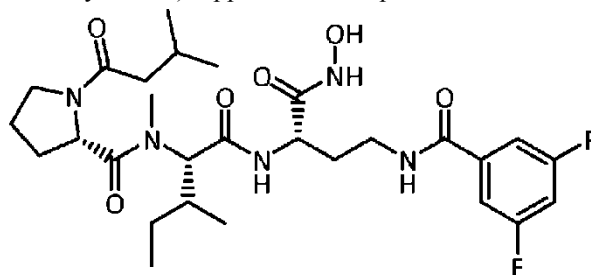
раствор отфильтровывают, и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Fmoc-L-Ile-OH 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для N-метилования аминогруппы фрагмента Ile свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-метилование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилования амино группы Ile ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-Pro-OH, для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Гексановую кислоту присоединяют к Pro-фрагменту, добавляя к смоле 20 экв. кислоты, 10 экв. связывающего реагента DPCDI и 10 экв. добавочной HOAt.

Реакционную смесь перемешивают вручную с перерывами в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты на боковую цепь фрагмента Dab к смоле добавляют 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. TBTU и 6 экв. DIEA в ДМФ. Реакции дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют, и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют, и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC-HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt, и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 4. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 5.

(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(3-метилбутаноил)пирролидин-2-карбоксамид:

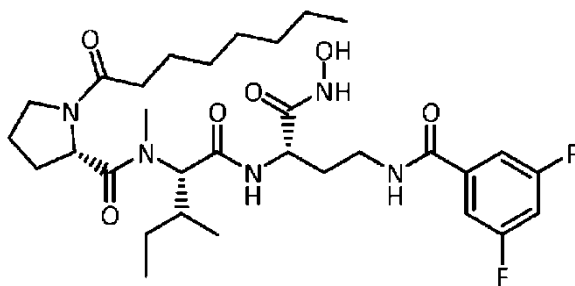


0,8 экв. коммерчески доступного Fmoc-L-Dab(Alloc)-OH и DIEA (4 экв.) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Fmoc-L-Ile-OH 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для N-метилования аминогруппы фрагмента Ile свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-метилование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилования аминогруппы Ile ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-Pro-OH, для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле, и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Гексановую кислоту присоединяют к Pro-фрагменту, добавляя к смоле 20 экв. кислоты, 10 экв. связывающего реагента DPCDI и 10 экв. добавочной HOAt. Реакционную смесь перемешивают вручную с перерывами в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты на боковую цепь фрагмента Dab к смоле добавляют 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. TBTU и 6 экв. DIEA в ДМФ. Реакции дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt, и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 5. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 6.

(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-окстаноилпирролидин-2-карбоксамид:

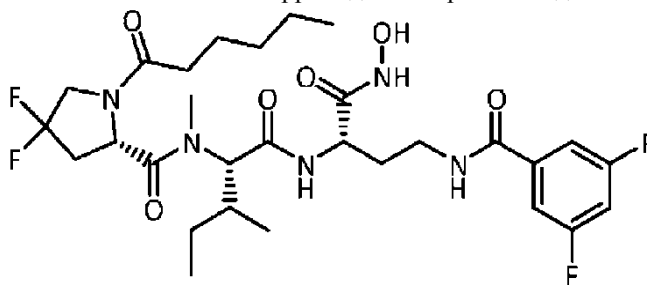


0,8 экв. коммерчески доступного Fmoc-L-Dab(Alloc)-OH и DIEA (4 экв.) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Fmoc-L-Ile-OH 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для N-метилирования аминогруппы фрагмента Ile свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования аминогруппы Ile ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-Pro-OH, для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Гексановую кислоту присоединяют к Pro-фрагменту, добавляя к смоле 20 экв. кислоты, 10 экв. связывающего реагента DPCDI и 10 экв. добавочной HOAt. Реакционную смесь перемешивают вручную с перерывами в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты на боковую цепь фрагмента Dab к смоле добавляют 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. TBUTU и 6 экв. DIEA в ДМФ. Реакции дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 6. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 7.

(2S)-N-[(1S)-1-[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4,4-дифтор-1-гексаноил-N-метилпирролидин-2-карбоксамид:



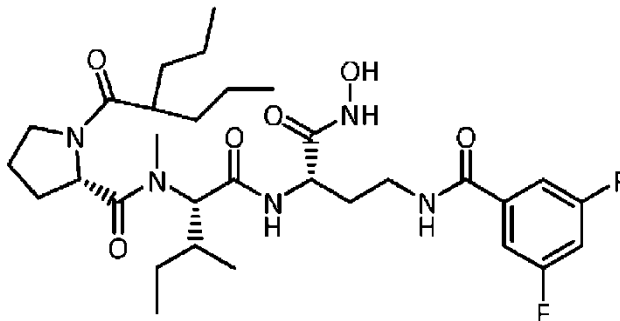
0,8 экв. коммерчески доступного Fmoc-L-Dab(Alloc)-OH и DIEA (4 экв.) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Fmoc-L-Ile-OH 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для N-метилирования аминогруппы фрагмента Ile свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-Метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования аминогруппы Ile ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют фрагмент Fmoc-L-(4,4-дифтор) Pro-OH, для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Гексановую кислоту присоединяют к Pro-фрагменту, добавляя к смоле 20 экв. кислоты, 10 экв. связывающего реагента DPCDI и 10 экв. добавочной HOAt. Реакционную смесь перемешивают вручную с перерывами в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты на боковую цепь фрагмента Dab к смоле добавляют 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. TBTU и 6 экв. DIEA в ДМФ. Реакции дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добав-

ляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 7. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 8.

(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(2-пропилпентаноил)пирролидин-2-карбоксамид:

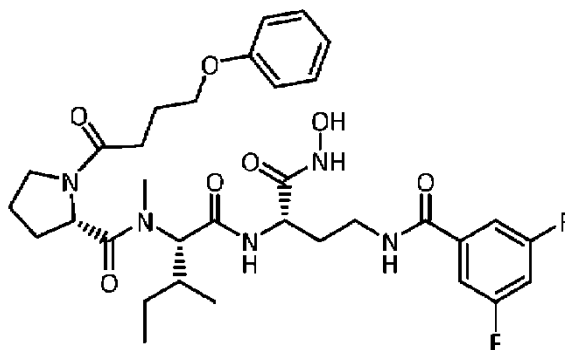


1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания N α -Fmoc-N γ -alloc-1-2, 4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). 2-пропилпентановую кислоту присоединяют к пролиновой части путем добавления к смоле 3 экв. кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure, растворенных в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешанных в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по примеру 8. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 9.

(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(4-феноксипентаноил)пирролидин-2-карбоксамид:

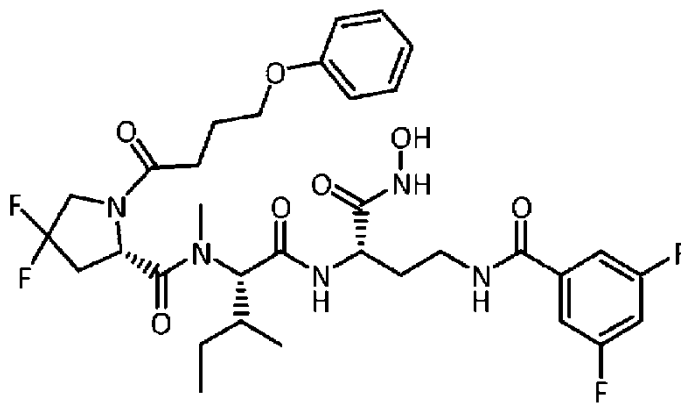


1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания N α -Fmoc-N γ -alloc-L-2,4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). 4-Феноксипропановую кислоту присоединяют к пролиновому фрагменту, добавляя к смоле 3 экв. кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure, растворенных в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешанных в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по примеру 9. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 10.

(2S)-N-[(1S)-1-[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4,4-дифтор-N-метил-1-(4-феноксипропаноил)пирролидин-2-карбоксамид:

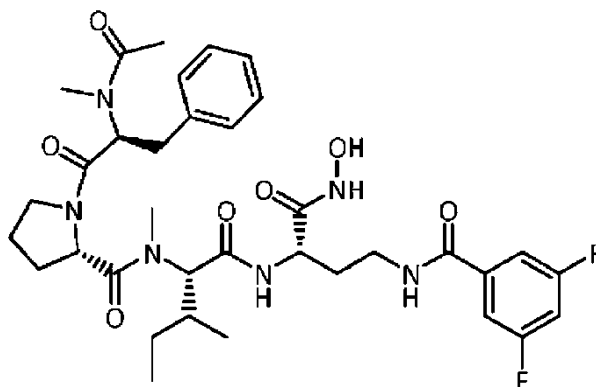


1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания N α -Fmoc-N γ -alloc-L-2,4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-4,4-дифтор-L-пролин, для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). 4-Феноксипропановую кислоту присоединяют к пролиновому фрагменту, добавляя к смоле 3 экв. кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure, растворенных в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешанных в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по примеру 10. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 11.

(2S)-1-[(2S)-2-[ацетил(метил)амино]-3-фенилпропаноил]-N-[(1S)-1-[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид:

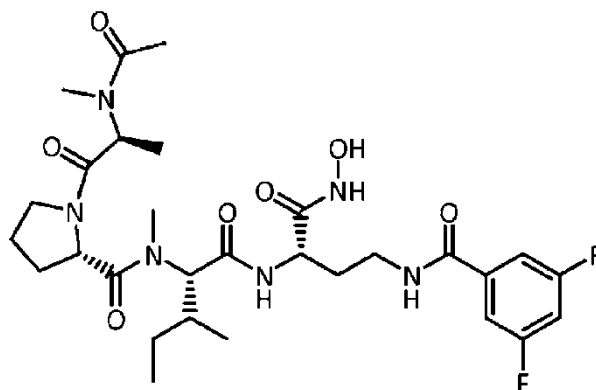


1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания N α -Fmoc-N γ -alloc-1-2, 4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-фенилаланин (Fmoc-NMe-L-Phe-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по примеру 11. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 12.

(2S)-1-[(2S)-2-[ацетил(метил)амино]пропаноил]-N-[(1S)-1-[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид:



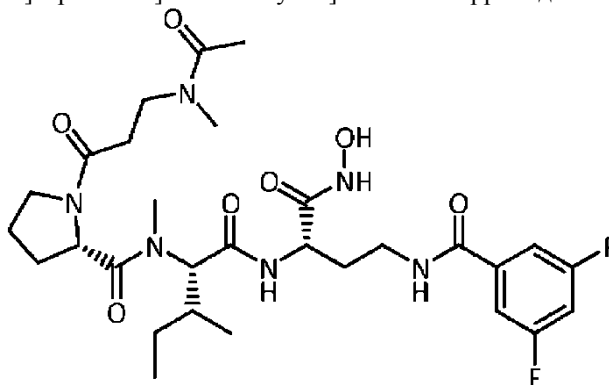
1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Nα-Fmoc-Nγ-alloc-L-2,4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле, и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). N-Метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования аминогруппы Ala, ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по

примеру 12. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 13.

(2S)-1-[3-[ацетил(метил)амино]пропаноил]-N-[(1S)-1-[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксаимид:

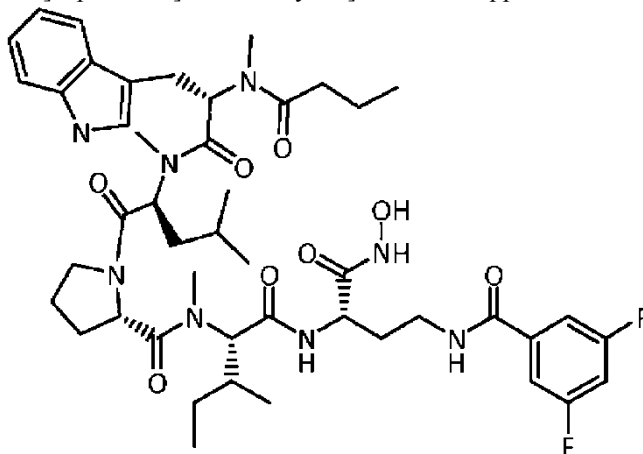


1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания N α -Fmoc-N γ -alloc-1-2, 4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc- β -аланин (Fmoc- β -Ala-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). N-Метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования аминогруппы β -Ala, ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β -меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N $_2$. Затем добавляют 0,1 экв. Pd(PPh $_3$) $_4$, продолжая барботировать N $_2$, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по примеру 13. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 14.

(2S)-1-[(2S)-2-[[[2S)-2-[(бутианоил(метил)амино]-3-(1H-индол-3-ил)пропаноил]метиламино]-4-метилпентаноил]-N-[(1S)-1-[[[1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид:



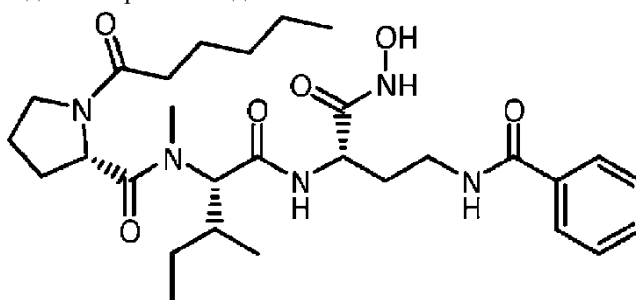
1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, DMF и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в DMF (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания N α -Fmoc-N γ -alloc-1-2, 4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Oxima pure растворяют в небольшом количестве DMF и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в DMF (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве DMF и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в DMF (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве DMF и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в DMF (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/DMF (5:5:20:70) (1×5'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-лейцин (Fmoc-NMeLeu-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве DMF и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в DMF (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент N α -Fmoc-N(in)-Boc-N-метил-L-триптофан (Fmoc-NMe-L-Trp(Boc)-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве DMF и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в DMF (1×5', 1×10' и 1×15'). Бутановую кислоту присоединяют к триптофановому фрагменту, добавляя к смоле 3 экв. кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure, растворенных в небольшом количестве DMF и предварительно смешанных в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают DMF и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при

этом в смесь барботируют N_2 . Затем добавляют 0,1 экв. $Pd(PPh_3)_4$, продолжая барботировать N_2 , пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения 3,5-дифторбензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Охута риге растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по примеру 14. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 15.

(2S)-N-[(1S)-1-[(1S)-3-бензамидо-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-гексаноилпирролидин-2-карбоксамид:



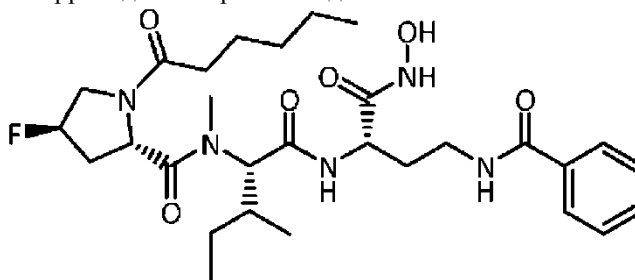
1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания $N\alpha$ -Fmoc- $N\gamma$ -alloc-L-2, 4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Охута риге растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Охута риге растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Охута риге растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Гексановую кислоту присоединяют к пролиновому фрагменту, добавляя к смоле 3 экв. кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Охута риге, растворенных в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешанных в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Затем реакционную смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N_2 . Затем добавляют 0,1 экв. $Pd(PPh_3)_4$, продолжая барботировать N_2 , пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения бензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Охута риге растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого

времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакцию смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по примеру 15. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Пример 16.

(2S,4R)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-бензамидо-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4-фтор-N-метил-1-гексаноилпирролидин-2-карбоксамид:



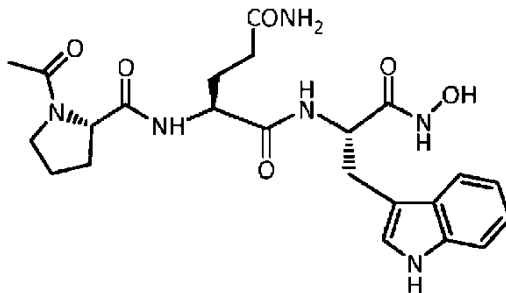
1,5 экв. коммерчески доступного Fmoc-NH-OH и DIEA (10 экв.) добавляют к 2-хлортритильной смоле в 2 мл DCM. Смесь периодически перемешивают в течение 24 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Nα-Fmoc-Nγ-alloc-L-2,4-диаминобутановой кислоты (Fmoc-L-Dab(alloc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. добавочного Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-N-метил-L-изолейцин (Fmoc-NMe-L-Ile-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). После этого присоединяют фрагмент Fmoc-транс-4-фтор-L-пролин (Fmoc-L-(F)Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Гексановую кислоту присоединяют к пролиновому фрагменту, добавляя к смоле 3 экв. кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure, растворенных в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешанных в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. Затем реакцию смесь отфильтровывают и смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. Степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для удаления группы Alloc к смоле добавляют 10 экв. фенилсилана в DCM, при этом в смесь барботируют N₂. Затем добавляют 0,1 экв Pd(PPh₃)₄, продолжая барботировать N₂, пока все хорошо не перемешается. Затем реакционный сосуд герметизируют и встряхивают в течение 15 мин. По истечении этого времени реакционную смесь фильтруют и смолу тщательно промывают. Такую же обработку повторяют еще два раза. После последней обработки смолу тщательно промывают DCM, MeOH и ДМФ. Для присоединения бензойной кислоты к боковой цепи диаминоэтилового фрагмента 3 экв. указанной кислоты, 3 экв. связывающего агента DIC и 3 экв. Oxima pure растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. Полученную смесь добавляют к смоле и реакции дают протекать в течение 60 мин. По истечении этого времени смолу промывают ДМФ и DCM и степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид отщепляют от смолы путем добавления раствора DCM/ТФУ (95:5), смеси дают реагировать в течение 15 мин. Затем реакцию смесь фильтруют и смолу промывают DCM. Эту процедуру отщепления повторяют дважды. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме, получая соединение по примеру 16. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Сравнительные примеры

Сравнительный пример 17.

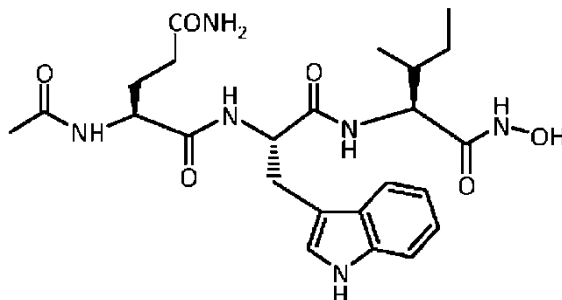
(2S)-2-[[[(2S)-1-ацетилпирролидин-2-карбонил)амино]-N-[(1S)-2-(гидроксиамино)-1-(1H-индол-3-илметил)-2-оксо-этил]пентандиаמיד:



К смоле в 2 мл ДМФ добавляют 0,8 экв. коммерчески доступного N α -Fmoc-N(in)-Вос-L-триптофана (Fmoc-L-Trp (Вос)-ОН) и DIEA (4 экв.). Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10' и 1 $\times$ 15'). Для связывания N α -Fmoc-N δ -тритил-L-глутамина (Fmoc-L-Gln(Trt)-ОН) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10'). Затем присоединяют Fmoc-L-Proline (Fmoc-L-Pro-ОН), для этой цели 3 экв. аминокислоты 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10' и 1 $\times$ 15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1 $\times$ 5'). Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксифенил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC-HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N $_2$ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N $_2$, получая соединение по примеру 17. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Сравнительный пример 18.

(2S)-2-ацетидамо-N-[(1S)-2-[[[(1S)-1-(гидроксикарбамоил)-2-метилбутил]амино]-1-(1H-индол-3-илметил)-2-оксо-этил]пентандиаמיד:



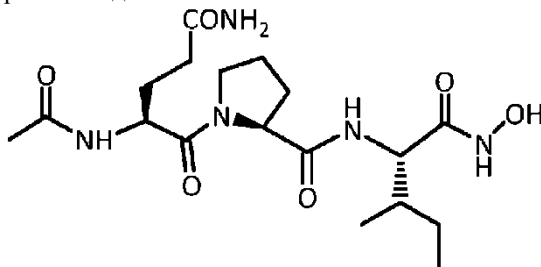
0,8 экв. коммерчески доступного Fmoc-L-изолейцина (Fmoc-L-Ile-ОН) и DIEA (4 экв.) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакцион-

ной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Nα-Fmoc-N(in)-Boc-L-триптофана (Fmoc-L-Trp(Boc)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10'). Затем добавляют 5-трет-бутиловый эфир Fmoc-L-глутаминовой кислоты (Fmoc-L-Glu (tBu)-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты, 3 экв. соединительного агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 18. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Сравнительный пример 19.

(2S)-1-[(2S)-2-ацетиамидо-5-амино-5-оксо-пентаноил]-N-[(1S)-1-(гидроксикарбамоил)-2-метилбутил]пирролидин-2-карбоксамид:



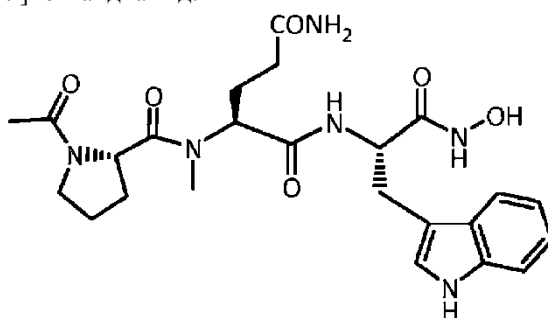
0,8 экв. коммерчески доступного Fmoc-L-изолейцина (Fmoc-L-Ile-OH) и DIEA (4 экв.) добавляют к смоле в 2 мл ДМФ. Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают, и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Fmoc-L-Proline (Fmoc-L-Pro-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10'). Для связывания Nα-Fmoc-Nδ-третил-L-глутамин (Fmoc-L-Gln(Trt)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлора-

нильного теста.

Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 19. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Сравнительный пример 20.

(2S)-2-[[[(2S)-1-ацетилпирролидин-2-карбонил]метиламино]-N-[(1S)-2-(гидроксиамино)-1-(1H-индол-3-илметил)-2-оксо-этил]пентандиамида:

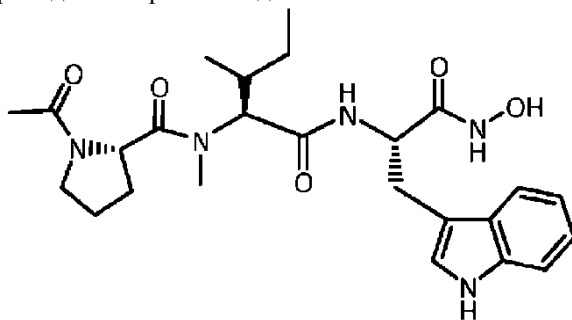


К смоле в 2 мл ДМФ добавляют 0,8 экв. коммерчески доступного N α -Fmoc-N(in)-Boc-L-триптофана (Fmoc-L-Trp (Boc)-OH) и DIEA (4 экв.). Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10' и 1 $\times$ 15'). Для связывания N α -Fmoc-N δ -тритил-L-глутамина (Fmoc-L-Gln(Trt)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10'). Для N-метилирования аминогруппы фрагмента Gln свободную аминогруппу защищают орто-нитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-Метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования амино группы Gln ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β -меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1 $\times$ 10' и 1 $\times$ 40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10' и 1 $\times$ 15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1 $\times$ 5'). Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид

используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N₂, получая соединение по примеру 20. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Сравнительный пример 21.

(2S)-1-ацетил-N-[(1S)-1-[(1S)-2-(гидроксиамино)-1-(1H-индол-3-илметил)-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид:



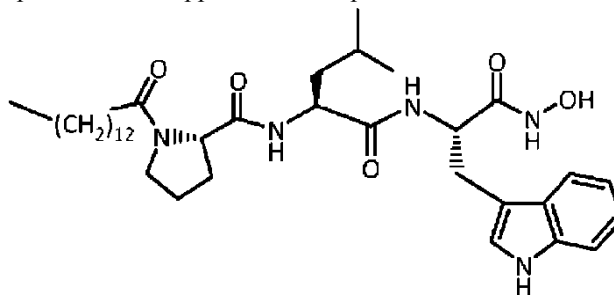
К смоле в 2 мл ДМФ добавляют 0,8 экв. коммерчески доступного Nα-Fmoc-N(in)-Boc-L-триптофана (Fmoc-L-Trp(Boc)-OH) и DIEA (4 экв.). Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Nα-Fmoc-L-изолейцина (Fmoc-L-Ile-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин.

После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10'). Для N-метилирования аминогруппы фрагмента Ile свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-Метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования амино группы Ile ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β-меркаптоэтанола и 5 экв. DBU (1×10' и 1×40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Для ацетилирования концевой части N-части пептида к смоле добавляют 20 экв. уксусного ангидрида и 20 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 30 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют, и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксиамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N₂ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат

сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N_2 , получая соединение по примеру 21. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Сравнительный пример 22.

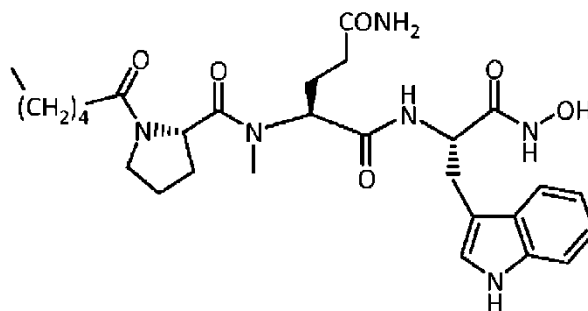
(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-(гидроксиамино)-1-(1H-индол-3-илметил)-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-тетрадеканоил-пирролидин-2-карбоксамид:



К смоле в 2 мл ДМФ добавляют 0,8 экв. коммерчески доступного $N\alpha$ -Fmoc-N(in)-Вос-L-триптофана (Fmoc-L-Trp (Вос)-ОН) и DIEA (4 экв.). Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают, и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15'). Для связывания Fmoc-L-лейцина (Fmoc-L-Leu-ОН) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10'). Затем присоединяют Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-ОН), для этой цели 3 экв. аминокислоты 3 экв. связывающего агента TBUTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1×5', 1×10' и 1×15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1×5'). Для защиты N-концевой части пептида к смоле добавляют 3 экв. миристиновой кислоты, 3 экв. соединительного агента TBUTU и 6 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC·HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N_2 в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N_2 , получая соединение по примеру 22. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Сравнительный пример 23.

(2S)-2-[[[(SS)-1-гексаноилпирролидин-2-карбонил]-метиламино]-N-[(1S)-2-(гидроксиамино)-1-(1H-индол-3-илметил)-2-оксо-этил]пентандиамид:



К смоле в 2 мл ДМФ добавляют 0,8 экв. коммерчески доступного N α -Fmoc-N(in)-Boc-L-триптофана (Fmoc-L-Trp (Boc)-OH) и DIEA (4 экв.). Смесь периодически перемешивают вручную в течение 1 ч. После этого к реакционной смеси добавляют 0,5 мл/г MeOH для закрытия оставшихся реакционно активных участков смолы. Через 15 мин раствор отфильтровывают и смолу тщательно промывают DCM, ДМФ и MeOH. Удаление Fmoc достигается обработкой смолы 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10' и 1 $\times$ 15'). Для связывания N α -Fmoc-N δ -тритил-L-глутамина (Fmoc-L-Gln(Trt)-OH) 3 экв. аминокислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10'). Для N-метилирования аминогруппы фрагмента Gln свободную аминогруппу защищают ортонитробензолсульфонилхлоридом (4 экв.) с использованием в качестве основания коллидина (10 экв.) в ДМФ, которому дают возможность взаимодействовать со смолой в течение 30 мин. Затем смолу промывают ДМФ и DCM и в тех же условиях снова повторяют стадию защиты. Степень завершения защиты контролируют с использованием теста Кайзера. N-Метилирование аминогруппы осуществляют путем обработки смолы 3 экв. 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ена и 4 экв. паранитробензолсульфоната в ДМФ в течение 30 мин (3 обработки). Между обработками смолу тщательно промывают ДМФ и DCM. После N-метилирования амино группы Gln ортонитробензолсульфонильную защитную группу удаляют путем обработки смолы 10 экв. β -меркаптоэтанолом и 5 экв. DBU (1 $\times$ 10' и 1 $\times$ 40'). Удаление ортонитробензолсульфонильной группы оценивают с использованием хлоранильного теста. Затем присоединяют Fmoc-L-пролин (Fmoc-L-Pro-OH), для этой цели 3 экв. аминокислоты 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA растворяют в небольшом количестве ДМФ и предварительно смешивают в течение 2 мин. После чего смесь добавляют к смоле и реакционной смеси дают возможность взаимодействовать в течение 90 мин. Степень завершения реакции контролируют с использованием теста Кайзера. Затем группу Fmoc удаляют обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФ (1 $\times$ 5', 1 $\times$ 10' и 1 $\times$ 15') и дополнительной обработкой смесью пиперидин/DBU/толуол/ДМФ (5:5:20:70) (1 $\times$ 5'). Для защиты N-концевой части пептида к смоле добавляют 3 экв. гексановой кислоты, 3 экв. связывающего агента TBTU и 6 экв. DIEA. Смеси дают возможность взаимодействовать в течение 60 мин и степень завершения реакции контролируют с использованием хлоранильного теста. Для отщепления пептида смолу несколько раз промывают DCM и сушат отсасыванием. Пептид с защищенной боковой линейной цепью отщепляют от смолы путем добавления раствора HFIP/DCM (1:4), смеси дают возможность взаимодействовать в течение 15 мин. Затем реакционную смесь фильтруют и смолу промывают HFIP/DCM. Эту процедуру отщепления повторяют во второй раз. Все фильтраты объединяют, и растворитель выпаривают в вакууме. Сырой пептид используют для образования гидроксамида в растворе без предварительной очистки. Пептид растворяют в DCM. После чего добавляют 3,5 экв. O-(2,4-диметоксибензил)гидроксиламина, 5 экв. 4-метилморфолина, 1,3 экв. связывающего агента EDC $\cdot$ HCl и 1,3 экв. добавочной HOAt и смеси дают возможность реагировать в атмосфере N $_2$ в течение ночи. Степень завершения реакции контролируют с использованием ВЭЖХ. После получения желаемого продукта смесь промывают 1н HCl, водой и насыщенным соевым раствором. Затем органический слой сушат сульфатом магния, фильтруют и выпаривают. После этого к пептидному сырому продукту добавляют смесь ТФУ/вода/TIS (95:2,5:2,5) и смесь слегка перемешивают в течение 2 ч. Затем ТФУ выпаривают в токе N $_2$, получая соединение по примеру 23. Соединение очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Эксперименты

Определение ингибирующего действия новых соединений на MMP-2 и MMP-9 матрикса

Общие положения.

Все эксперименты проводили в реакционном буфере 1 $\times$, который готовили из реакционного буферного раствора 10 $\times$. Состав реакционного буфера 10 $\times$: 50 мл 0,5 М трис-HCl, 1,5 М NaCl, 50 mM CaCl $_2$ и 2 mM азида натрия при pH 7,6. Для получения реакционного буфера 1 $\times$ 4 мл реакционного буфера 10 $\times$ разводили в 36 мл H $_2$ O.

Анализ ингибирования MMP-2.

Рекомбинантный MMP-2, экспрессируемый в клетках яичника китайского хомячка (CHO), был по-

лучен от компании Merck-Millipore (номер каталога PF023-5UG). Желатин DQ кожи свиньи, конъюгированный с флуоресцеином (субстрат MMP-2) получали от компании Life Technologies (номер каталога E12055).

Получение MMP-2 для анализа активности.

MMP-2 готовили в виде маточного раствора (0,1 мг/мл). Фермент разводили в реакционном буфере 1× до конечной концентрации 5 мкг/мл.

Получение раствора желатина DQ (субстрата) для анализа активности: твердую форму субстрата растворяли в воде для получения маточного раствора 1 мг/мл.

Методика.

Ферментативные анализы проводили в 96-луночном планшете для микротитрования, что позволяло проводить одновременный мониторинг нескольких реакций. Для каждой реакции в каждую лунку добавляли 86,3 мкл реакционного буфера 1× (pH 7,6), 1,7 мкл MMP-2 (конечная концентрация 85 нг/мл) и 2 мкл соответствующего нового соединения. Маточный раствор нового соединения готовили в ДМСО (100 мМ), и разведения делали из этого маточного раствора в ДМСО. В конце к смеси, содержащейся в каждой лунке, добавляли 10 мкл субстрата (конечная концентрация 50 мкг/мл). Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере (100 об/мин).

Ингибирующую активность нового соединения измеряли флуориметрически. Длина волн возбуждения и излучения составляла 483 и 525 нм соответственно.

Анализ ингибирования MMP-9.

Рекомбинантный MMP-9 получали от компании Merck-Millipore (номер каталога PF140-5UG, используемый в примерах 1-9 и в сравнительных примерах) и Enzo (номер каталога SE360-0010, используемый в примерах 10-16). Желатин DQ кожи свиньи, конъюгированный с флуоресцеином (субстрат MMP-9) получали от компании Life Technologies (номер каталога E12055).

Получение MMP-9 для анализа активности.

MMP-9 готовили в виде маточного раствора (0,1 мг/мл). Фермент разводили в реакционном буфере 1× до конечной концентрации 5 мкг/мл.

Получение раствора желатина DQ (субстрата) для анализа активности: твердую форму субстрата растворяли в воде с получением маточного раствора 1 мг/мл.

Методика.

Ферментативные анализы проводили на 96-луночном планшете для микротитрования, что позволяло проводить одновременный мониторинг нескольких реакций. Для каждой реакции в каждую лунку добавляли 84,6 мкл реакционного буфера 1× (pH 7,6), 3,4 мкл MMP-9 (конечная концентрация 85 нг/мл) и 2 мкл соответствующего нового соединения. Маточный раствор нового соединения готовили в ДМСО (100 мМ) и разведения получали из этого маточного раствора в ДМСО. В конце к смеси, содержащейся в каждой лунке, добавляли 10 мкл субстрата (конечная концентрация 50 мкг/мл). Реакционную смесь инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере (100 об/мин).

Ингибирующую активность нового соединения измеряли флуориметрически. Длина волн возбуждения и излучения составляла 483 и 525 нм соответственно.

Ингибирующую активность в нескольких точках концентрации (от 100 до 200 мкМ MMP) измеряли для каждого соединения. Ингибирующую активность на MMP-2 и MMP-9 рассчитывали согласно уравнению 1. Для каждого нового соединения измеряли флуоресценцию в присутствии (а) и в отсутствие (b) соответствующей MMP. Максимальная флуоресценция (ингибирующая активность 0%) была получена у образца соответствующего MMP в отсутствие ингибирующих соединений. Для оценки ингибирующей активности новых соединений величины активности были графически представлены в зависимости от логарифмической концентрации соединения, корректируя с сигмовидной кривой с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, и значение IC_{50} , определяемое как концентрация соединения, требуемая для ингибирования 50% соответствующей активности MMP, определялось по полученной кривой.

$$\text{Ингибирующая активность (\%)} = \left[1 - \left(\frac{a - b}{c - d} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Уравнение 1})$$

где

a соответствует интенсивности флуоресценции в присутствии смеси субстрат+исследуемое соединение+MMP;

b соответствует интенсивности флуоресценции в присутствии смеси субстрат+исследуемое соединение;

c соответствует интенсивности флуоресценции в присутствии смеси субстрат+MMP;

d соответствует интенсивности флуоресценции в присутствии субстрата.

Новые соединения показали высокую ингибирующую способность в отношении MMP-2 и MMP-9. Результаты обобщены в табл. 1.

Таблица 1. Ингибирование MMP-2 и MMP-9

Соединение (пример №)	MMP-2 IC ₅₀ (нМ)	MMP-9 IC ₅₀ (нМ)
1	202	1260
2	242	301
3	81	395
4	62	235
5	116	601
6	400	733
7	159	713
8	974	263
9	362	506
10	37	223
11	174	71
12	21	136
13	1149	339
14	116	46
15	285	702
16	<1	10
C17	$1,1 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^6$
C18	$7,1 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^5$
C19	$>2 \cdot 10^6$	$>2 \cdot 10^6$
C20	$5,3 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$
C21	$1,1 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^4$
C22	$4,8 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
C23	$>2 \cdot 10^6$	$>1 \cdot 10^6$

Ингибирующая активность в отношении родственных протеаз MMP-2 и MMP-9: анализ ингибирования MMP-1, MMP-3 и MMP-7

Общие положения.

Все эксперименты проводили в реакционном буфере 1×, который был получен из реакционного буферного раствора 10×. Состав реакционного буфера 10×: 50 мл 0,5 М трис-HCl, 1,5 М NaCl, 50 мМ CaCl₂ и 2 мМ азида натрия при pH 7,6. Для получения реакционного буфера 1× 4 мл реакционного буфера 10× разводили в 36 мл H₂O.

Анализ ингибирования MMP-1.

Рекомбинантный MMP-1, экспрессированный в E. Coli, был получен от компании Enzo Life Sciences (номер каталога BML-SE180). Мса-PLGL-Dpa-AR-NH₂ (флуорогенный пептидный субстрат) был получен от компании R&D Systems (номер каталога ES001).

Получение MMP-1 для анализа активности.

MMP-1 готовили в виде маточного раствора (0,55 мг/мл). Фермент разводили в реакционном буфере 1× до конечной концентрации 276 мкг/мл.

Пептидный субстрат MMP-1 был предоставлен в виде маточного раствора в ДМСО (6 мМ). Для анализа субстрат разводили реакционным буфером 1× до концентрации 100 мкМ.

Метод.

Ферментативные анализы проводили на 96-луночной планшете для микротитрования, что позволяло проводить одновременный мониторинг нескольких реакций. Для каждой реакции добавляли 86 мкл реакционного буфера 1× (pH 7,6), 2 мкл MMP-1 (конечная концентрация 5,52 нМ) и 2 мкл соответствующего нового соединения для каждой лунки. Маточный раствор нового соединения готовили в ДМСО (100 мМ) и разведения готовили из этого маточного раствора в ДМСО. В конце к смеси, содержащейся в

каждой лунке, добавляли 10 мкл субстрата (конечная концентрация 10 мкМ). Реакционную смесь инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере (100 об/мин).

Ингибирующую активность нового соединения измеряли флуориметрически. Длина волн возбуждения и излучения составляла 320 и 405 нм соответственно.

Анализ ингибирования MMP-3.

Рекомбинантный MMP-3, экспрессированный в *E. Coli*, был получен от компании Merck-Millipore (номер каталога 44217). Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH₂ (флуорогенный пептидный субстрат) был получен от компании R&D Systems (номер каталога ES002).

Получение MMP-3 для анализа активности.

MMP-3 готовили в виде маточного раствора (0,1 мг/мл). Фермент разводили водой до конечной концентрации 0,005 мг/мл.

Пептидный субстрат MMP-1 был предоставлен в виде маточного раствора в ДМСО (4,5 мм). Для анализа субстрат разводили реакционным буфером 1× до концентрации 100 мкМ.

Методика.

Ферментативные анализы проводили на 96-луночном планшете для микротитрования, что позволяло проводить одновременный мониторинг нескольких реакций. Для каждой реакции в каждую лунку добавляли 84,6 мкл реакционного буфера 1× (pH 7,6), 3,4 мкл MMP-9 (конечная концентрация 85 нг/мл) и 2 мкл соответствующего нового соединения. Маточный раствор нового соединения готовили в ДМСО (100 мМ) и разведения получали из этого маточного раствора в ДМСО. В конце к смеси, содержащейся в каждой лунке, добавляли 10 мкл субстрата (конечная концентрация 10 мкМ). Реакционную смесь инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере (90 об/мин).

Ингибирующую активность нового соединения измеряли флуориметрически. Длина волн возбуждения и излучения составляла 320 и 405 нм соответственно.

Анализ ингибирования MMP-7.

Рекомбинантный MMP-7, экспрессированный в *E. Coli*, получали от компании Merck-Millipore (номер каталога 44270). Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂ (флуорогенный пептидный субстрат) получали от компании R&D Systems (номер каталога ES001).

Получение MMP-7 для анализа активности.

MMP-7 готовили в виде маточного раствора (2,1 мг/мл). Фермент разводили водой до конечной концентрации 0,005 мг/мл.

Пептидный субстрат MMP-7 получали в виде твердого вещества (1 мг). 4 мМ маточного раствора субстрата в ДМСО готовили добавлением 214,7 мкл ДМСО. После чего в реакционном буфере 1× готовили 100 мкМ раствора субстрата.

Методика.

Ферментативные анализы проводили на 96-луночном планшете для микротитрования, что позволяло проводить одновременный мониторинг нескольких реакций. Для каждой реакции в каждую лунку добавляли 84,6 мкл реакционного буфера 1× (pH 7,6), 3,4 мкл MMP-9 (конечная концентрация 8,3 нМ) и 2 мкл соответствующего нового соединения. Маточный раствор нового соединения готовили в ДМСО (100 мМ) и разведения получали из этого маточного раствора в ДМСО. В заключение к смеси, содержащейся в каждой лунке, добавляли 10 мкл субстрата (конечная концентрация 10 мкМ). Реакционную смесь инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере (90 об/мин).

Ингибирующую активность нового соединения измеряли флуориметрически. Длина волн возбуждения и излучения составляла 320 и 405 нм соответственно.

Ингибирующую активность в нескольких точках концентрации (1, 10, 100 и 200 мкМ) измеряли для каждого соединения.

Ингибирующую активность для MMP-1, MMP-3 и MMP-7 рассчитывали согласно формуле 1 и значение IC₅₀ рассчитывали, как описано выше для MMP-2 и MMP-9.

Значения IC₅₀ показаны в табл. 2.

Таблица 2. IC₅₀ для MMP-1, MMP-3 и MMP-7

Соединение (пример №)	MMP-1 IC ₅₀ (нМ)	MMP-3 IC ₅₀ (нМ)	MMP-7 IC ₅₀ (нМ)
1	$<1 \cdot 10^3$	$3,01 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$
2	$4,94 \cdot 10^6$	$1,92 \cdot 10^7$	$3,14 \cdot 10^7$
3	$6,82 \cdot 10^6$	$2,54 \cdot 10^7$	$6,61 \cdot 10^6$
4	$4,73 \cdot 10^6$	$1,33 \cdot 10^7$	$4,42 \cdot 10^6$
5	$6,68 \cdot 10^6$	$2,57 \cdot 10^7$	$3,48 \cdot 10^6$
6	$2,56 \cdot 10^7$	$5,34 \cdot 10^7$	$5,26 \cdot 10^7$
7	$2,47 \cdot 10^7$	$2,25 \cdot 10^7$	$7,71 \cdot 10^6$
8	$3,65 \cdot 10^6$	$3,81 \cdot 10^6$	$4,10 \cdot 10^6$
9	$1,14 \cdot 10^7$	$3,20 \cdot 10^6$	$4,03 \cdot 10^7$
10	$6,61 \cdot 10^6$	$1,60 \cdot 10^8$	$8,08 \cdot 10^6$
11	$9,13 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^8$	$2,01 \cdot 10^7$
12	$1,49 \cdot 10^7$	$1,57 \cdot 10^8$	$1,41 \cdot 10^7$
13	$2,00 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$	$5,04 \cdot 10^7$
14	$6,07 \cdot 10^6$	$<1,00 \cdot 10^3$	$6,10 \cdot 10^7$
15	$1,08 \cdot 10^7$	$9,89 \cdot 10^6$	$4,12 \cdot 10^7$
16	$<1,00 \cdot 10^3$	$<1,00 \cdot 10^3$	$1,00 \cdot 10^6$
C17	$6,10 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$	$>2 \cdot 10^6$
C18	–	–	–
C19	–	–	–
C20	$>2 \cdot 10^6$	$>2 \cdot 10^6$	$>2 \cdot 10^6$
C21	–	–	–
C22	–	–	–
C23	–	–	–
C24	–	–	–

Как легко можно видеть, при сравнении значений в табл. 2 (показатель IC₅₀ для MMP-1, MMP-3 и MMP-7) со значениями в табл. 1 (показатель IC₅₀ для MMP-2 и MMP-9), соединения по изобретению являются высокоселективными в отношении MMP-2 и MMP-9.

Определение проницаемости соединений

Параллельный анализ искусственной проницаемости мембран (РАМРА)

Параллельный анализ искусственной проницаемости мембран (РАМРА), описанный Kansy et al., J. M. Chem. 1998; 41 (7):1007-10, был использован в настоящем документе для определения способности соединений проникать через гематоэнцефалический барьер (BBB) путем пассивной диффузии (Di L et al., Eur. J. Med. Chem. 2003;38(3):223-32). Эффективную проницаемость (Pe) соединений измеряли при начальной концентрации 200 мкМ. Буферный раствор готовили из коммерческого концентрированного продукта согласно инструкциям производителя. pH доводили до 7,4 с использованием 0,5 М раствора NaOH. Маточный раствор нового соединения готовили в ДМСО и разводили буферным раствором до конечной концентрации 200 мкМ (содержание ДМСО 0,5%). Сэндвич РАМРА отделяли и каждую донорную лунку заполняли 200 мкМ раствором соединения. Акцепторный планшет помещали в донорный планшет, чтобы нижняя сторона мембраны находилась в контакте с буфером. К фильтру каждой лунки добавляли 4 мкл смеси фосфолипидов (20 мг/мл) в додекане и к каждой акцепторной лунке добавляли 200 мкл буферного раствора. Планшет покрывали и инкубировали при комнатной температуре в насыщенной влажностью атмосфере в течение 4 ч при орбитальном перемешивании со скоростью 100 об/мин. Через 4 ч содержимое акцепторных и донорных отделений анализировали с помощью ВЭЖХ: 150 мкл каждой лунки из донорного планшета и 150 мкл каждой лунки из акцепторного планшета переносили в пробирки для ВЭЖХ, вводя каждый образец в обращенно-фазовую колонку C₁₈ (150 мм×4,6 мм×5 мкм, 100 Å) (100 мкл/ввод из акцепторных лунок, 10 мкл/ввод из донорных лунок и для эталонов t₀). Перенос также было

подтвержден с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF).

Используемая фосфолипидная смесь представляла собой экстракт полярных липидов головного мозга свиньи, представленный полярными липидами фирмы Avanti, следующего состава: 12,6% фосфатидилхолина (PC), 33,1% фосфатидилэтаноламина (PE), 18,5% фосфатидилсерина (PS), 4,1% фосфатидилинозитола (PI), 0,8% фосфатидной кислоты и 30,9% других соединений.

Эффективную проницаемость (Pe) рассчитывали через 4 ч с использованием уравнения 2 и процент переноса (T%) рассчитывали с использованием уравнения 3:

$$Pe = \frac{-218.3}{t} \times \log \left[1 - \frac{2Ca(t)}{Cd(t_0)} \right] \times 10^{-6} \text{ см/сек (Уравнение 2)}$$

$$T\% = \frac{Ca(t)}{Cd(t_0)} \times 100 \quad (\text{Уравнение 3})$$

где:

t обозначает время (ч);

Ca (t) обозначает концентрацию соединения в акцепторной лунке во время t

и Cd(t₀) обозначает концентрацию соединения в донорной лунке во время t₀.

Основываясь на предварительной оценке Pe, представленной в табл. 4, новые соединения показывают хорошую проницаемость по BBB (табл. 5).

Таблица 4. Предварительная оценка Pe

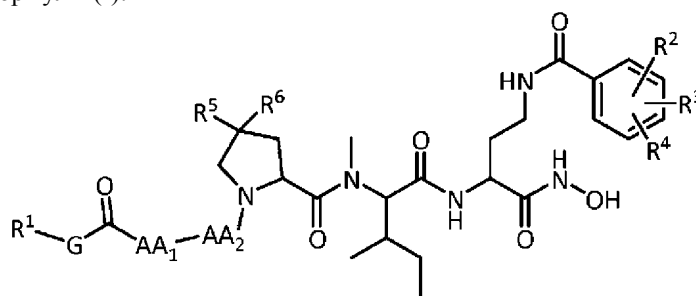
Предварительная оценка Pe (см/сек)	Транспорт внутри CNS
$Pe \geq 4 \cdot 10^{-6}$	Хороший
$2 \cdot 10^{-6} \leq Pe < 4 \cdot 10^{-6}$	Средний
$Pe < 2 \cdot 10^{-6}$	Низкий

Таблица 5. Эффективная проницаемость (Pe) и процент транспорта новых соединений

Соединение (пример №)	Pe (см/сек)	SD	%T	SD
1	$9,4 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^{-8}$	0,4	0,1
2	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-8}$	0,8	0,1
3	$2,3 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-7}$	9,3	0,6
4	$7,4 \cdot 10^{-7}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	3,1	0,6
5	$1,9 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-7}$	7,6	1,4
6	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-7}$	14,3	2,8
7	$11,3 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-8}$	19,0	0,1
8	$4,7 \cdot 10^{-6}$	$0,4 \cdot 10^{-6}$	9,0	0,7
9	$5,2 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$	9,9	0,5
10	$7,6 \cdot 10^{-6}$	$0,2 \cdot 10^{-6}$	13,6	0,3
15	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$0,1 \cdot 10^{-6}$	2,3	0,5
16	$3,7 \cdot 10^{-6}$	$0,07 \cdot 10^{-6}$	7,3	0,1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



(I)

где

AA₁ либо отсутствует, либо является остатком аминокислоты, выбранной из группы, включающей N-метил-фенилаланин, N-метил-триптофан, N-метил-тирозин и N-метил-изолейцин,

AA₂ либо отсутствует, либо является остатком аминокислоты, выбранной из группы, включающей N-метил-фенилаланин, N-метил-аланин, N-метил-β-аланин и N-метил-лейцин,

G представляет собой линейный или разветвленный алкиленовый остаток, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, где одна или несколько невинциальных метиленовых групп (-CH₂-) в указанном остатке могут быть заменены на соответствующий атом кислорода (-O-),

R¹ выбран из группы, включающей водород и фенил,

R², R³ и R⁴ независимо выбраны из группы, включающей водород и фтор,

R⁵ и R⁶ независимо выбраны из группы, включающей водород и фтор,

или его соль.

2. Соединение по п.1, где AA₁ и AA₂ отсутствуют.

3. Соединение по любому из пп.1, 2, где G выбран из группы, включающей -CH₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₅-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, -(CH₂)₇-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH(CH₂-CH₂-CH₃)-, -O-(CH₂)₃-, -(CH₂)₁₃- и -CH₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-.

4. Соединение по п.3, где R¹-G выбран из группы, включающей CH₃-(CH₂)₂-, CH₃-CH(CH₃)-CH₂-, фенил-O-(CH₂)₃-, CH₃-(CH₂)₆-, CH₃-(CH₂)₄- и CH₃-CH₂-CH₂-CH(CH₃-CH₂-CH₃)-.

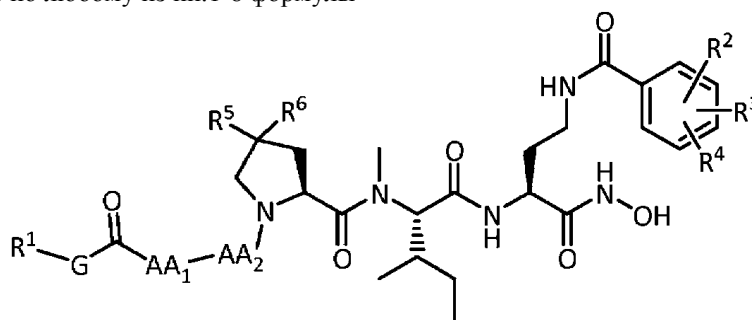
5. Соединение по любому из пп.1-4, где один из R², R³ и R⁴ представляет собой водород.

6. Соединение по п.5, где один из R², R³ и R⁴ представляет собой водород и два других являются атомами фтора.

7. Соединение по п.6, где фенильная группа, замещенная R², R³ и R⁴, представляет собой 3,5-дифторфенил.

8. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где R⁵ и R⁶ оба представляют собой водород.

9. Соединение по любому из пп.1-8 формулы



10. Соединение по п.1, выбранное из группы, включающей:

(2S)-1-ацетил-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(4-фторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;

(2S)-1-ацетил-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;

(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-1-гексаноил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;

(2S)-1-бутаноил-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;

(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(3-метилбутаноил)пирролидин-2-карбоксамид;

(2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-

- метилбутил]-N-метил-1-окстаноилпирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-N-[(1S,2S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4,4-дифтор-1-гексаноил-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(2-пропилпентаноил)пирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-(4-феноксипентаноил)пирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4,4-дифтор-N-метил-1-(4-феноксипентаноил)пирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-1-[(2S)-2-[ацетил(метил)амино]-3-фенил-бутаноил]-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-1-[(2S)-2-[ацетил(метил)амино]пропаноил]-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-1-[3-[ацетил(метил)амино]пропаноил]-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-1-[(2S)-2-[2-[бутаноил(метил)амино]-3-(1H-индол-3-ил)пропаноил]метиламино]-4-метилпентаноил]-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-[(3,5-дифторбензоил)амино]-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метилпирролидин-2-карбоксамид;
 (2S)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-бензамидо-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-N-метил-1-гексаноилпирролидин-2-карбоксамид;
 (2S,4R)-N-[(1S)-1-[[[(1S)-3-бензамидо-1-(гидроксикарбамоил)пропил]карбамоил]-2-метилбутил]-4-фтор-N-метил-1-пентаноилпирролидин-2-карбоксамид,
 или его фармацевтически приемлемая соль.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или среду растворения.
12. Применение соединения по любому из пп.1-10 в качестве лекарственного средства для лечения заболеваний, опосредованных повышенной активностью желатиназы.
13. Лекарственное средство для профилактики и/или лечения эпилепсии, шизофрении, болезни Альцгеймера, аутизма, умственной отсталости, биполярного расстройства, расстройства настроения, депрессии, сосудистых заболеваний, воспалительных заболеваний, лекарственной зависимости, невропатической боли, заболевания легких, злокачественных новообразований и сепсиса, где указанное лекарственное средство содержит соединение по любому из пп.1-10 в качестве активного ингредиента.
14. Применение соединения по любому из пп.1-10 для изготовления лекарственного средства для использования при профилактике и/или лечении эпилепсии, шизофрении, болезни Альцгеймера, аутизма, умственной отсталости, биполярного расстройства, расстройства настроения, депрессии, сосудистых заболеваний, воспалительных заболеваний, лекарственной зависимости, невропатической боли, заболевания легких, злокачественных новообразований и сепсиса.
15. Способ профилактики и/или лечения эпилепсии, шизофрении, болезни Альцгеймера, аутизма, умственной отсталости, биполярного расстройства, расстройства настроения, депрессии, сосудистых заболеваний, воспалительных заболеваний, лекарственной зависимости, невропатической боли, заболевания легких, злокачественных новообразований и сепсиса, где терапевтическое количество соединения по любому из пп.1-10 вводится пациенту, нуждающемуся в этом лечении.

