

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

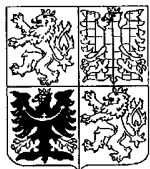
2000 - 4051

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 413/12
A 61 K 31/5377
A 61 P 11/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.04.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.05.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/083873**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.06.2001**
(Věstník č. 6/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/08538**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/56752**

(71) Přihlašovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;

(72) Původce:

Denney Michael Lyle, Franklin, IN, US;
Morin John Michael Jr., Brownsburg, IN, US;
Sall Daniel Jon, Indianapolis, IN, US;
Sawyer Jason Scott, Indianapolis, IN, US;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Ester jako inhibitor sPLA2

(57) Anotace:

N-Morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny, je popsán spolu s jeho použitím jako vysoce biologicky dostupný indolový inhibitor aPLA₂.

CZ 2000 - 4051 A3

ESTER JAKO INHIBITOR sPLA₂Oblast techniky

Poskytnutý vynález se vztahuje ke sloučenině inhibující sPLA₂ s vysokou biologickou dostupností.

Dosavadní stav techniky

Struktura a fyzikální vlastnosti lidské nepankreatické sekreční fosfolipázy A₂ (dále označované "sPLA₂") byly podrobně popsány ve dvou člancích, konkrétně "Cloning and Recombinant Expression of Phospholipase A₂ Present in Rheumatoid Arthritic Synovial Fluid" od autorů Seilhamer, J. J., Pruzanski, W., Vadas P., Plant S., Miller J. A., Kloss J. a Johnson L. K., The Journal of Biological Chemistry, 264 (10), 5335 až 5338 (1989) a "Structure and Properties of a Human Non-pancreatic Phospholipase A₂" autorů Kramer R. M., Hession C., Johansen B., Hayes G., McGray P., Chow E. P., Tizard R. a Pepinsky R. B., The Journal of Biological Chemistry, 264 (10), 5768 až 5775 (1989), jejichž poznatky jsou zde zahrnuty odkazy.

Má se za to, že sPLA₂ je enzym limitující rychlost přeměny v kaskádě arachidonové kyseliny, která hydrolyzuje membránové fosfolipidy. Z tohoto důvodu je důležité vyvinout sloučeniny, které inhibují uvolňování mastných kyselin (např. arachidonové kyseliny) zprostředkované sPLA₂ a mají vysokou biologickou dostupnost u savců, zejména u člověka. Takové sloučeniny mají hodnotu v celkové léčbě stavů indukovaných a/nebo udržovaných nadbytečnou tvorbou sPLA₂, jako jsou septický šok, syndrom respirační nedostatečnosti u dospělých, pankreatitida, trauma, průduškové astma,

alergická rhinitida, revmatoidní artritida atd.

Léčivé látky, které lze podat orálně, jsou všeobecně významně preferovány a mají zvýšené obchodní možnosti pro jejich velmi snadné použití.

US patent č. 5 654 326 popisuje určité inhibitory $sPLA_2$ indolového typu a související esterové prekurzory. Zejména tento patent uvádí příklad methylesteru [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny.

Je žádoucí vyvinout více vysoce dostupných inhibitorů $sPLA_2$, a to zejména těch, které jsou vhodné pro orální podání.

Podstata vynálezu

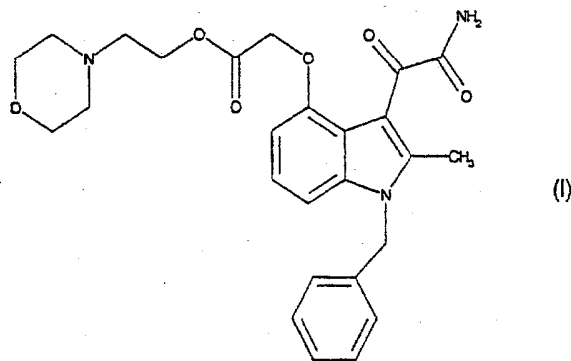
Tímto vynálezem je nová sloučenina, N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny, který má vysokou biologickou dostupnost po orálním podání.

Tímto vynálezem je farmaceutický přípravek obsahující N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny v kombinaci s nosičem nebo ředidlem.

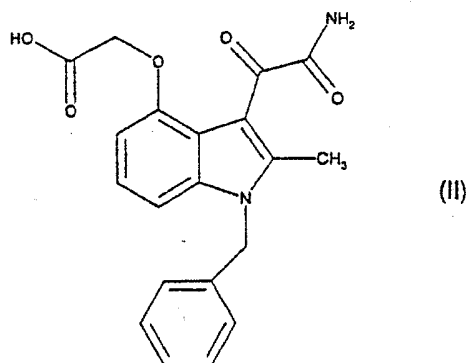
Podrobný popis vynálezu

1H-Indol-3-glyoxylamidová sloučenina podle tohoto vynálezu:

Sloučenina podle tohoto vynálezu, N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny je představována strukturním vzorcem (I).



N-Morfolinoethylester vzorce (I) je esterová forma známého inhibitoru sPLA₂ [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny představované dále uvedeným strukturním vzorcem (II)



Sloučenina vzorce (II) je popsána v příkladu 1 US patentu 5 654 326 (jehož popis je zde zahrnut v odkazech) a European Patent Application č. 95302166.4, Publication No. 0 675 110 (publ., 4. října 1995).

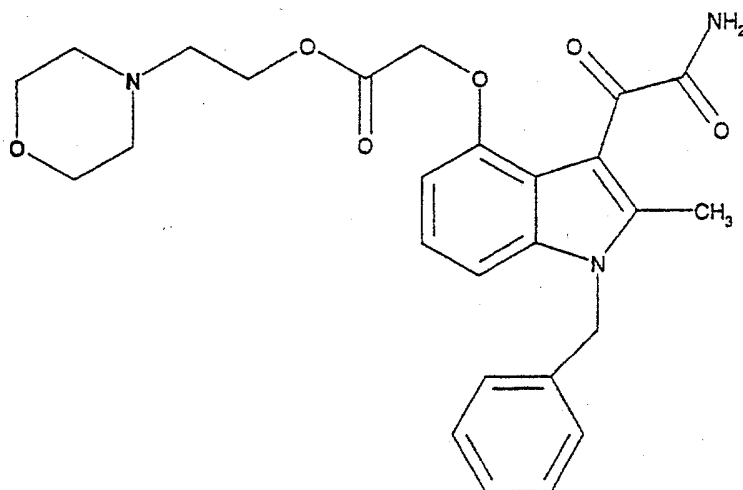
Při tomto vynálezu bylo zjištěno, že sloučenina vzorce (I) má vysokou biologickou dostupnost po orálním podání ve srovnání s jinými inhibitory SPLA₂.

Syntéza sloučeniny podle vynálezu:

Syntéza N-morfolinoethylesteru [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]-octové kyseliny (sloučenina vzorce I, viz výše) používá jako výchozí látku [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octovou kyselinu nebo její sůl (sloučenina vzorce II, viz výše). Tuto výchozí látku lze připravit podle reakčních schématů nebo způsobem podle příkladu 1 z US patentu č. 5 654 326 (jehož objev je zde zahrnut v odkazech). Podobné způsoby jsou ukázány v European Patent Application č. 95302166.4, Publication No. 0 675 110 (publ., 4. října 1995). Jiné konvenční způsoby lze rovněž použít pro přípravu této výchozí látky. Způsoby použitelné pro syntézu sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou specifikovány v příkladu 1, který je vysvětlen dále:

Příklad 1

Příprava N-morfolinoethylesteru [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]-octové kyseliny, sloučeniny představované vzorcem:



Část A. Příprava N-terc.-butoxykarbonyl-3-methoxy-2-methylanilinu

Roztok 44,4 g (344 mmol) 3-methoxy-2-methylanilinu a 75 g (344 mmol) di-terc.-butyldikarbonátu ve 400 ml tetrahydrofuranu (THF) se udržuje pod zpětným tokem po dobu 4 hodin. Po zahuštění za sníženého tlaku se odparek rozpustí v ethylacetátu, promyje 1N roztokem kyseliny citronové, vodou a vysuší síranem hořečnatým. Po odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku se odparek krystalizuje z hexanu, aby se dostalo 64,5 g (výtěžnost 84%) N-terc.-butoxykarbonyl-3-methoxy-2-methylanilinu, teplota tání 56 až 57 °C.

Analýza $C_{13}H_{19}NO_3$:

Vypočteno: C 65,80; H 8,07; N 5,90.

Nalezeno: C 63,32; H 7,83; N 5,56.

Část B. Příprava 4-methoxy-2-methyl-1H-indolu

Roztok 280 ml (0,36 mol) 1,3M sek-butyllithia v cyklohexanu se pomalu přidá do 43 g (0,18 mol) N-terc.-butoxykarbonyl-3-methoxy-2-methylanilinu v 300 ml THF za udržování teploty pod -40 °C v lázni suchého ledu a ethanolu. Pak se lázeň odstraní, aby teplota vzrostla na

-20 °C a poté se lázeň nahradí novou lázní. Poté, co teplota poklesne na -60 °C, přidá se po kapkách 18,5 g (0,18 mol) N-methoxy-N-methylglyoxylamidu ve stejném objemu tetrahydrofuranu. Reakční směs se míchá po dobu 1 hodiny, potom se odstraní chladicí lázeň a směs se míchá po dobu další 1 hodiny. Potom se vylíje do směsi 600 ml etheru a 600 ml 1N kyseliny chlorovodíkové. Organická vrstva se oddělí, promyje vodou, vysuší síranem hořečnatým a odpaří za sníženého tlaku, aby se dostalo 39,5 g směsi 1-[2-(terc.-butoxykarbonylamino)-6-methoxyfenyl]-2-propanonu a výchozího anilidu. Tato směs se rozpustí ve 100 ml methylenchloridu a 40 ml trifluoroctové kyseliny a míchá po celkovou dobu 26 hodin. Směs se promyje vodou, vysuší síranem hořečnatým a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se čistí chromatografií na silikagelu při eluování směsí 20 % ethylacetátu v hexanu, krystaluje ze směsi dichlormethanu a hexanu aby se dostalo 13,9 g 4-methoxy-2-methyl-1H-indolu, teplota tání 80 až 86 °C.

Analýza $C_{10}H_{11}NO$:

Vypočteno: C 74,51; H 6,88; N 8,69.

Nalezeno: C 74,41; H 7,08; N 8,47.

Část C. Příprava 4-methoxy-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indolu

1 g (6,2 mmol) 4-methoxy-2-methyl-1H-indolu se přidá k 248 mg (6,2 mmol) 60% hydridu sodného v minerálním oleji (promyje se hexanem před přidáním DMF) v 15 ml DMF a po míchání po dobu 0,5 hodiny se přidá 0,74 ml (6,2 mmol) benzylbromidu. Směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 18 hodin, zředí vodou a extrahuje ethylacetátem. Ethylacetátový roztok se promyje roztokem chloridu sodného, vysuší síranem hořečnatým a odpaří za sníženého tlaku.

Odparek se čistí chromatografií na silikagelu, eluuje se směsí 20 % ethylacetátu v hexanu, aby se dostalo 1,3 g (84% výtěžek) 4-methoxy-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indolu, tajícího při teplotě 96 až 116 °C.

Analýza $C_{17}H_{17}NO$:

Vypočteno: C 81,24; H 6,82; N 5,57.

Nalezeno: C 81,33; H 6,74; N 5,29.

Část D. Příprava 4-hydroxy-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indolu

Roztok 1,25 g (5 mmol) 4-methoxy-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indolu a 20 ml 1M bromidu boritého v dichlormethanu v 50 ml methylenchloridu se míchá při teplotě místnosti po dobu 5 hodin a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v ethylacetátu, promyje roztokem chloridu sodného a vysuší síranem hořečnatým. Po odpaření za sníženého tlaku se odparek čistí chromatografií na silikagelu, při eluování směsí 20 % ethylacetátu v hexanu, aby se dostalo 577 mg (49% výtěžek) 4-hydroxy-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indolu, tajícího při teplotě 125 až 127 °C.

Analýza $C_{16}H_{15}NO$:

Vypočteno: C 80,98; H 6,37; N 5,90.

Nalezeno: C 80,76; H 6,26; N 5,80.

Část E. Příprava methylesteru [(2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

530 mg (2,2 mmol) 4-hydroxy-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indolu se přidá do 88 mg (2,2 mmol) 60% hydridu sodného v minerálním oleji ve 20 ml DMF a směs se míchá po dobu 0,67 hodiny. Potom se přidá 0,21 ml (2,2 mmol) methylbromacetátu a míchá se po dobu 17 hodin. Směs se zředí vodou a extrahuje

ethylacetátem. Ethylacetátový roztok se promyje roztokem chloridu sodného, vysuší síranem hořečnatým a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se čistí chromatografií na silikagelu, při eluování směsí 20 % ethylacetátu v hexanu, aby se dostalo 597 mg (88% výtěžek) methylesteru [(2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny, teplota tání 140 až 143 °C.

Analýza $C_{19}H_{19}NO_3$:

Vypočteno: C 73,77; H 6,19; N 4,53.

Nalezeno: C 74,01; H 6,23; N 4,32.

Část F. Příprava methylesteru [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

0,16 ml (1,9 mmol) oxalylchloridu se přidá do 582 mg (1,9 mmol) methylesteru [(2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny v 10 ml methylenchloridu a směs se míchá po dobu 1,5 hodiny. Směs se odpaří za sníženého tlaku a odparek se vylévá do 10 ml methylenchloridu. Nechá se probublávat parami bezvodého amoniaku po dobu 0,25 hodiny, potom se směs míchá po dobu 1,5 hodiny a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se míchá s 20 ml ethylacetátu a směs se zfiltruje. Filtrát se odpaří, aby se dostalo 672 mg směsi methylesteru [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny a chloridu amonného, teplota tání 202 až 215 °C.

Část G. Příprava [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

Směs 660 mg (1,7 mmol) methylesteru [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny a 10 ml 1N roztoku hydroxidu sodného ve 30 ml methanolu se zahřívá pod zpětným tokem po dobu 1

hodiny, ochladí na teplotu místnosti a míchá po dobu 0,5 hodiny. Směs se odpaří za sníženého tlaku a odparek se převede do směsi ethylacetátu a vody. Vodná vrstva se oddělí, okyselí na pH 2 až 3 pomocí 1N kyseliny chlorovodíkové a extrahuje ethylacetátem. Ethylacetátový roztok se odpaří a krystalizací se dostane 431 mg (69% výtěžek) [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny, tající při teplotě 218 až 220 °C.

Analýza $C_{20}H_{18}N_2O_5$:

Vypočteno: C 65,57; H 4,95; N 7,65.

Nalezeno: C 63,31; H 4,79; N 6,91.

Část F. Příprava N-morfolinoethylesteru [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)-oxy]octové kyseliny

Sloučeninu, podle tohoto vynálezu lze připravit reakcí hydrochloridu 4-(2-chlorethyl)morfolinu (dostupný od Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA, položka č. C4,220-3) a vhodné báze, výhodně uhličitanu cesnatého, a sodné soli [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny ve vhodném rozpouštědle, výhodně dimethylformamidu. Řídká suspenze se zahřívá na teplotu 60 °C nebo jinou vhodnou teplotu dokud nevznikne roztok. Směs se zahřívá až do ukončení reakce. Reakční směs se zpracuje za použití konvenčních laboratorních způsobů používaných v organické chemii, aby se izoloval produkt.

Zkouška I

Pro jednodávkovou farmakokinetickou studii se použijí

opice Cynomolgus. Opicím (3 na dávku) se podá jedna perorální dávka 10 mg/kg jedné ze šesti sloučenin, které jsou prekurzory, mezi nimi je zahrnuta i sloučenina, podle tohoto vynálezu.

Serie krevních vzorků se odebírá až do 24 hodin po podání dávky. Plasma se analyzuje na příslušnou volnou kyselinu za použití LC/MS metody. Spočítají se rovněž hodnoty plochy po křivkou (AUC) 8. a 24. hodinu.

Účelem této zkoušky je hodnotit a srovnat dostupnost zvolených inhibitorů sPLA₂ po orálním podání.

Předmět zkoušky:

Druh: Opice

Kmen: Cynomolgus

Příprava dávky:

Množství inhibitoru sPLA₂ bylo korigováno na ekvivalenty volné kyseliny.

Nosič:

Suspenze inhibitoru sPLA₂ v 10% Acacia, připravená těsně před podáním dávky.

Podání dávky:

Cesta podání : Orální

Častost opakování: Jediná dávka

Dávka: 10 mg/kg (jako základní kyseliny)

Objem dávky: 5 ml/kg

Výsledky

Studie farmakokinetiky u opic

Tabulka 1

Sloučenina esterového typu	C _{max} (ng/ml)	T _{max} hodiny	AUC (0 až 8 h) ng.h/ml	AUC (0 až 24 h) ng.h/ml
1	1604	2,0	5131	5425
2	200	2,0	1356	2038
3	213	2,0	1277	1761
4	245	2,0	1675	3404
5	3296	2,0	11919	13161
6	615	3,3	---	8730

1 = N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

2 = methylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

3 = N,N-diethylglykolamidoester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-1-[(1,1'-bifenyl)-2-ylmethyl]-2-methyl-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

4 = ethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-ethyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

5 = N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-ethyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

6 = methylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-ethyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

Zkouška II

Biologická dostupnost sloučeniny, podle tohoto vynálezu, N-morfolinoethylesteru [(3-(2-amino-1,2-

-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]-
octové kyseliny, se určí rovněž využitím farmakokinetické
studie u krysy po jedné orální dávce:

Účelem této zkoušky je hodnotit a srovnat dostupnost
zvolených inhibitorů sPLA₂ po orálním podání.

Předmět zkoušky:

Druh: Krysa

Kmen: Fischer 344

Příprava dávky:

Množství inhibitoru sPLA₂ bylo korigováno na
ekvivalenty volné kyseliny.

Nosič:

Suspenze inhibitoru sPLA₂ v 10% Acacia, připravená
těsně před podáním dávky.

Podání dávky:

Cesta podání : Orální

Častost opakování: Jediná dávka

Dávka: 10 mg/kg (jako základní kyseliny)

Objem dávky: 5 ml/kg

Krysy se nechají přes noc vyhladovět.

Sběr vzorků:

Vzorky krve (0,8 ml) se odeberou v těchto časech:
0,5, 1, 2, 4, 6 a 8 hodin (2 krysy na jeden čas).

Analýza dat:

Plasma se analyzuje pomocí HPLC, aby se změřily koncentrace různých inhibitorů sPLA₂ (jako volné kyseliny). Hodnoty C_{max} (maximální plasmatická koncentrace) a AUC se určí z průměrných hodnot závislosti koncentrace na času.

Tabulka 2

Sloučenina esterového typu	C _{max} (ng/ml)	AUC (0 až 8 h)
11	1094	2400
12	79	385
13	258	1229
14	1199	2604
15	612	1504
16	259	1031

11 = N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny (sloučenina podle tohoto vynálezu)

12 = N,N-diethylacetamidoester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(1-fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)-oxy]octové kyseliny

13 = N,N-diethylacetamidoester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-[(1-naftalenyl)methyl]-1H-indol-4-yl)-oxy]octové kyseliny

14 = N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-[(1-naftalenyl)methyl]-1H-indol-4-yl)-oxy]octové kyseliny

15 = N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-ethyl-1-[(3-chlorfenyl)methyl]-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

16 = N,N-diethylacetamidoester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-ethyl-1-[(3-chlorfenyl)methyl]-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny

Ačkoli byl poskytnutý vynález zobrazen výše určitými specifickými ztělesněními, není úmyslem, aby tyto specifické příklady omezily rozsah tohoto vynálezu, jak je popsán v přiložených patentových nárocích.

120101

- 15 -

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina, N-morfolinoethylester [(3-(2-amino-1,2-dioxoethyl)-2-methyl-1-(fenylmethyl)-1H-indol-4-yl)oxy]octové kyseliny.

2. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje sloučeninu podle nároku 1 v kombinaci s farmaceuticky vhodným nosičem nebo ředidlem.