



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

214 624 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 92 03138

(22) A bejelentés napja: 1992. 10. 02.

(30) Elsőbbségi adatok:

257 870/91 1991. 10. 04. JP

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 31/44

(40) A közzététel napja: 1993. 06. 28.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1998. 04. 28.

(72) Feltalálók:

Kitahara, Masaki, Minamisaitama-gun, Saitama-ken (JP)
Saito, Yasushi, Minamisaitama-gun, Saitama-ken (JP)
Sakashita, Mitsuki, Minamisaitama-gun, Saitama-ken (JP)
Shibasaki, Toshie, Minamisaitama-gun, Saitama-ken (JP)
Toyoda, Kyomi, Minamisaitama-gun, Saitama-ken (JP)

(73) Szabadalmazók:

KOWA Co. Ltd., Aichi-ken (JP)
Nissan Chemical Industries Ltd., Tokió (JP)

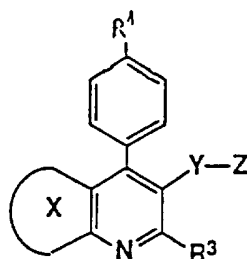
(74) Képvisező:

ADVOPATENT Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Eljárás atheroszklerózist okozó érbelhártya-vastagodást gátló kondenzált piridinszármazékokat tartalmazó készítmények előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya az atheroszklerotikus érbelhártya-vastagodás elleni, a koleszterin-bioszintézis mellett az érfalbeli simaizom-sejtek migrációját és szaporodását is gátló gyógyászati készítmények előállítása. Ezek hatóanyagként (I) általános képletű vegyületeket tartalmaznak:



(I)

a képletben az X gyűrű a piridingyűrű szabad kettős kötésű oldalához anellált, adott esetben helyettesített fenilén-, pirazolilén- vagy tienilén-gyűrűs csoportot képvisel,

R¹ jelentése hidrogén- vagy fluoratom,

R³ jelentése 3–5 szénatomos alkil- vagy 3–5 szénatomos cikloalkilcsoport,

Y jelentése –CH=CH-csoport,

Z jelentése –CH(OH)–CH₂–CH(OH)–CH₂–COOR¹² csoport vagy 4-hidroxi-6-oxo-oxán-2-il-csoport,

R¹² jelentése hidrogénatom, ⁺NH₄ csoport, nátrium-, kálium- vagy ½ kalciumatom.

A találmány tárgya eljárás atheroszklerózist okozó érbelhártya-vastagodás inhibitor előállítására. Az inhibitor olyan piridinszármazékot tartalmaz, amely erős HMG-CoA reduktázgátló hatással rendelkezik, továbbá erős gátló hatást mutat az aorta belső simaizomsejtek (I-SMC, intimal smooth muscle cells) proliferációjával szemben, az aorta középső simaizomsejtek (M-SMC, medial smooth muscle cells) migrációjával szemben, valamint a vérsejtek (így lymphociták, leukociták és makrofágok) endotheliás sejtekhez történő adhéziójával szemben.

Egy korábbi mechanizmus szerint a szívkoszorúér atheroszklerózist okozó érbelhártya-megvastagodása a szívizominfarktus és az angina pectoris egyik fő okozója. A feltételezés szerint ezt az atheroszklerózist okozó érbelhártya-megvastagodást a monocitáknak vagy a vérlemezkéknek az endotheliás sejtekhez történő adhéziója indítja meg, a citokinek szekréciójával és lipidakumulációval egyidejűleg, majd a folyamat kifejlődése során az M-SMC sejtek a középső részből a belső részbe vándorolnak, a belső részben a simaizomsejtek osztódnak, és a simaizomsejtek patológiás és proliferatív aktivációjának vagy modulációjának következtében az extracelluláris mátrix megnövekszik. A rizikófaktorok, mint például a hiperlipidémia, elősegítik a sejtek ilyen jellegű aktivációját. A korábbiakban beszámoltak arról, hogy a HMG-CoA reduktáz inhibitorok állatkísérletekben gátolják az atheroszklerózist okozó érbelhártya-megvastagodás kialakulását, oly módon, hogy erőteljesen csökkentik a szérum koleszterinszintjét [Biochim. Biophys. Acta, 960, 294–302 (1988)]. Ugyanakkor a klinikai kísérletekben ez a hatás nem bizonyult megfelelőnek.

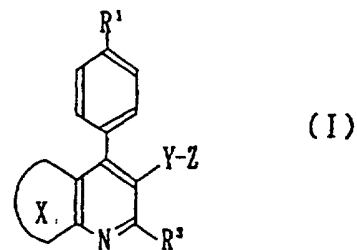
Emiatt szükség van az atheroszklerózist okozó érbelhártya-megvastagodás olyan, hatásosabb inhibitoraira, amelyek képesek az ilyen jellegű atheroszklerózisos károsodásokra közvetlenül hatni. A korábbiakban beszámoltak letapadásellenes eredetű növekedési faktor (PDGF, antiplatelet-derived growth factor) anyag vagy antifibroblaszt növekedési faktor (FGF, antifibroblast growth factor) anyag simaizomsejtek gátló hatásáról [Life Science, 28, 1641–1646, (1981); J. Pharm. Exp. Ther., 248, 1167–1174, (1989)], PDGF, thromboxán B₄ és interleukin-1 simaizomsejt-migrációra gyakorolt kalciumantagonista gátló hatásáról [Atherosclerosis, 72, 213–219, (1988)], RGD peptideknek a sejtadhézióra gyakorolt gátló hatásáról (J. Cell Biol., 112, 335–344, (1991), valamint egy thromboxán szintézis

inhibitornak a PTCA utáni reathenosisra gyakorolt gátló hatásáról (Atherosclerosis, 18, 661–665, (1990)]. Ezeknek az anyagoknak a hatása a letapadás ellen vagy a citokineknek megfelelő faktorok stimulációjára irányul, ugyanakkor eddig nem találtak még olyan anyagot, amely közvetlenül hatna az atheroszklerózis patológiás simaizomsejtekre.

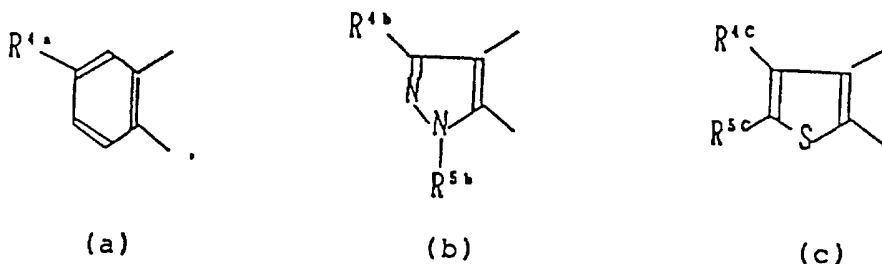
Simaizomsejtekből kiválasztott, simaizom eredetű migrációs faktor a PDGF-nél erősebb migrációstimuláló hatást mutat, s úgy tűnik, közvetlenül kapcsolódik az atheroszklerózis megindulásához és kifejlődéséhez [Atherosclerosis, 72, 213–226, (1991)], de még nem találtak olyan anyagot, amely gátolná a simaizomsejtek ilyen jellegű migrációját. További fontos megfigyelésnek tekinthető az atherosclerosisban az I-SMC sejtek proliferatív jellege, amely prosztoglandin I₂-vel nem szüntethető meg [Atherosclerosis, 73, 67–69, (1988)]. Ugyanakkor még nem találtak olyan anyagot sem, amely az ilyen proliferatív tulajdonságot gátolná.

A korábbiakban már beszámoltak arról, hogy a HMG-CoA reduktáz inhibitoroknak gátló hatásuk van a sejtosztódásra fibroblasztokban, simaizomsejtekben és limfocitákban [J. Biol. Chem., 259, 1546–1551, (1984); ugyanott 255, 5134–5140; Biochim. Biophys. Acta, 1051, 138–143, (1990)], valamint gátolják a limfociták aktivációját is [Int. J. Immunopharmac., 11, 863–869, (1989)]. Ezek a gátló hatások azonban nem tökéletesen kielégítőek, s ezért szükség van egy olyan anyagra, amely hatásosabb és szelektív a célsejtekkel, különösen az I-SMC sejtekkel, makrofágokkal és monocitákkal szemben.

A találmány az atheroszklerózist okozó érbelhártya-vastagodás inhibitorot tartalmazó készítmények előállítására vonatkozik, amely inhibitor hatásos mennyiségben tartalmaz egy I általános képletű vegyületet



– ebben a képletben az X gyűrű a piridingyűrű szabad kettős kötésű oldalához anellált (a), (b) vagy (c) gyűrűs csoportot képvisel



és ezekben

R^{4a} jelentése hidrogénatom, 1–4 szénatomos alkilcsoport, fluor-, klór- vagy brómatom,

R^{4b} jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport vagy fenilcsoport és R^{5b} jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport,

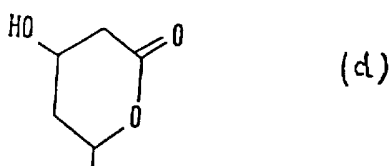
R^{4c} és R^{5c} jelentése hidrogénatom vagy 1–4 szénatomos alkilcsoport,

R¹ jelentése hidrogén- vagy fluoratom,

R³ jelentése 3–5 szénatomos alkil- vagy 3–5 szénatomos cikloalkilcsoport,

Y jelentése –CH=CH-csoport,

Z jelentése –CH(OH)–CH₂–CH(OH)–CH₂–COOR¹²-csoport vagy (d) képletű csoport



R¹² jelentése hidrogénatom, +NH₄ csoport, nátrium-, kálium- vagy ½ kalciumatom.

Az ilyen vegyületek legalább egy vagy két aszimmetriás szénatomot tartalmazhatnak, s így legalább két vagy több optikai izomerrel rendelkeznek. Az I általános képletű vegyületek magukban foglalják valamennyi optikai izomert és ezek keverékeit.

A korábban, például a 304 063, 339 358 és 367 235 számú európai és 4 346227 USA szabadalmi leírásokban ismertetett atheroszklerózis elleni vegyületekkel szemben, amelyeknek a hatása a koleszterin bioszintézisének gátlásán alapul, a jelen találmány értelmében alkalmazott I általános képletű vegyületek – amelyek egy részét az említett 304 063 számú európai szabadalmi leírás a koleszterin bioszintézisét gátló szerként már ismertette – a koleszterin bioszintézisét gátló hatásuk mellett – amint a leírásunkban közölt farmakológiai adatok mutatják – rendelkeznek az atheroszklerózisnak a koleszterinémiaival, gyakran együtt já-

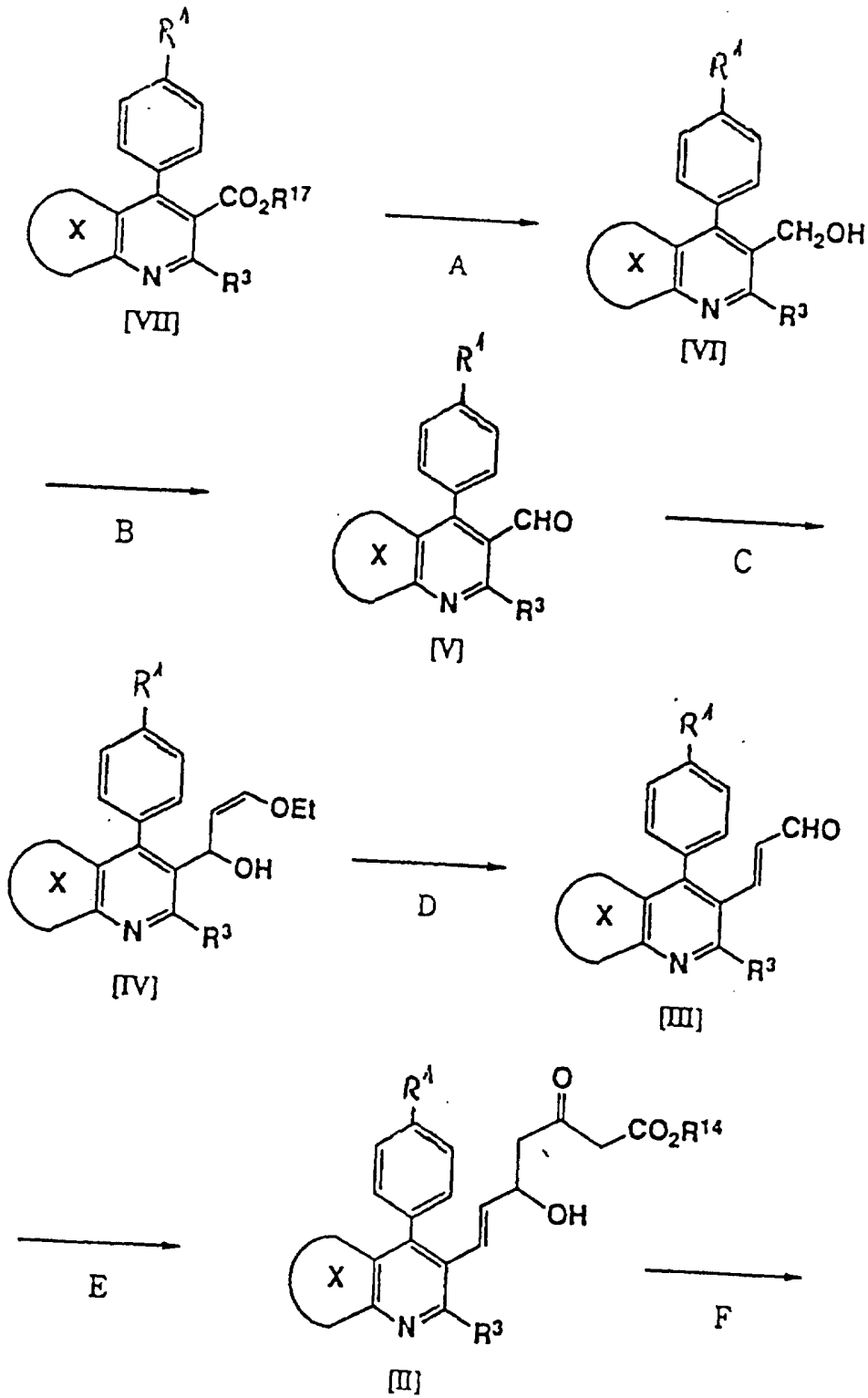
ró, de attól nem függő további tényezői, a simaizomsejteknek az érfalközéprétegből (media) az érbelhártya (intima) felé irányuló migrációja, az érbelhártyabeli (intimális) simaizomsejtek szaporodása és a vérsejteknek az endoteliális sejtekhez tapadása elleni gátló hatással is. Ezeknek a hatásoknak az atheroszklerózis ellen eddig ajánlott szerekben való együttes jelenlétéről az idézett korábbi közlemények nem számolnak be, és az az eddigi ismeretek alapján nem is volt előre látható.

5 Így tehát a találmány szerinti vegyületek ténylegesen gátolják a vérsejteknek (főként a monocitáknak és makrofágoknak) az endoteliális sejtekhez történő adhézióját, az atheroszklerózist okozó érbelhártya-vastagodás korai fázisban történő elnyomása mellett. A vegyületek alkalmasak lehetnek az aorta középső simaizomsejtek migrációjának gátlására PDGP-fel vagy simaizomsejtek olyan állapotú közegével, amely közeg (SMC-CM) az autokrin stimuláló rendszer simaizomsejt eredetű migrációs faktorát tartalmazza (SMC-CM: 10 conditioned medium of smooth muscle cells). A találmány szerinti vegyületek gátolják a DNS-replikációt, amiből következően feltételezhető a sejtproliferáció hatásos gátlása. Ezek a hatások lényegesen kifejezettebbek az I-SMC sejtekben, mint az M-SMC sejtekben. 15 Az előbbiekből következően a találmány szerinti vegyületek esetén joggal feltételezhető, hogy az atheroszklerózist okozó érbelhártya-vastagodás legfontosabb lépését, az aorta belső szívizomsejtek proliferációját gátolják. A jelen találmány kidolgozásának alapját az a felismerés képezte, hogy a találmány szerinti vegyületek gátló hatással rendelkeznek az atheroszklerózist okozó érbelhártya-vastagodással szemben.

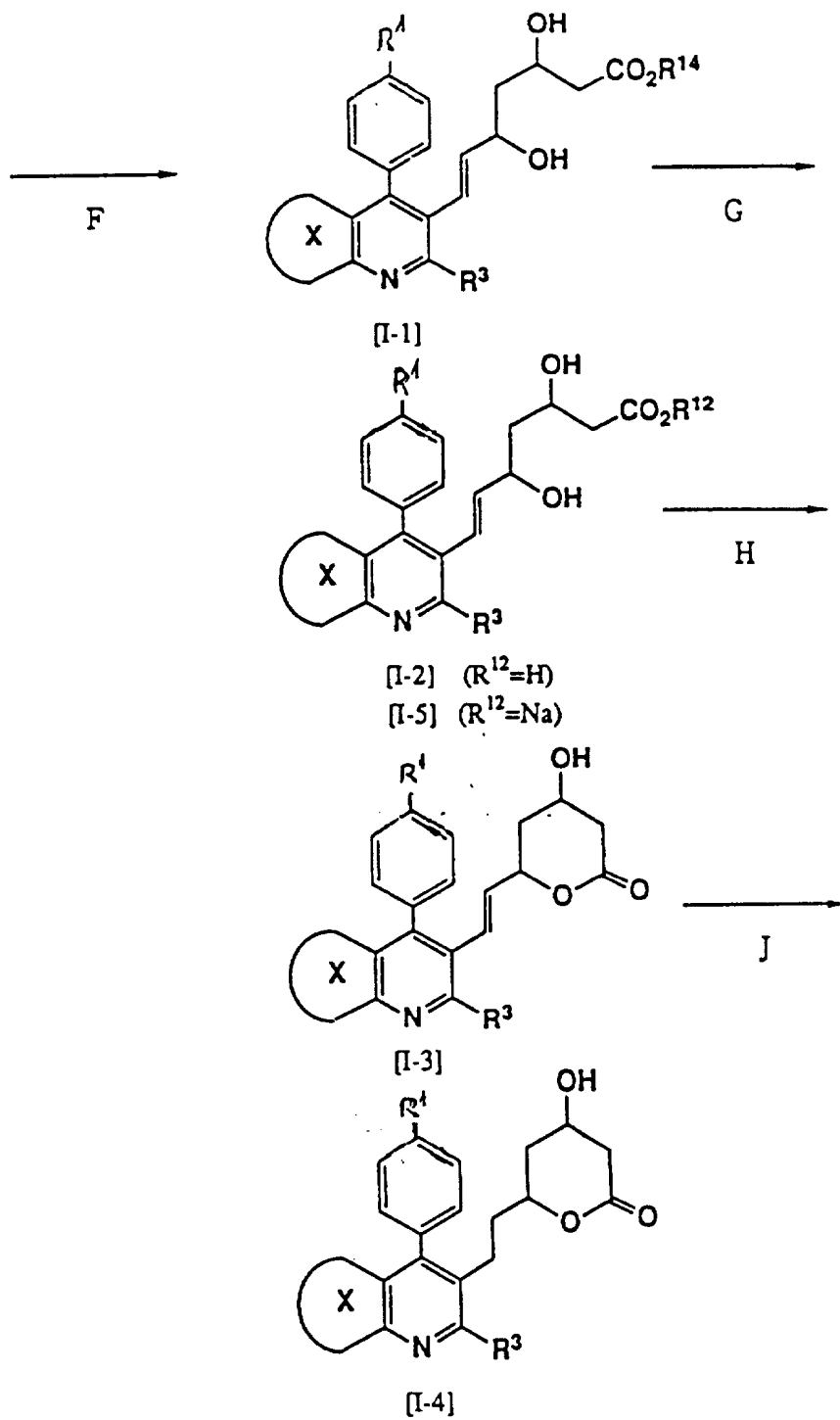
A találmány szerinti vegyületeket, azaz az I általános képletű mevalonolaktonokat az 1. reakcióvázlat 20 szerint állíthatjuk elő.

Az általános képletekben R¹, R³, R¹² és az X gyűrű jelentése azonos az I általános képletre a fentiekben megadott jelentésekkel, R¹⁴ és R¹⁷ jelentése hidrolízissel lehasítható észtercsoport, előnyösen 1–4 szénatomos alkilcsoport, mint metil-, etil-, n-propil-, izopropil- 40 vagy n-butil-csoport.

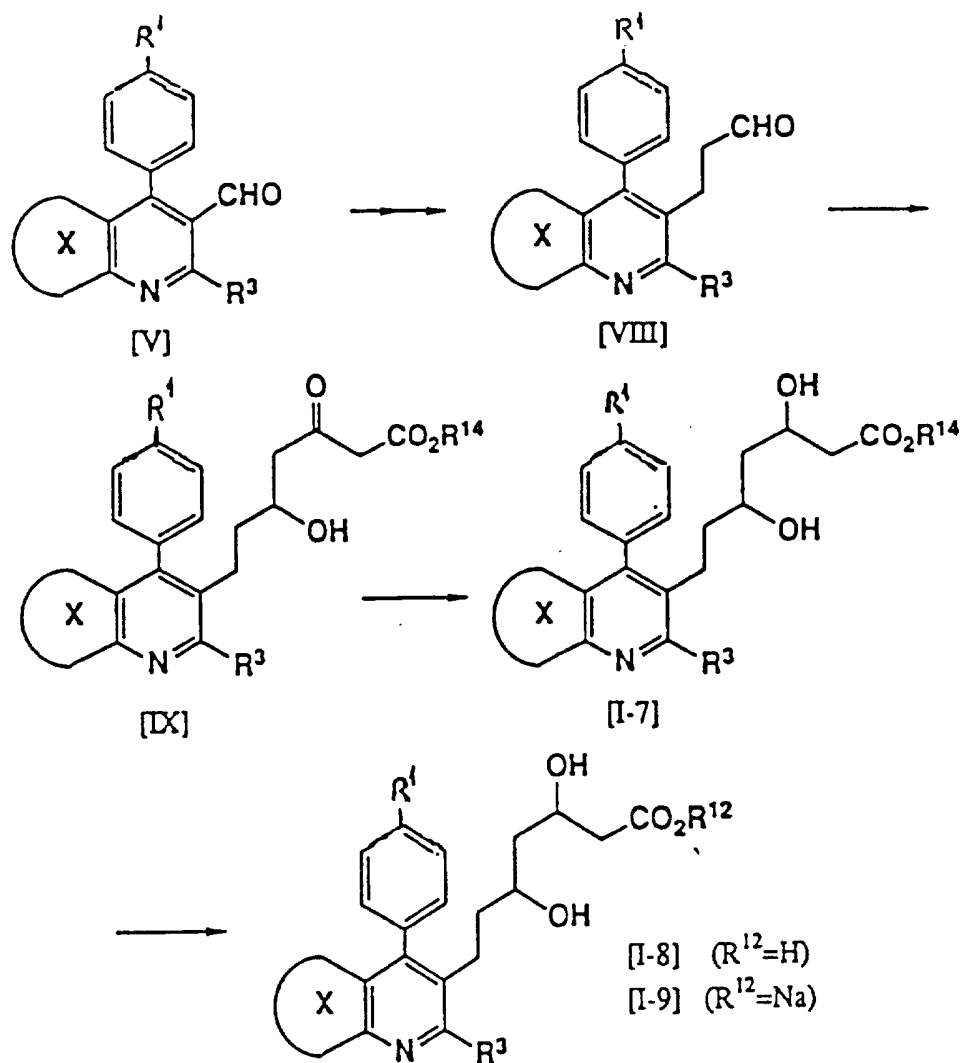
1. reakcióvázlat



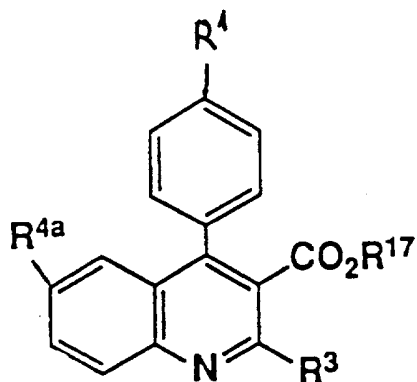
1. reakcióvázlat (folytatás)



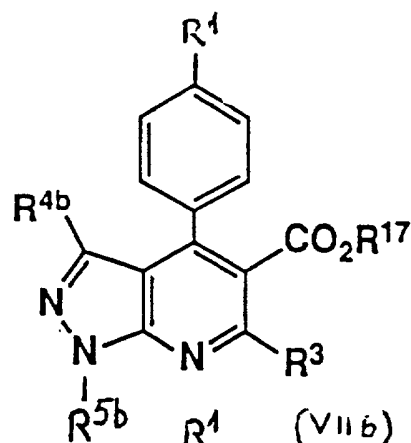
1. reakcióvázlat (folytatás)



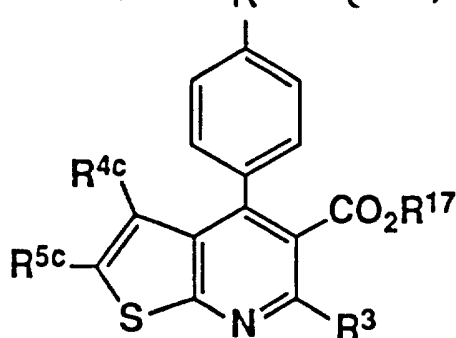
A VIIa, VIIb és VIIc általános képletű kiindulási vegyületeket



(VIIa)



(VIIb)



(VIIc)

az alábbi helyeken ismertetett eljárásokkal összhangban állíthatjuk elő: 279866/1989. számú japán, vizsgálat nélküli szabadalmi közlemény (illetve az ennek megfelelő 304063. számú európai és az 5011930. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), 275878/1990. számú japán, vizsgálat nélküli szabadalmi közlemény (illetve az ennek megfelelő 339358. számú európai és az 5024999. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), valamint a 7290/1991. számú japán, vizsgálat nélküli szabadalmi közlemény (illetve az ennek megfelelő 367235. számú európai és az 5026698. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

Az A lépésben az észtert egy primer alkohollá redukáljuk, amely redukciót különböző fém-hidridekkel, előnyösen diizobutil-alumínium-hidriddel, oldószerben, így tetrahydrofuranban, toluolban vagy metilén-kloridban, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, előnyösen -10° és $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérséklet-tartományban végezhetjük.

A B lépésben a primer alkoholt aldehiddé oxidáljuk, amely oxidáció során különféle oxidálószereket alkalmazhatunk. Előnyösek azok az eljárások, amelyek során metilén-kloridban, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérséklet-tartományban piridinium-klór-kromátot alkalmazunk, vagy amelyekben oxalil-kloridot, dimetil-szulfoxidot és egy tercier-amint (például trietil-amint) alkalmazunk (Swern-oxidáció), illetve amelyekben kén-trioxid/piridin komplexszel végezzük az oxidációt.

A C lépésben a megfelelő 3-etoxi-1-hidroxi-2-propén-származék szintézise látható, amelynek során egy V általános képletű vegyületet egy olyan litiumvegyülettel reagáltatunk, amely litiumvegyületet cisz-1-etoxi-2-(tri/n-butyl/-sztannil)-etilén és butil-litium tetrahydrofuranban előzetesen végrehajtott reakciójával nyertünk. A reakció-hőmérsékletet előnyös $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti tartományban megválasztani.

A D lépésben az enal savas hidrolízis útján történő előállítása látható. Savkatalizátorként előnyösen p-toluolszulfonsavat, hidrogén-kloridot vagy kénsavat alkalmazva a reakciót víz és tetrahydrofuran vagy etanol elegyében, $10-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten végezhetjük.

A C lépésben nyert 3-etoxi-1-hidroxi-2-propén-származékot az egyidejűleg képződő tetra(n-butyl)-ón eltávolítását követően további tisztítás nélkül, közvetlenül alkalmazhatjuk a D lépésben.

Az E lépésben a III általános képletű enal és egy acetecetsav-észter addíciós reakcióját mutatjuk be. A reakciót bázisként nátrium-hidrid és n-butyl-litium alkalmazásával, tetrahydrofuranban, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, előnyösen $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten végezzük.

Az F lépésben a II általános képletű ketokarbonsav-észter redukcióját mutatjuk be, amely redukciót különféle redukálószerrel végezhetünk el.

Az ilyen reakcióban, amelyben egy karbonilcsoportot redukálunk, s így módon a megfelelő I-1 általános képletű

dihidroxi-karbonsav-észtert nyerjük, alkalmas redukáló-szer például a nátrium-bór-hidrid, nátrium-ciano-bór-hidrid, cink-bór-hidrid, disziamil-borán, diborán, terc-butil-amino-borán, egy piridin-borán komplex, diciklohexil-borán, texil-borán, 9-bora-biciklo[3.3.1]-nonán, diizopinokamfenil-borán vagy a litium-tri(szek-butil)-bór-hidrid.

A reakciót oldószerben, így szénhidrogén oldószerben, halogénezett szénhidrogén oldószerben, 1–4 szénatomos alkoholban, éterben vagy ezek keverékében végezhetjük $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, előnyösen $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleti tartományban.

Felhasználható a J. Amer. Chem. Soc., 105, 593, (1983) szakirodalmi helyen leírt eljárás is, amelynek során alacsony hőmérsékleten egy trialkil-boránt, így tri(n-butil)-boránt vagy trietil-boránt és nátrium-bór-hidridet alkalmaznak.

A Tetrahedron Letters, 28, 155, (1987) helyen közzölt publikáció szerint alkoxi-dialkil-borán, így metoxi-dietil-borán vagy etoxi-dietil-borán alkalmazásával lehetőség nyílik az erősebb biológiai hatással rendelkező eritro termék kedvezményezett kinyerésére.

Ezt a reakciót egy 1–4 szénatomos alkohol és tetrahidrofuran keverékében, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, előnyösen $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-68\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten végezhetjük.

A G lépésben az észtert hidrolizáljuk. Az észterhidrolízist ekvimoláris mennyiségű bázis, előnyösen kálium-hidroxid vagy nátrium-hidroxid alkalmazásával, víz és metanol vagy etanol oldószerkeverékében $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten végezhetjük.

Az így nyert szabad savat egy megfelelő bázissal sóvá alakíthatjuk át.

A H lépésben az I-2 általános képletű szabad hidroxisavat dehidratációs reakció útján mevalonolak-

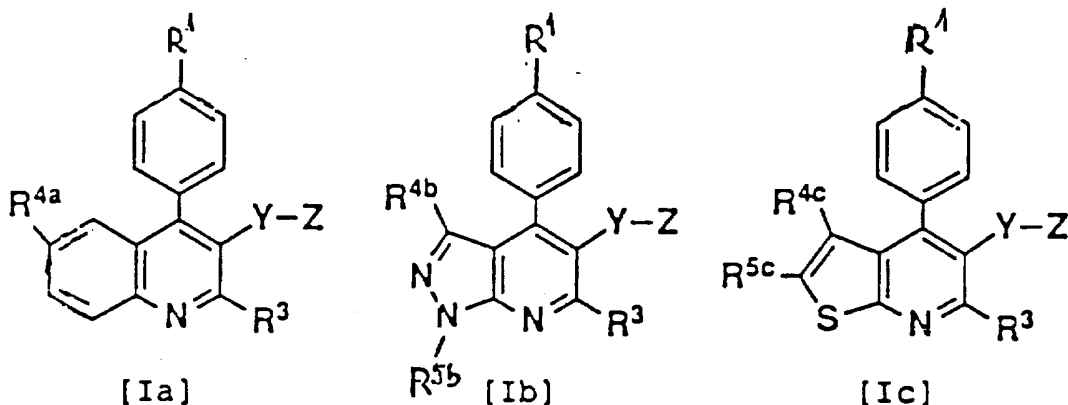
tonná alakítjuk. A reakciót benzolban vagy toluolban történő refluxálással és a képződő víz egyidejű eltávolításával, vagy egy megfelelő dehidratálószer, például egy molekulaszita hozzáadásával végezhetjük.

De végezhető a reakció egy laktonképző szer, például egy karbodiimid, előnyösen egy vízdékony karbodiimid, így N-ciklohexil-N'-(2'-metil-morfolinium/-etil)-karbodiimid-p-toluolszulfonát alkalmazásával, száraz metilén-kloridban, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, előnyösen $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten.

A J lépésben a mevalonolakton-csoport és a heterogyűrű közötti kettős kötés hidrogénezését mutatjuk be. A reakciót végrehajthatjuk katalitikus mennyiségű palládium-szén vagy ródiium-szén alkalmazásával, oldószerben, így metanolban, etanolban, tetrahidrofuranban vagy acetonitrilben, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, előnyösen $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérséklet-tartományban.

Az I-7 általános képletű vegyület előállítható még a következő úton is: egy V általános képletű aldehidből előállított VIII általános képletű aldehidhez az E. lépésben megadottak szerint hozzáadjuk egy acetecetsav-észter kettős anionját, s egy folyamatos Wittig-reakcióval (WO 8402131. közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentés) a IX általános képletű ketokarbonsav-észtert nyerjük, amelynek karbonilcsoportját az F lépés szerint redukálva kapjuk a kívánt, I-7 általános képletű származékot.

Az I általános képletű vegyületek az X gyűrű fent megadott jelentésétől függően az alábbi Ia, Ib illetve Ic általános képletnek felelhetnek meg. Az Y, Z és R¹² jelentésétől függően az I-1–I-9 általános képletű vegyületek az alábbi 1. táblázatban megadott -Y-Z oldal-láncot tartalmazzák:



1. táblázat

Vegyület		-Y-Z
(I-1)	(R12 = Et)	
(I-2)	(R12 = H)	
(I-3)		
(I-4)		
(I-5)	(R12 = Na)	
(I-7)	(R12 = Et)	
(I-8)	(R12 = H)	
(I-9)	(R12 = Na)	

Az Ia, Ib, illetőleg Ic általános képletű vegyületek sorában elsősorban azok a vegyületek előnyösek, amelyekben egyes szubsztituensek az alábbi jelentésűek:

(Ia): R³ jelentése ciklopropilcsoport, Y jelentése -CH=CH-csoport

(Ib): R³ jelentése ciklopropil-, R^{4a} és R^{5a} jelentése metilcsoport, Y jelentése -CH=CH-csoport

(Ic): R³ jelentése ciklopropil-, R^{4c} jelentése etil- és R^{5c} jelentése metilcsoport, Y jelentése -CH=CH-csoport.

Lehetőség van a vegyületek farmakológiai szempontból elfogadható sóinak és észtereinek az előállítására is. Ilyenek például a káliumsók vagy az 1/2 kalciumsók, a metilészterek, n-propil-észterek, i-propil-észterek, ciklo-

propil-észterek, h-butyl-észterek, i-butyl-észterek, szek-butyl-észterek, terc-butyl-észterek, n-pentil-észterek, i-pentil-észterek vagy n-hexil-észterek és az ammóniumsók, trimetil-amin-sók, dietil-amin-sók, piperazinsók, morfolinsók, piperidinsók, auraminsók, diauraminsók vagy a trometaminsók a találmány szerinti vegyületek esetében.

A találmány szerinti vegyületek nemcsak a sebességmeghatározó enzimként HMG-CoA reduktazt tartalmazó koleszterol-bioszintézissel szemben rendelkeznek erős gátló hatással, hanem inhibitor aktivitást fejtenek ki az M-SMC sejtek migrációjával szemben, az I-SMC sejtek proliferációjával szemben, továbbá a vérsejteknek az endotheliás sejtekhez történő sejtadhézió-

jával szemben is, amint azt az alábbiakban megadásra kerülő vizsgálati eredmények bizonyítják. Így a találmány szerinti vegyületek alkalmasak a hiperlipidémia, a hiperlipoproteinemia és az atherosclerosis elleni kezelőszerként történő felhasználásra.

Az alkalmazás módjától függően különféle megfelelő készítményekké formálhatók a vegyületek. A találmány szerinti vegyületek beadhatók szabad savak formájában, vagy fiziológiailag hidrolizálható és elfogadható észterek vagy laktonok formájában, illetve gyógyszerészetiileg elfogadható sók alakjában.

A találmány szerinti készítményeket előnyösen orálisan alkalmazzuk, amelynek során a találmány szerinti vegyület alkalmazható önmagában vagy porok, granulák, tabletták vagy kapszulák formájában. Az utóbbiakat úgy állítjuk elő, hogy a találmány szerinti vegyületet összekeverjük egy megfelelő, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóanyaggal, amely hordozóanyag magában foglal kötőanyagokat, például hidroxipropil-cellulózt, szirupot, gumiarábikumot, zselatint, szorbitot, tragantot, poli(vinil-pirrolidon)-t vagy kalcium-karboxi-metil-cellulózt, töltőanyagokat, például laktózt, cukrot, kukoricakeményítőt, kalcium-foszfátot, szorbitot, glicint vagy kristályos cellulózport, lubrikánsokat, például magnézium-sztearátot, talkumot, polietilén-glikolt vagy szilícium-dioxidot, továbbá dezintegrátorokat, például burgonyakeményítőt.

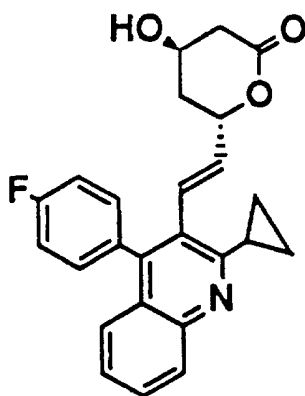
A találmány szerinti gyógyszerkészítmények azonban nem korlátozódnak az orális alkalmazhatóságra, hanem felhasználhatók parenterális kezelés során is. Például beadhatók kúp formájában is, amelyet olajos alapanyag, például kakaóvaj, polietilén-glikol, lanolin vagy zsírsav-triglicerid alkalmazásával állítunk elő; vagy bő-

rön keresztül felszívódó gyógyszerkészítményként, amelyet cseppfolyós paraffin, fehér vazelin, nagyobb szénatomszámú alkohol, Macrogol kenőcs, hidrophil kenőcs vagy hidrogél alapú anyag felhasználásával formálunk; injekció formájában, amelyet a következők közül egy vagy több anyag alkalmazásával állítunk elő: polietilén-glikol, hidrogél alapú anyag, desztillált víz, injekciós desztillált víz, valamint egy kötőanyag, például laktóz vagy kukoricakeményítő; továbbá nyálkahártyán, például a szem, orr vagy száj nyálkahártyáján keresztül alkalmazható készítmény formájában.

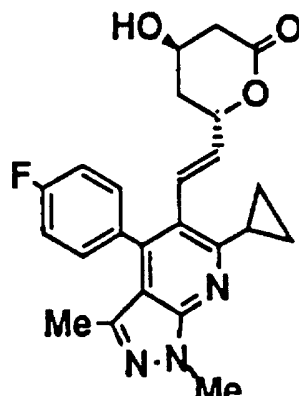
A találmány szerinti készítményeket kombinálhatjuk olyan, bázisos ioncserélő gyantákkal, amelyek képesek azokat az epesavakat megkötni, amelyeket a gasztrointesztinális traktus még nem abszorbeált.

Felnőtt ember esetén az I általános képletű vegyület napi adagja 0,05–500 mg, előnyösen 0,5–50 mg, amelyet naponként 1–3 alkalommal adunk be. A dózis természetesen változtatható a beteg korának, testtömegének, a betegség jellegének és súlyosságának figyelembevételével.

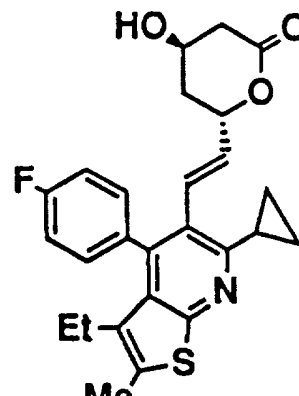
A találmány további részleteit ismertetik a következő példák, bizonyítva a találmány szerinti vegyületek gátló hatását az atherosclerotikus belső vastagodásra. A vizsgált, találmány szerinti vegyületek (1–3. tesztvegyület) és az összehasonlító vegyületek (a Pravastatin a 185275/1982. számú japán, vizsgálat nélküli szabadalmi közleményben vagy a 65835. számú európai szabadalmi bejelentésben, míg a Simvastatin a 122373/1981. számú japán, vizsgálat nélküli szabadalmi közleményben vagy a 33536. számú európai szabadalmi bejelentésben került ismertetésre) kémiai szerkezete a következő:



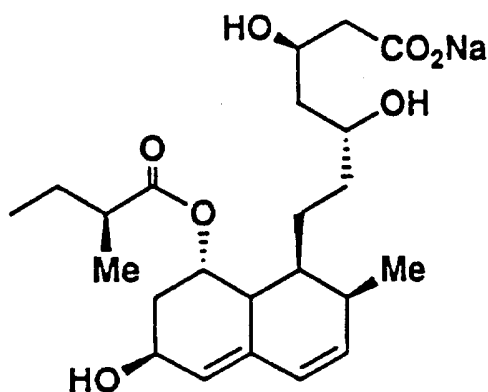
1. tesztvegyület



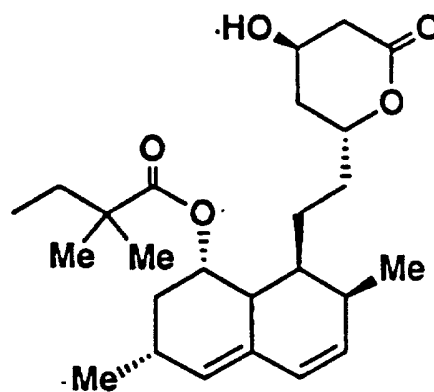
2. tesztvegyület



3. tesztvegyület



Pravastatin



Simvastatin

Referenciapéldák

(E)-transz-6-(2'-(4''-(4'''-fluor-fenil)-1'',3''-dimetil-6'''-(1''''-metil-etil)-pirazolo[3,4-b]piridin-5'''-il)-etenil)-4-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidro-2H-pirán-2-on (I-3b-1. vegyület)

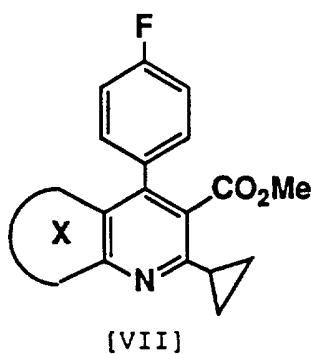
A vegyületet metil-2-ciklopropil-5-etil-3-(4'-fluor-fenil)-6-metil-tieno[2,3-b]piridin-3-il-karboxilát (VIIb-1. vegyület) kiindulási anyagként történő alkalmazásával állítottuk elő, a következő A–H lépések szerint.

Hasonló módon állítottuk elő az 1., 2. és 3. tesztvegyületet a következő intermedierekből (VIIa-1., VIIb-2. és VIIc-1. vegyület):

20 VIIa-1. vegyület
Metil-2-ciklopropil-4-(4'-fluor-fenil)-kinolin-3-il-karboxilát

25 VIIb-2. vegyület
Metil-6-ciklopropil-1,3-dimetil-4-(4'-fluor-fenil)-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il-karboxilát

30 VIIc-1. vegyület
Metil-6-ciklopropil-3-etil-4-(4'-fluor-fenil)-2-metil-tieno[2,3-b]piridin-5-il-karboxilát



	X	Olvadáspont (°C)
VIIa-1		113,5–116,5
VIIb-2		121–123
VIIc-1		168–169

1. tesztvegyület (I-3a-1)

(E)-transz-6-(2'-(2''-ciklopropil-4'''-(4''''-fluor-fenil)-kinolin-3'''-il)-etenil)-4-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidro-2H-pirán-2-on

2. tesztvegyület (I-3b-2)

(E)-transz-6-(2'-(6''-ciklopropil-1'',3''-dimetil-4'''-(4''''-fluor-fenil)-pirazolo[3,4-b]piridin-5'''-il)-etenil)-4-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidro-2H-pirán-2-on

3. tesztvegyület (I-3c-1)

(E)-transz-6-(2'-(2''-ciklopropil-5''-etil-3'''-(4''''-fluor-fenil)-6''-metil-tieno[2,3-b]piridin-3'''-il)-etenil)-4-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidro-2H-pirán-2-on

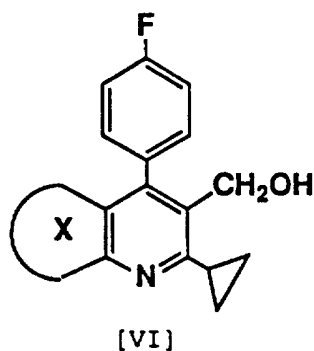
A lépés

4-(4'-fluor-fenil)-5-(hidroxi-metil)-1,3-dimetil-6-(1'-metil-etil)-pirazolo[3,4-b]piridin (VI-b-1)

Nitrogénatmoszféra alatt száraz toluolban feloldotunk 5,0 g (0,014 mol) VIIb-1. vegyületet, majd az ol-

datot jégfürdőben 0 °C hőmérsékletre hűtöttük. Csep-penként 35 ml, 16 tömeg% diizobutil-alumínium-hidridet tartalmazó toluolos oldatot adtunk az előbbi keverékhez, és az elegyet 2 órán keresztül 0 °C hőmérsékleten kevertettük. Miután vékonyréteg-kromatográfiás úton meggyőződünk arról, hogy a VIIb-1. vegyület teljesen eltűnt, a reakció befejezésére telített ammónium-klorid-oldatot adtunk a reakcióelegyhez 0 °C hőmérsékleten. A keverékhez dietil-étert adtunk, majd a szerves fázist elválasztottuk. A gélesedett anyag feloldása céljából vizes nátrium-hidroxid-oldatot adtunk hozzá, majd az oldatot dietil-éterrel extraháltuk. A dietil-éteres extraktumokat egyesítettük, vízmentes magnézium-szulfát felett szárítottuk, szűrtük, majd az oldószert ledesztillálva 3,9 g mennyiségben nyertük a halványsárga, kívánt terméket. A hozam 88%-nak felelt meg. A vegyület olvadáspontja 174–175 °C.

Hasonló eljárással állítottuk elő az alábbiakban felsorolt vegyületeket is:



	X	Olvadáspont (°C)
VIa-1		120–126
VIb-2		168–170
VIc-1		118–120

B lépés

5-Formil-4-(4'-fluor-fenil)-1,3-dimetil-6-(1'-metil-etil)-pirazolo[3,4-b]piridin

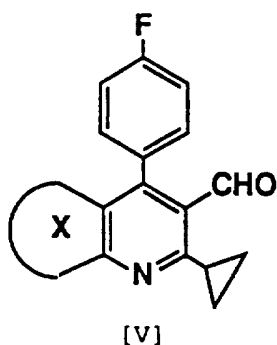
Vb-1

Szobahőmérsékleten 4,2 g (19 mmol) piridinium-klór-kromátot, 0,69 g vízmentes nátrium-acetátot és 3,8 g (12 mmol) VIb-1. vegyületet szuszpendáltunk

55 50 ml száraz diklór-metánban. A reakcióelegyet egy órán keresztül kevertettük, majd 100 ml dietil-étert adtunk hozzá és erőteljesen összekevertük. A reakciókeveréket szivítás közben átszűrtük egy celitrétegen, majd a szűrletet csökkentett nyomás alatt szárazra pároltuk. A maradékot szilikagélen oszlopkromatográfiásan tisztítottuk, eluensként kloroformot alkalmazva. Így

2,9 g halványsárga, kívánt terméket nyertünk. A hozam 78%-nak felelt meg. A vegyület olvadáspontja 144–146 °C volt.

Hasonló eljárással állítottuk elő az alábbiakban felsorolt vegyületeket is:



	X	Olvadáspont (°C)
Va-1		150,1–151,6
Vb-2		149–151
Vc-1		174–176

C és D lépés
(E)-3-(4'-(4''-fluor-fenil)-1',3'-dimetil-6'-(1''-metil-etil)-pirazolo[3,4-b]piridin-5'-il)-propénaldehid
IIIb-1

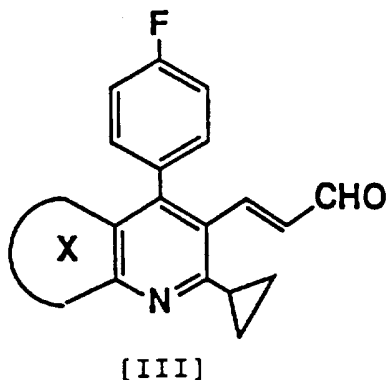
C lépés
Feloldottunk 1,45 g (40 mmol) cisz-1-etoxi-2-(tri/n-butyl-sztannil)-etilént 50 ml száraz tetrahydrofuranban, majd az oldatot nitrogénáram alatt lehűtöttük –78 °C hőmérsékletre. Cseppenként 26 ml (40 mmol), 15 tömeg% n-butyl-litiumot tartalmazó n-hexános oldatot adtunk az oldathoz. A keveréket 20 percen keresztül kevertettük. Ezt követően 2,5 g (8 mmol) Vb-1. vegyület 20 ml száraz tetrahydrofuranból készült oldatát adtuk cseppenként az előbbi keverékhez. Az így kapott reakciókeveréket –78 °C hőmérsékleten egy órán keresztül kevertettük, majd a reakció leállítására céljából 26 ml telített ammónium-klorid-oldatot adtunk hozzá. A szerves fázist dietil-éterrel extraháltuk, majd az éteres extraktumot telített, vizes nátrium-klorid-oldattal mostuk, és vízmentes magnézium-szulfát felett szárítottuk. Az oldószerrel csökkentett nyomás alatt ledesztilláltuk, majd

a maradékot n-hexán és acetonitril között megosztottuk, és az acetonitriles fázist csökkentett nyomás alatt bepároltuk, s az oldószerrel eltávolítva a lényegében tiszta IV-1. vegyületet kaptuk.

D lépés

A C lépésben nyert IVb-1. vegyületet feloldottuk 70 ml tetrahydrofuranban, és 20 ml vizet, valamint 3 g p-toluolszulfonsavat adtunk hozzá. A keveréket 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük. A reakcióelegyet vizes nátrium-hidroxid-oldattal óvatosan semlegesítettük, majd dietil-éterrel néhányszor extraháltuk. Az extraktumot telített, vizes nátrium-klorid-oldattal mostuk, majd vízmentes magnézium-szulfát felett szárítottuk. Az oldószerrel csökkentett nyomás alatt ledesztilláltuk. A maradékot szilikagél oszlopkromatográfiával tisztítottuk, eluensként etil-acetát/n-hexán 1:9 térfogatarányú elegyet alkalmazva. A sárga, kívánt terméket 2,2 g mennyiségben kaptuk, amely 79%-os hozamnak felelt meg. A vegyület olvadáspontja 133–134 °C volt.

Hasonló úton nyertük az alábbiakban felsorolt vegyületeket is:



	X	Olvadáspont (°C)
IIIa-1		141,3–144,1
IIIb-2		135–137
IIIc-1		136–138

E lépés

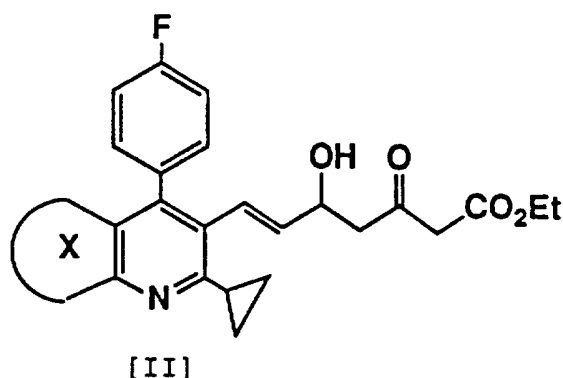
Etil-(E)-7-(4'-(4''-fluor-fenil)-1',3'-dimetil-6'-(1''-metil-etil)-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il)-5-hidroxi-3-oxo-hept-6-enoát

IIb-1

Száraz petroléterrel mostunk 1,25 g 60%-os nátrium-hidridet, nitrogénáram alatt szárítottuk, majd elszuszpendáltuk 200 ml száraz tetrahidrofuránban. A szuszpenziót nitrogénatmoszféra alatt lehűtöttük –15 °C hőmérsékletre, majd 3,9 ml (30 mmol) etil-acetoacetátot adtunk cseppenként hozzá. A keveréket 15 percen keresztül kevertettük. Ezt követően 20 ml (30 mmol), 15 tömeg% n-butil-lítiumot tartalmazó hexános oldatot adtunk cseppenként hozzá, majd a keve-

45 réket 30 percen keresztül kevertettük. Száraz tetrahidrofuránnal készült, 2,1 g (6,1 mmol) IIIb-1. vegyületet tartalmazó oldatot adtunk cseppenként az előbbi keverékhez, majd további egy órán át kevertettük. A reakciókeverékhez 10 ml telített, vizes ammónium-klorid-oldatot adtunk –15 °C hőmérsékleten, majd a keveréket dietil-éterrel háromszor extraháltuk. Az éteres oldatot telített, vizes nátrium-klorid-oldattal mostuk, vízmentes magnézium-szulfát felett szárítottuk, majd csökkentett nyomás alatt szárazra pároltuk. A maradékot szilikagélen, oszlopkromatográfias úton tisztítottuk, eluensként etil-acetát/kloroform 1:9 térfogatarányú elegyet alkalmazva. 2,5 g (89%) fehér termék, amelynek olvadáspontja 95–98 °C.

Hasonló eljárással állítottuk elő az alábbi vegyületeket is:



	X	Olvadáspont (°C)
IIa-1		91:0–93,0
IIb-2		olajos anyag
IIc-1		olajos anyag

F lépés

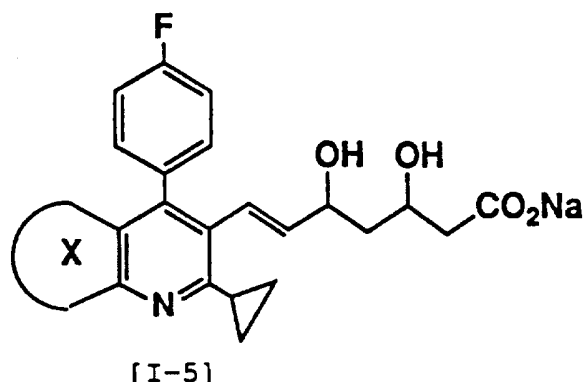
Etil-(E)-7-(4'-(4''-fluor-fenil)-1',3'-dimetil-6'-(1''-metil-etil)-pirazolo[3,4-b]piridin-5'-il)-3,5-dihidroxi-hept-6-enoát I-1b-1

Nitrogénatmoszféra alatt feloldottunk 2,32 g (4,96 mmol) IIb-1. vegyületet 20 ml etanolban, és az oldatot 0 °C hőmérsékletre hűtöttük. Ezt követően 740 mg (20 mmol) nátrium-bór-hidridet adtunk hozzá, és a keveréket egy órán keresztül kevertettük. A keveréket óvatosan semlegesítettük 10%-os vizes hidrogén-klorid-oldat hozzáadásával. A keveréket dietil-éterrel háromszor extraháltuk. Az éteres oldatot telített, vizes

45 nátrium-klorid-oldattal mostuk, vízmentes magnézium-szulfát felett szárítottuk, majd csökkentett nyomás alatt szárazra pároltuk. A visszamaradt olajat szilikagélen, oszlopkromatográfiás úton tisztítottuk, eluensként etanol/kloroform 3:97 térfogatarányú elegyet alkalmazva. A tiszta, kivánt terméket szintelen, viszkózus olaj formájában kaptuk, ami 78%-os hozamnak felelt meg.

50 ¹H-NMR (δ, ppm CDCl₃) 1,28 (t, J = 8 Hz, 3H), 1,32 (d, J = 8 Hz, 6H); 1,4–1,8 (m, 1H), 1,92 (s, 3H), 2,2–2,6 (m, 3H), 2,9–3,8 (m, 2H), 3,42 (7 heptalett, J = 8 Hz, 1H), 4,06 (s, 3H), 4,1–4,6 (m, 4H), 55 5,1–5,5 (m, 1H), 6,4–6,7 (m, 1H), 6,9–7,3 (m, 4H).

Hasonló eljárással állítottuk elő a következő vegyületeket is:



	X	Olvadáspont (°C)
I-5a-1		197–199 (bomláspon)
I-5b-2		230–237 (bomláspon)
I-5c-1		212–216 (bomláspon)

(E)-7-(4'-(4''-fluor-fenil)-1',3'-dimetil-6'-(1''-metil-etil)-pirazolo[3,4-b]piridin-5'-il)-3,5-dihidroxi-hept-6-énsav

I-2b-1

Feloldottunk 0,25 g (0,53 mmol) I-1b-1. vegyületet 3 ml etanolban, majd cseppenként 1,06 ml 0,5 N vizes nátrium-hidroxi-oldatot adtunk hozzá. Az etanolt csökkentett nyomás alatt ledesztilláltuk, és a maradékhoz 3 ml vizet adtunk. A keveréket dietil-éterrel extraháltuk. A vizes réteget óvatosan semlegesítettük 1%-os hidrogén-klorid-oldat hozzáadásával, majd dietil-éterrel extraháltuk. Az éteres fázist vízmentes magnézium-szulfát felett szárítottuk. Az oldószert csökkentett nyomás alatt eltávolítva a kívánt terméket nyertük, amelynek tömege 0,21 g volt, ez 90%-os hozamnak felelt meg.

¹H-NMR (δ, ppm, DMSO-d₆): 1,29 (d, J = 7 Hz, 6H), 1,83 (s, 3H), 2,1–2,3 (m, 2H), 2,4–2,6 (m, 1H), 3,0–3,6 (m, 4H), 3,96 (s, 3H), 4,3–4,8 (m, 2H),

5,2–5,6 (m, 1H), 6,3–6,6 (m, 1H), 7,2–7,4 (m, 4H), 11,5–12,0 (széles s, 1H).

45

H lépés

(E)-transz-6-(2'-(4''-(4'''-fluor-fenil)-1'',3''-dimetil-6''-(1'''-metil-etil)-pirazolo[3,4-b]piridin-5''-il)-etenil)-4-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidro-2H-pirán-2-on

50

I-3b-1

Feloldottunk 130 mg (0,29 mmol) I-2b-1. vegyületet 6 ml diklór-metánban, és 125 mg (0,29 mmol) N-ciklohexil-N'-(2''-metil-morfolino-etil)-karbodiimid-p-toluolszulfonátot adtunk az oldathoz. A keveréket szobahőmérsékleten két órán keresztül kevertettük. Az oldószert csökkentett nyomás alatt lepároltuk. A visszamaradt olajat szilikagélen, vékonyréteg-kromatográfiai úton tisztítottuk, eluensként hexán és etil-acetát 9:1 térfogatarányú elegyét alkalmazva. A tiszta, kívánt terméket színtelen, viszkózus olaj formájában

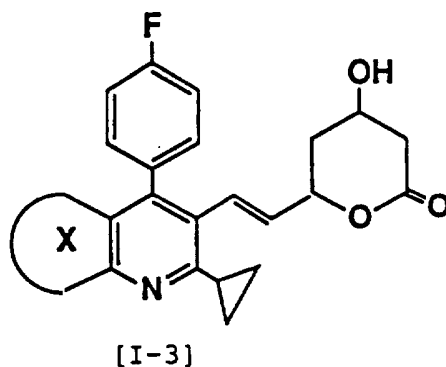
60

nyertük. A vegyületet 48 mg mennyiségben, 39%-os hozammal kaptuk.

¹H-NMR (δ, ppm, CDCl₃): 1,33 (d, J = 6,8 Hz, 6H), 1,4–1,5 (m, 1H), 1,6–1,7 (m, 2H), 1,93 (s, 3H), 2,5–2,6 (m, 1H), 2,68 (dd, J = 18 Hz, J = 5 Hz, 1H), 3,39 (7 heptalett, J = 6,8 Hz, 1H), 4,07 (s, 3H),

4,1–4,2 (m, 1H), 5,1–5,2 (m, 1H), 5,31 (dd, J = 16 Hz, J = 6 Hz, 1H), 6,61 (dd, J = 16 Hz, J = 1,5 Hz, 1H), 7,1–7,3 (m, 4H).

Hasonló eljárással állítottuk elő az alábbi vegyületeket is:



	X	Olvadáspont (°C)
I-3a-1		199–201
I-3b-2		122–127
I-3c-1		164–166

1. példa

Az aorta középső simaizomsejtek (M-SMC) migrációjára gyakorolt gátló hatás

A találmány szerinti vegyületeknek az M-SMC sejtek migrációjára gyakorolt hatását a következő módszerekkel mértük.

Egy Sprague-Dawley hím patkány aortájának mellkasi arteriális metszetét 10% magzati borjú szérumot (FBS; fetal bovine serum) tartalmazó DME (Dulbecco's Modified Eagle) médium alkalmazásával, 37 °C hőmérsékleten, 5% szén-dioxidot és 95% levegőt tartalmazó atmoszférában 3 vagy 4 héten keresztül tenyésztettük. Az arteriális középső metszetekből kitenyésztett aorta közép simaizomsejteket átoltottuk (passzáltuk). A háromszori vagy négyszeri passzálás után a konfluens állapotban lévő sejteket tripszinizáltuk, majd a fenti médiumban szuszpendáltuk, 500 000 sejt/ml sejtsűrűség mel-

lett. A sejtsuszpenzióhoz egy tesztvegyület dimetil-szulfoxidos (DMSO) oldatát adtuk olyan mennyiségben, hogy a végső DMSO-koncentráció 0,2% legyen, majd a sejtsuszpenziót 37 °C hőmérsékleten, 30 percen keresztül előinkubáltuk. Kontrollként DMSO-t önmagában adtunk hozzá, azonos koncentrációértékkel. Egy nitro-cellulóz membránnal elválasztott Boyden-féle kamra alsó rekeszébe migrációs faktorként 10 mg/ml PDGF-t vagy 48 órás kondicionálás után nyert, 10% SMC-kondicionált DME médiumot (SMC-CM) töltöttünk. A felső részbe 1 ml sejtsuszpenziót mértünk be, majd az inkubációt 37 °C hőmérsékleten 4 órán keresztül a tenyésztési körülmények között végeztük. Vakpróbaként az alsó részbe migrációs faktor nélküli DME médiumot töltöttünk. Négyórás inkubáció után a nitro-cellulóz membrán felső oldalára tapadt sejteket eltávolítottuk, és a membrán alsó oldalára vándorolt sejteket rögzítettük és Diff

Quikkel megfestettük. A migrált sejteket fénymikroszkóppal (400×HPF), 10 mezős területen megszámoltuk.

A kapott eredmények minden esetben három kamra sejtszámának átlagértékeit reprezentálják, és a gátlás (%) a következő egyenlet alapján számítottuk.

$$\text{Gátlás (\%)} = 100 - \{(T-B)/C(C-B) \times 100\}$$

ahol az egyenletben

B: a vakpróba sejtszáma,

C: a kontroll sejtszáma, és

T: a tesztvegyületet tartalmazó próba sejtszáma.

Az eredményeket az 5. táblázat mutatja be. Az összehasonlító vegyületekhez viszonyítva a találmány szerinti vegyületek erős gátló hatást mutattak az M-SMC sejtek migrációjával szemben.

5. táblázat

	Gátlás (%)	
	PDGF	SMC-CM
Hatóanyag-koncentráció (M)	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
1. tesztvegyület	77,8	28,4
2. tesztvegyület	98,2	32,8
3. tesztvegyület	100	41,7
Pravastatin	61,8	26,2

2. példa

Az aorta belső és középső simaizomsejtek (I-SMC és M-SMC) proliferációjára gyakorolt gátló hatás

A találmány szerinti vegyületeknek az I-SMC és M-SMC sejtek proliferációjára gyakorolt gátló hatását a következő módszerekkel mértük.

Egy antibiotikumot és 10% FBS-t tartalmazó DME médium alkalmazásával egy egészséges japán fehér nyúlból nyert aorta-középmetszeteket, valamint egy három hónapon keresztül 1%-os koleszteroldiétával táplált, atherosclerotikus japán fehér nyúlból nyert aorta-középből elkülönített, károsodott aorta belső metszeteit az 1. példában ismertetett módon tenyésztettük. A sejtek kétszeri vagy háromszori passzálása után a konfluens állapotban lévő sejteket tripszinizáltuk, és a fenti médiumban, 20 000 sejt/ml sejtsűrűséggel szuszpendáltuk. Ezt követően 10 000 sejtet kiemeltünk és egy 24 lyukú tenyésztőlemezen tenyésztettünk. Hatórás inkubáció után a médiumot lecseréltük 0,5 ml kontroll médiummal vagy a tesztvegyületet tartalmazó médiummal. Egyidejűleg megszámoltuk a kezdeti, lemezhez tapadt sejtek számát, amit kezdeti sejtszámként (I) jelöltünk. Az 1. példában ismertetett módon hozzáadtuk a médiumhoz a tesztvegyületet. Kontrollként DMSO-t önmagában adtunk hozzá, úgy, hogy a végső koncentráció 0,2% legyen. A médium cseréjét kétnaponként végeztük, és az első, második, harmadik, ötödik és hetedik napon a sejteket tripszinizáltuk, majd Isotonban szuszpendáltuk és egy Coulter-számlálóval meghatároztuk a sejtszámot.

A kapott eredmények minden esetben három lyuk sejtszámainak átlagát reprezentálják, és a 2. és 5. napi

sejtszámnövekedés gátlását (%) a következő egyenlet alapján számoltuk ki.

$$\text{Gátlás (\%)} = 100 - \{(T_5/T_2)/(C_5/C_2) \times 100\}$$

ahol T₂ és T₅ a 2. és az 5. napi sejtszám a tesztvegyületet tartalmazó médiumban, és C₂ és C₅ a 2. és 5. napi sejtszám a kontroll médiumban.

Az eredményeket a 6. táblázat mutatja be. Az összehasonlító vegyülethez viszonyítva a találmány szerinti vegyületek erős gátló hatással rendelkeznek mind az I-SMC, mind az M-SMC sejtek proliferációjára. Ezen túlmenően az I-SMC sejtproliferációra gyakorolt hatás erősebb volt, mint az M-SMC sejtproliferációra kifejtett hatás.

6. táblázat

15

	Gátlás (%)			
	Belső		Középső	
Hatóanyag-koncentráció (M)	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
1. tesztvegyület	36,4	98,1	6,3	91,5
2. tesztvegyület	84,6	98,2	4,7	86,5
3. tesztvegyület	100	100	31,5	100
Pravastatin	1,3	1,3	8,7	-11,7

20

25

3. példa

Az aorta belső és középső simaizomsejtekben (I-SMC és M-SMC2 sejtekben) történő ³H-timidin felvételle gyakorolt gátló hatás

Az I-SMC és M-SMC sejtekben történő ³H-timidin felvételle gyakorolt gátló hatást a találmány szerinti vegyületek esetén az alábbi módszerek szerint mértük.

A 2. példában említettek szerint nyerünk M-SMC és I-SMC sejteket egy egészséges japán fehér nyúl aortaközepéből és egy atherosclerotikus japán fehér nyúl aortabelsejéből. Háromszori vagy négyszeri passzálás után, a konfluens állapotú sejteket tripszinizáltuk, majd 10% FBS-t és egy antibiotikumot tartalmazó DME médiumban szuszpendáltuk úgy, hogy a sejtsűrűség 40 000 sejt/ml legyen. A 10 000 sejtet áthelyeztük egy 48 lyukú tenyésztőlemezsre. Négy napos tenyésztés után a médiumot lecseréltük a kontroll médiummal, és a tenyésztést 24 órán keresztül folytattuk. Hasonlóan jártunk el a tesztvegyületet tartalmazó médiummal történt cserét követően is. Ezután 1 μCi (37 MBq) ³H-timidint adtunk hozzá, majd a tenyésztést 3 órán keresztül folytattuk.

A sejteket háromszor mostuk foszfátpufferolt fiziológiás sóoldattal (PBS; phosphate buffered physiological saline), és utána hideg, 5%-os triklór-ecetsavval (TCA) kezeltük. Az oldhatatlan frakciót hideg TCA-val mostuk, majd feloldottuk 0,5 N vizes kálium-hidroxid-oldatban.

A ³H radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóval mértük, és mértük a proteintartalmat is.

A kapott eredményeket az 1 mg proteinre vonatkoztatott radioaktivitásra számítottuk, és 3 lyuk átlagértékeit reprezentálják. A gátlást (%) a következő egyenlet alapján számítottuk:

$$\text{Gátlás (\%)} = 100 - T/C \times 100$$

Az eredményeket a 7. táblázat mutatja be. Az összehasonlító vegyülethez viszonyítva a találmány szerinti vegyületek erős gátló hatást mutatnak a ³H-timidinnek a DNS frakcióba történő beépülésére a belső és a középső simaizomsejtekben.

7. táblázat

	Gátlás (%)			
	Belső		Középső	
Hatóanyag-koncentráció	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
1. tesztvegyület	32,2	83,1	46,7	90,8
2. tesztvegyület	11,7	91,5	36,4	88,4
3. tesztvegyület	69,9	94,1	53,6	92,2
Pravastatin	-7,0	-7,2	8,7	-34,3

4. példa

A leukémiás sejtek (HL-60) adhéziójával szembeni gátló hatás

A találmány szerinti vegyületeknek a HL-60 sejtek adhéziójára gyakorolt gátló hatását a következő módszer szerint mértük.

HL-60 sejteket tenyésztettünk 10% FBS-t és egy antibiotikumot tartalmazó RPMI 1640 médiumban, 37 °C hőmérsékleten, 95% levegőből és 5% szén-dioxidból álló atmoszférában, majd 6 lyukú tenyésztőlemezre vittük át lyukanként 2 ml mennyiségben és 1 000 000/ml sejtsűrűséggel. Dimetil-sulfoxidban oldott tesztvegyületet adtunk hozzá úgy, hogy a végső DMSO-koncentráció 0,2% legyen, s ezt követően az előkezeléshez 48 órán keresztül inkubáltuk. Ezután 500 000 sejtet áthelyeztünk egy 24 lyukú tenyésztőlemezre, és 0,02 mM phorbol-mirisztát-acetát (TPA) etanolos oldatát adtuk a tenyésztő médiumhoz, 1/250 térfogatarányban. Az inkubációt 12 órán keresztül folytattuk, majd a sejteket PBS-sel mostuk és a lemezre tapadt sejteket tripszinizációval felvettük, Isoton-ban szuszpendáltuk. A sejtszámot Coulter-számlálóval határoztuk meg. A kontrollvizsgálatot DMSO önmagában történő hozzáadásával végeztük.

A kapott eredmények az előkezeléskor a három lyukban lévő sejtek számának átlagértékét reprezentálják, és a gátlást (%) a következő egyenlet alapján számítottuk:

Az adhézió elleni gátlás (%) = $100 - T/C \times 100$
ahol T a tesztvegyületet tartalmazó médiumban lévő sejtek száma, és

C a kontroll médiumban lévő sejtek száma.

Az eredményeket a 8. táblázat mutatja be. Az összehasonlító vegyülethez viszonyítva a találmány szerinti vegyületek határozottan erős gátló hatást gyakoroltak a TPA indukált HL-60 sejtadhézióra.

8. táblázat

	Gátlás (%)		
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
5 Hatóanyag-koncentráció (M)			
1. tesztvegyület	1,0	12,3	98,7
3. tesztvegyület	4,8	92,2	96,4
10 Pravastatin			-2,8

5. példa

A J774 makrofágok (J774-M0) adhéziójával szembeni gátló hatás

15 A J774-M0 sejtadhézióra kifejtett hatást a találmány szerinti vegyületek esetén a következő módszer alkalmazásával mértük.

Egy 6 lyukú tenyésztőlemezre 1 000 000 sejtet helyeztünk, és a sejteket 10% FBS-t és egy antibiotikumot tartalmazó DME médium 1 ml-ében, 37 °C hőmérsékleten, 95% levegőből és 5% szén-dioxidból álló atmoszférában 2 napon keresztül tenyésztettük. Ezután előkezelésként a tenyésztést 0,2% DMSO-tartalmú kontroll médiummal, illetve egy tesztvegyületet tartalmazó médiummal folytattuk 48 órán keresztül. A sejteket gumilapáttal (rubber policeman) lekapartuk és a fenti médiumban szuszpendáltuk. Egy 24 lyukú tenyésztőlemezre helyeztünk 200 000 sejtet és 12 órán keresztül tenyésztettük. Ezután a lemezre tapadt sejteket gumilapáttal lekapartuk, és Coulter-számláló segítségével meghatároztuk a sejtszámot.

25 A kapott eredmények minden esetben az előkezelés idején három lyukban lévő sejtek számának átlagértékét reprezentálják, és az adhézióra gyakorolt gátlást (%) a következő egyenlet alapján számítottuk:

30 Adhézió elleni gátlás (%) = $100 - T/C \times 100$
ahol

T a tesztvegyületet tartalmazó médiumban lévő sejtek száma, és

40 C a kontroll médiumban lévő sejtek száma.

Az eredményeket a 9. táblázat mutatja be. A találmány szerinti vegyületek erős gátló hatást mutattak a J774-M0 sejtadhézióval szemben.

9. táblázat

	Gátlás (%)	
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
55 Hatóanyag-koncentráció		
1. tesztvegyület	53,0	74,2
3. tesztvegyület	92,2	92,4
Pravastatin	40,0	41,3
55 Simvastatin	48,5	48,6

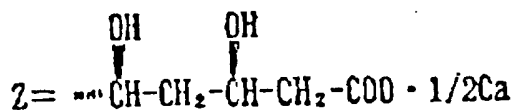
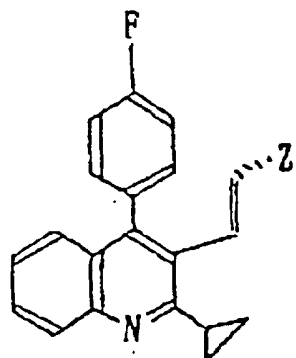
A találmány szerinti vegyületeknek HMG-CoA redukázgátló hatásuk van és gátolják az atherosclerotikus belső vastagodást. Így ezek a vegyületek megelőző hatóanyagként jól használhatók koronáriás szívbetegedések, például angina pectoris, miokardiális in-

farktus, PTCA utáni reathenosis, sabarachnoid vérzés és elzáródó sclerosisos arteritis esetén.

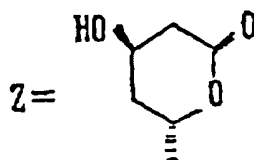
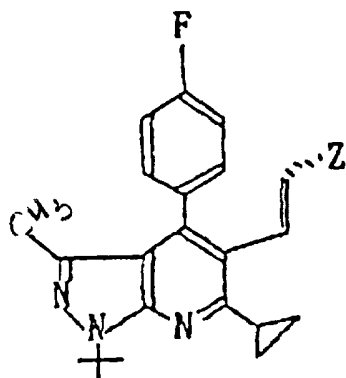
6. példa

A fenti 1-3. példában leírt farmakológiai módszerekkel vizsgáltuk az I általános képletű vegyületek további példáiként vizsgált alábbi 4-10. tesztvegyületek

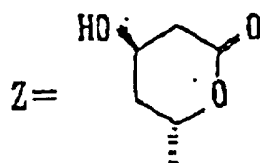
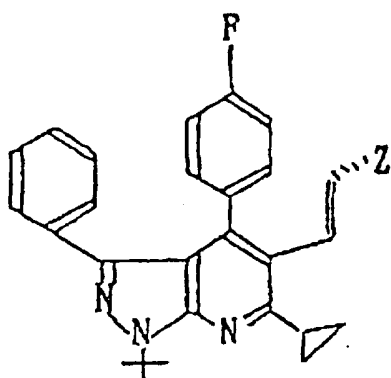
5 farmakológiai tulajdonságait.



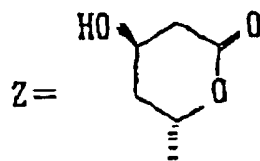
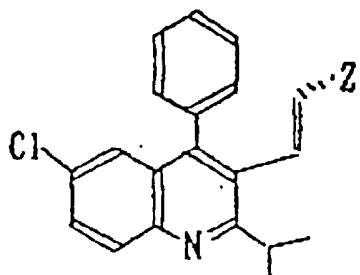
4. tesztvegyület



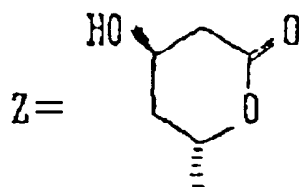
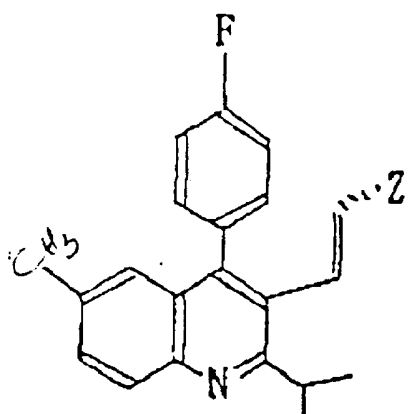
5. tesztvegyület



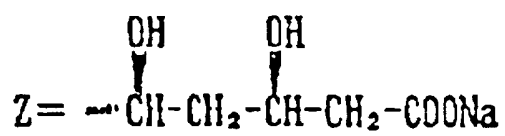
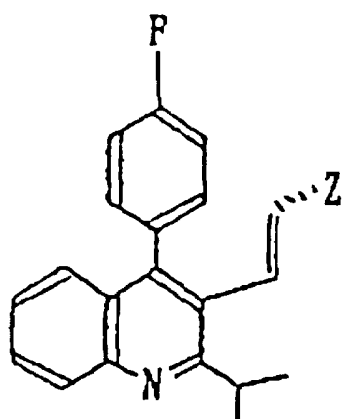
6. tesztvegyület



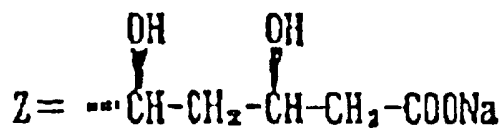
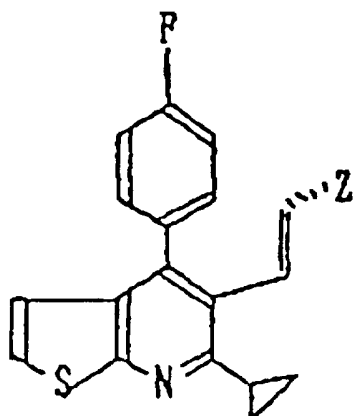
7. tesztvegyület



8. tesztvegyület



9. tesztvegyület



10. tesztvegyület

a) Az 1. példában leírt módon vizsgáltuk az alábbi 10. táblázatban felsorolt vegyületek gátló hatását az aorta középső simaizomsejtek (M-SMC) migrációjára. Az eredményeket a 10. táblázat mutatja.

10. táblázat

	Gátlás (%)	
	PDGF	SMC-CM
Hatóanyag-koncentráció	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
4. tesztvegyület	90,9	67,5
5. tesztvegyület	98,3	24,4
6. tesztvegyület	100	58,3
7. tesztvegyület	89,7	45,2
8. tesztvegyület	100	46,2
9. tesztvegyület	95,6	85,3
10. tesztvegyület	100	68,9
Pravastatin	67,2	14,3

b) A 2. példában leírt módon vizsgáltuk az alábbi 11. táblázatban felsorolt vegyületeknek az aorta belső és középső simaizomsejtek (I-SMC és M-SMC) proliferációjára gyakorolt gátló hatását. Az eredményeket a 11. táblázat mutatja.

11. táblázat

Hatóanyag-koncentráció (M)	Gátlás (%)			
	Belső		Középső	
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
4. tesztvegyület	11,6	55,1	15,3	52,7
5. tesztvegyület	93,8	81,0	-20,2	37,5
6. tesztvegyület	93,3	90,6	-11,6	41,9
7. tesztvegyület	3,4	88,0	12,1	13,8
8. tesztvegyület	18,4	91,2	24,2	51,6
Pravastatin	0,9	14,2	-13,4	-4,0

c) A 3. példában leírt módon vizsgáltuk az alábbi 12. táblázatban felsorolt vegyületeknek az aorta belső és középső simaizomsejtekben történő ³H-timidin felvételt gyakorolt gátló hatását. Az eredményeket a 12. táblázat mutatja.

12. táblázat

Hatóanyag-koncentráció	Gátlás (%)			
	Belső		Középső	
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
4. tesztvegyület	31,2	80,0	-	-
5. tesztvegyület	68,0	93,5	36,2	84,2
6. tesztvegyület	48,8	88,0	42,3	88,7
7. tesztvegyület	33,6	50,8	37,0	44,9
8. tesztvegyület	25,4	64,5	36,5	67,5
Pravastatin	4,8	23,7	10,0	15,5

7. példa

Gátló hatás az aorta belső érfalvastagodására és a szérumban koleszterinre a ballonkatéteres behámsérülési modellel nyulakon

5 a) Kísérletek

A vizsgálatához 2,5–2,9 testtömegű japán fehér nyulakat alkalmaztunk és ezeknek napi 100 g normális táplálékot és 250 ml vizet adtunk.

10 A 4. tesztvegyület 0,5%-os vizes karboximetil-cellulóz oldatban szuszpendáltuk és ezt a szuszpenziót naponta egyszer, reggel 9 órakor adtuk be a nyulaknak.

A kontroll nyulak hatóanyag nélküli 0,5 t%-os karboximetil-cellulóz oldatot kaptak.

15 8 napi adagolás után 3F Fogarty-katétert vezetünk be a nyulak bal oldali fő nyaki aortájába és az endoteliumot háromszor lecsupaszítottuk állandó ballonnyomás alatt.

20 Az adagolást további három hétig folytattuk, majd az állatokat leöltük és nyaki aortájukat kivettük. A kivett nyaki aortát azonnal fixáljuk 10 t%-os semleges formaldehid-pufferoldattal.

A nyaki aorta 4 részéből vett aorta-mintadarabokat patológiásan megfestettük „elastica van gison” (EVG) színezéssel.

25 A belső vastagodást mutató felületet számítógépes képanalízissel mértük; a kapott eredményeket az alábbi 1. ábrán mutatjuk be.

30

35

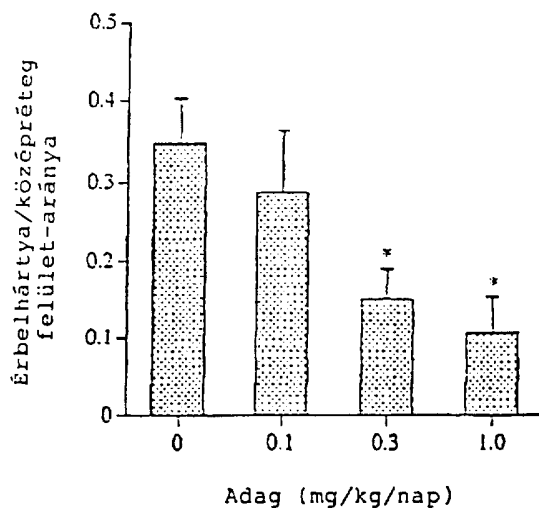
40

45

50

55

60

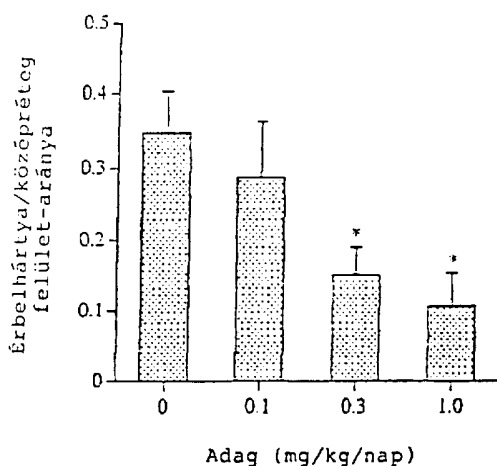


1. ábra

Gátló hatás a belső érfalvastagodásra ballonkatéteres endotéliás sérüléssel nyúlmodellen, a 4. tesztvegyület orális beadása után (*p<0,05)

Más részről, a szérumban koleszterin mennyiségét a szokásos, kereskedelemben beszerezhető enzimesszel mértük: a 11 nap után kapott eredményeket az alábbi 2. ábrán mutatjuk be.

23



2. ábra

Gátló hatás a szérum koleszterinre ballonkatéteres endotéliás sérüléses nyúlmodellen, a 4. tesztvegyület orális beadása után (* $p < 0,01$ ** $p < 0,01$)

Mértük a szérum koleszterin-szintet csökkentő hatást emberen is, oly módon, hogy a 4. tesztvegyületet 7 felsőt, legalább 220 mg/dl koleszterin-szintű embernek adtuk be naponta egyszeri 1 mg-os adagban. A kapott eredményeket az alábbi táblázatban foglaltuk össze:

Szérum koleszterin a beadás kezdetén	Szérum koleszterin 2 heti beadás után	A szérum koleszterin-csökkenés mértéke
220,9 mg/dl	170,0 mg/dl	23%

b) Értékelés

1. A nyulakon végzett kísérletekre vonatkozó 1. ábrán bemutatott eredményekből nyilvánvaló, hogy a találmány körébe tartozó vegyületek eredményesen alkalmazhatók az ateroszklerotikus belső érfalvastagodás inhibitoraként, a testtömegre számított legalább 0,3 mg/kg napi adagokban.

2. Ugyancsak nyilvánvaló a szintén nyulakon végzett kísérletekre vonatkozó 2. ábrán bemutatott eredményekből, hogy a 4. tesztvegyület (amelyet a 304 063 EP leírás a koleszterin bioszintézisét gátló hatóanyagként ismertet) hatásos HMG-CoA reduktáz inhibitor a testtömegre számított 0,3 mg/kg napi adagokban.

3. Más részről az is nyilvánvaló az embereken végzett kísérletek eredményeiből, hogy a találmány körébe tartozó vegyületek emberen is hatásos HMG-CoA inhibitorok a testtömegre számított legalább 0,02 mg/kg napi adagokban (ennek az adagnak a kiszámítása során az emberek átlagos testtömeget 60 kg-nak tételeztük fel).

4. A fentiek alapján tehát úgy véljük, hogy a jelen találmány körébe tartozó vegyületek hatásos gyógyászati adagja a humán ateroszklerotikus belső érfalvastagodás inhibitoraként történő alkalmazásban az emberi testtömegre számítva legalább napi 0,03 mg/kg.

8. példa

Gyógyászati készítmények előállítás

Az alábbi példában a beadásra kész gyógyászati készítmények, mint tabletták, kemény kapszulák, rugalmas kapszulák, végbélkúpok, injekciós és granulált készítmények elkészítési módját szemléltetjük.

5 a) Tabletták készítésére 5 t% 4. tesztvegyület, 60 t% tejcukor, 20 t% kukoricakeményítő, 5 t% hidoxi-propil-metil-cellulóz, 9 t% karboxi-metil-cellulóz és 1 t% magnézium-sztearát keverékét sajtoljuk tablettákká.

10 b) Kemény kapszulákba 10 t% 4. tesztvegyület, 30 t% tejcukor, 59 t% mikrokristályos cellulóz és 1 t% magnézium-sztearát keverékét töltjük.

15 c) Rugalmas kapszulákban 6,7 t% 4. tesztvegyület, 92,6 t% C₄-C₁₀ alifás zsírsav trigliceridje és 0,7 t% „Polysorbate 80” (polixi-etilén 20 szorbitán-monooleát (gyógyszerkönyvi minőség) keverékét alkalmazzuk.

20 d) Végbélkúpokat 1,0 t% 4. tesztvegyület, 98,5 t% „kemény zsiradék” és 0,5 t% Polysorbate 80 keverékből készítünk (a „Kemény zsiradék” a Japán Gyógyszerkönyvben meghatározott C₆-C₁₈ alifás zsírsav trigliceridje).

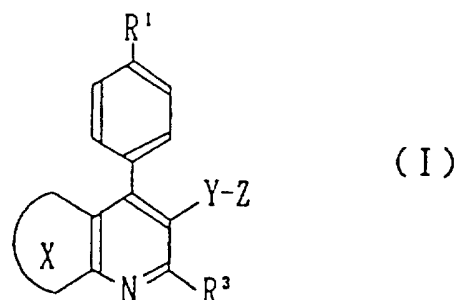
e) Injektálható oldat elkészítésére 0,01 t% 4. tesztvegyületet 99,99 t% injekció céljára alkalmas vízben oldunk.

25 f) Granulált készítmény készítésére 5 t% 4. tesztvegyület, 60 t% tejcukor, 20 t% kukoricakeményítő, 5 t% hidoxi-propil-metil-cellulóz és 10 t% karboxi-metil-cellulóz kalciumsó keverékét a szokásos módon granuláljuk.

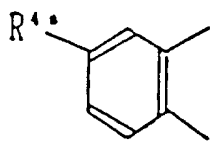
30 A fenti meghatározásoknak megfelelő keverékekből egy adagolási egységben (tablettában, kapszulában stb.) a fentebb megadott napi hatóanyag-mennyiségnek vagy e mennyiség tört részének megfelelő hatóanyagot tartalmazó mennyiségű keveréket alkalmazunk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

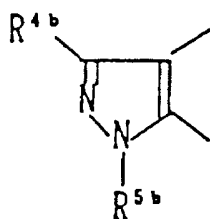
1. Eljárás (I) általános képletnek megfelelő vegyületet



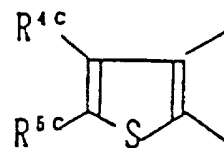
55 – ebben a képletben az X gyűrű a piridingyűrű szabad kettős kötésű oldalához anellált (a), (b) vagy (c) gyűrűs csoportot képvisel –



(a)



(b)



(c)

– és ezekben

R^{4a} jelentése hidrogénatom, 1–4 szénatomos alkilcsoport, fluor-, klór- vagy brómatom,

R^{4b} jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport vagy fenilcsoport és R^{5b} jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport,

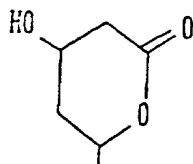
R^{4c} és R^{5c} jelentése hidrogénatom vagy 1–4 szénatomos alkilcsoport,

R¹ jelentése hidrogén- vagy fluoratom,

R³ jelentése 3–5 szénatomos alkil- vagy 3–5 szénatomos cikloalkilcsoport,

Y jelentése –CH=CH-csoport,

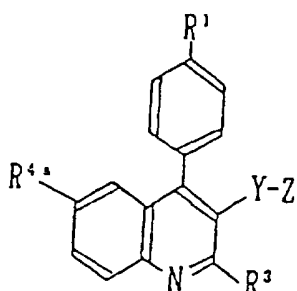
Z jelentése –CH(OH)–CH₂–CH(OH)–CH₂–COOR¹² csoport vagy (d) képletű csoport



R¹² jelentése hidrogénatom, +NH₄ csoport, nátrium-, kálium- vagy ½ kalciumatom –

hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az ismert módon előállított hatóanyagot gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyaggal és/vagy egyéb gyógyszerészeti segédanyaggal keverjük össze és az atheroszklerózist okozó érbelhártya-vastagodást gátló hatású készítménnyé alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (I) általános képletű hatóanyagként az (Ia) általános képletnek

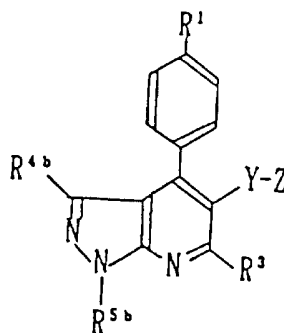


(I a)

15 – ahol R¹, R³, R^{4a}, Y és Z jelentése egyezik az 1. igénypontban megadottal – megfelelő vegyületet alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (I) általános képletű hatóanyagként az (Ib) általános képletnek

20



(I b)

25

30

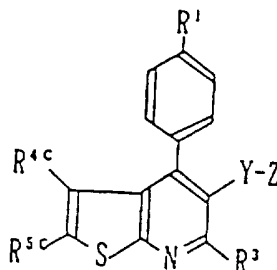
35

– ahol R¹, R³, R^{4b}, R^{5b}, Y és Z jelentése egyezik az 1. igénypontban megadottal – megfelelő vegyületet alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (I) általános képletű hatóanyagként az (Ic) általános képletnek

40

45



(I c)

50

55 – ahol R¹, R³, R^{4c}, R^{5c}, Y és Z jelentése egyezik az 1. igénypontban megadottal – megfelelő vegyületet alkalmazunk.

5. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hatóanyagként alkalmazott vegyület (Ia) általános képletében R³ jelentése ciklopropilcsoport, Y jelen-

60

tése -CH=CH- csoport, R¹, R^{4a} és Z jelentése egyezik az 1. igénypontban megadottal.

6. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hatóanyagként alkalmazott vegyület (Ib) általános képletében R³ jelentése ciklopropilcsoport, R^{4b} és R^{5b} jelentése metilcsoport, Y jelentése -CH=CH-csoport, R¹ és Z jelentése egyezik az 1. igénypontban megadottal.

7. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hatóanyagként alkalmazott vegyület (Ic) általános képletében R³ jelentése ciklopropilcsoport, R^{4c} jelentése etilcsoport, R^{5c} jelentése metilcsoport, Y jelentése -CH=CH-csoport, R¹ és Z jelentése egyezik az 1. igénypontban megadottal.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hatóanyagként alkalmazott vegyület (Ia) általános képletében Z jelentése -CH(OH)-CH₂-CH(OH)-CH₂-COO.1/2 Ca-csoport.

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a készítményben legalább napi 0,03 mg/kg testtömegnek megfelelő hatóanyagot alkalmazunk.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a készítmény adagolási egységében 0,01–20,0 mg hatóanyagot és 99,99–80 tömeg% segédanyagot vagy vizet alkalmazunk.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a készítményt tabletták alakjában készítjük és ezekben 0,05–40 t% hatóanya-

got, 42,5–95,95 t% vivőanyagot vagy hígítószeret, 2,5–10,0 t% kötőanyagot, 1,0–5,0 t% szétesés-elősegítőt és 0,5–2,5 t% simítószert alkalmazunk.

5 12. 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a készítményt kemény kapszulák alakjában készítjük és ezekben 0,05–40,0 t% hatóanyagot, 57,5–99,45 t% vivőanyagot vagy hígítószeret és 0,5–12,5 t% simítószert alkalmazunk.

10 13. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a készítményt rugalmas kapszulák alakjában készítjük és ezekben 0,05–40,0 t% hatóanyagot, 59,0–99,85 t% vivőanyagot vagy hígítószeret és 0,1–1,0 t% oldódást elősegítő szert alkalmazunk.

15 14. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a készítményt végbélkúpok alakjában készítjük, és ezekben 0,01–40,0 t% hatóanyagot, 59,0–99,89 t% vivőanyagot vagy hígítószeret és 0,1–1,0 t% oldódást elősegítő szert alkalmazunk.

20 15. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a készítményt injekciós oldat alakjában készítjük 0,0001–5,0 t% hatóanyag és 95,0–99,9995 t% injekció céljára alkalmas víz alkalmazásával.

25 16. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a készítményt granulátum alakjában készítjük 0,05–40,0 t% hatóanyag, 47,5–96,95 t% vivőanyag vagy hígítószer, 2,5–40,0 t% kötőanyag és 0,5–2,5 t% simítószert alkalmazásával.