P0102001

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

~~27~~

~~Új~~ DIPEPTIDILPEPTIDÁZ IV EFFEKTOROK

Kivonat

Az

A találmány dipeptidvegyületekre és a dipeptidekkel analóg olyan vegyületekre vonatkozik, amelyek egy aminosavból és egy tiazolidin- vagy pirrolidincsoportból épülnek fel. Ilyen vegyület például az N-treo-izoleucil-tiazolidin és az L-treo-izoleucil-pirrolidin. A találmány a fenti vegyületek sóira is kiterjed.

A találmány szerinti vegyületek alkalmasak károsodott glükóztolerancia, glükózuria, hiperlipidémia, metabolikus acidózisok, cukorbetegség, cukorbetegséggel kapcsolatos idegbántalmak és vesebetegség, valamint cukorbetegség szövődményeinek a kezelésére emlősállatokon.

jellemző ábra nincs

P010 2001

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

DIPEPTIDILPEPTIDÁZ IV EFFEKTOROK

A találmány tárgyát képezik olyan dipeptidvegyületek és dipeptidvegyületekkel analóg vegyületek, amelyek egy aminosavból és egy tiazolidin- vagy pirrolidincsoportból épülnek fel, továbbá ezek sói. Ezeket a vegyületeket a leírásban dipeptidvegyületeknek nevezzük. A találmány továbbá kiterjed mindezen termékek alkalmazására emlősökön a károsodott glükóztolerancia, glükozuria (cukorvizelés), hiperlipidémia (túlzottan magas vérlipidszint), metabolikus acidózisok, diabetes mellitus (cukorbetegség), diabetikus idegbántalmak és vesebántalom, valamint a diabetes mellitus szövődményei kezelésében.

Ennek alapján a találmány a vércukorkoncentráció csökkentésének egyszerű módszerére is vonatkozik emlősállatokon, dipeptidvegyületek, mint aktivitáscsökkentő effektorok segítségével (szubsztrátumok, pszeudoszubsztrátumok, gátlók, kötőfehérjék, antitestek és ezekhez hasonló anyagok) olyan enzimek esetében, amelyek aktivitása a dipeptidilpeptidáz IV enzim enzimaktivitásával azonos vagy összehasonlítható.

A dipeptidilpeptidáz IV (röviden: DP IV) -analóg aktivitás (például a citoszólos DP II szubsztrátum-specificitása majdnem azonos a DP IV-vel), a vérkeringésben fordul elő, ahol nagyon specifikusan hasít le dipeptideket biológiailag hatásos peptidek N-végződéséről, ha a szekvenciában az N-terminális aminosav szomszédos maradéka prolin vagy alanin.

A glükóz-függő inzulinotróp polipeptidek: a gyomorban lévő gátló polipeptid 1-2 (GIP_{1-42}) és a glukagonszerű peptid-amid-1

7-36 (DLP-1_{7-36}), azaz azok a hormonok, amelyek a glükóz-indukálta inzulinelválasztást a hasnyálmirigy útján stimulálják (ezért inkretineknek nevezik ezeket az anyagokat); a DP IV szubsztrátumai, mivel a DP IV képes a tirozinil-alanin és histidil-alanin dipeptidek lehasítására ezeknek a peptideknek az N-terminális szekvenciáiról mind in vitro, mind in vivo körülmények között.

Ezen DP IV és DP IV-analóg enzimaktivitásnak ilyen szubsztrátumok hasításában mutatott aktivitása csökkentése in vivo körülmények között felhasználható a nemkívánt enzimaktivitás hatásos elnyomásának a kifejtésére laboratóriumi körülmények között, továbbá emlősállatok szervezetében fennálló kóros állapotok eseteiben. Igy például a II típusú diabetes mellitus (beleértve a felnőtt korban fellépő diabetest) alapja abban áll, hogy az inzulin elválasztása csökken, vagy pedig a receptorműködésben kóros állapotok állnak fenn, amelyek többek között proteolizisből eredő anomális inkretinkoncentrációból erednek.

A technika jelenlegi állása szerint a magas vércukorszintet és az ezzel társuló kórokokat és szövődményeket (a diabetes mellitust beleértve) inzulin adagolásával kezelik (például a szarvasmarha hasnyálmirigyéből izolált termékkel, vagy genetikai manipulációt alkalmazó műszaki eljárások termékével); a megbetegedett szervezetbe az adagolást különféle utakon végzik. Az eddig ismert valamennyi eljárást - a modernebb eljárásokat is - jellemzi, hogy nagy mennyiségű nyersanyagot igényel magas költségekkel, és gyakran a betegek életminőségének határozott romlásával. A szokásos eljárás szerint (intravénás inzulininjekció naponta az 1930-as évektől szokásos) a betegség akut tüneteit kezelik, ez

azonban hosszas használat után más tünetek mellett súlyos érelváltozásokat (arterioszklerózist) és idegkárosodásokat idéz elő.

Újabban javasolták szubkután depó (raktározó) implantátumok beültetését (ezekből az inzulin meghatározott mennyiségekben szabadul fel), a napi injekciók szükségtelenné válnak, valamint ép Langerhans-sejtek beültetését (átültetését) a károsodott funkciójú hasnyálmirigybe vagy más szervekbe és szövetekbe. Az ilyen átültetett egységek magas szinvonalú felkészültséget igényelnek; továbbá sebészi beavatkozást tesznek szükségessé a befogadó szervezeten, ami veszélyeztetéssel jár és még sejt-átültetések eseteiben is az immunrendszer elnyomását vagy megkerülését igényli.

Alanil-pirrolidid és izoleucil-tiazolidid alkalmazása a DP IV vagy DP IV-analóg enzimaktivitás gátlására jelenleg is ismert a PCT/DE 97/00820 számú szabadalmi bejelentésből; izoleucil-pirrolidid és izoleucil-tiazolidid-hidroklorid alkalmazása ismert a DD 296 075 számú szabadalmi dokumentumból. Az izoleucil-tiazolidid - amelynek alkalmazása későbbi - természetes anyag az L-treo-izoleucil-tiazolidid alakjában: a két szabadalmi leírás elsőbbségi adatai, továbbá a benyújtás időpontjában csak a természetes forma az izoleucil-tiazolidid volt elérhető.

Megállapították, hogy ezek a vegyületek - különösen az L-treo-izoleucil-tiazolidid - a DP IV és a DP IV-analóg enzimaktivitásokkal szemben jó effektorok, ennek a vegyületnek az alkalmazása azonban egyes betegek és egyes betegségformák esetében bizonyos problémákat vet fel.

A diabetes mellitus tüneteitől és súlyossági fokától függően, például kívánatos lenne, hogy olyan elérhető effektorok álljanak rendelkezésre, amelyek hatása az ismert vegyületek hatásától

eltérő: így például ismeretes, hogy a cukorbetegeket egyénileg kell "stabilizálni" abból a célból, hogy betegségük optimálisan kezelhető legyen. Egyes esetekben például a DP IV effektorok által előidézett aktivitáscsökkenésnek kielégítőnek kell lennie. Továbbá az is lehetséges, hogy a gátló hatás túlságosan magas szintje és azonos gyógyszer hosszas (állandó) adagolása - különösen arra való tekintettel, hogy a kezelést élethossziglan kell végezni) - nem kívánt mellékhatásokat eredményezhet. Továbbá kívánatos lehet bizonyos transzportsajátságok javítása az effektorok in vivo abszorpciós sebessége növelésének a céljából.

Mindezek alapján a találmány célja új (különösen aktivitáscsökkentő) effektorok kidolgozása például leromlott glükóztolerancia, glükozuria, hiperlipidémia, metabolikus acidózisok, diabetes mellitus, diabeteses idegbántalmak és vesebántalmak, valamint diabetes mellitus szövődményeinek a kezelésére emlősállaton; a találmány további célja egyszerű eljárás kialakítása a fenti betegségek kezelésére.

A találmány értelmében ezt a célt olyan dipeptidvegyületek, dipeptid-analógok és sóik kidolgozásával érjük el, amelyeket egy aminosavból és egy tiazolidin- vagy pirrolidincsoportból alakítunk ki.

Ezeknek az effektoroknak az emlős szervezetbe adagolásakor, előnyösen orális adagolásakor, a GIP_{1-42} és $GLP\text{-}1_{7-36}$ endogén (vagy ezenkívül exogénen adagolt) inzulinotróp peptidek (vagy más esetben $GLP\text{-}1_{7-37}$ vagy annak analógjai) egy bizonyos mértékben lebomlanak a DP IV vagy DP IV-szerű enzimek hatására, és ennek következtében ezeknek a peptidhormonoknak vagy analógjaiknak a koncentrációja csökken vagy késik. Így a találmány azon a felismerésen alapul, hogy a DP IV vagy DP IV-

szerű, vérben keringő enzimaktivitás a vércukorszintre irányuló hatást fejt ki. Azt találtuk, hogy

1. a DP IV vagy DP IV-analóg aktivitás csökkenése a glükózzal stimulált vagy kívülről bevezetett inkretinek (vagy analógjaik) relatív stabilitásának növekedéséhez vezet; DP IV vagy DP IV-analóg proteinek effektorainak az adagolásával az inkretinek vérben végbemenő leépülése szabályozható;
2. az inkretinek (vagy analógjaik) biológiai leépüléssel szemben mutatott stabilitásának növekedése változást idéz elő az endogén inzulin hatásában;
3. az inkretinek stabilitásának a DP IV vagy DP IV-analóg enzimaktivitás vérben végbemenő csökkenése által előidézett növekedése egy következményes változást okoz a glükózzal előidézett inzulinhatásban, és ennélfogva a vér glükózszintjének a modulálásában, azaz DP IV effektorok felhasználásával (útján) ellenőrizhető (szabályozható).

A találmány ezen céljának a megvalósítására kiválóan alkalmasak olyan dipeptidvegyületek, ahol az aminosav egy természetes aminosav, például leucin, valin, glutamin, prolin, izoleucin, aszparagin vagy aszparaginsav.

A találmány szerinti nagy affinitású, kis molekulatömegű enzimgátlók adagolása - ha lehetséges, orális adagolása - gazdaságosabb alternatíva például a kórtünetek kezelésének sebészi beavatkozást igénylő megoldásával szemben. A stabilitás, transzport és klirenszsajátságok kémiai tervezése útján hatásmódjuk módosítható, és az egyedi jellegzetességekhez idomítható.

Amint fentebb említettük, például a cukorbetegség hosszú időn át végzett kezelése esetén szükségessé válhat olyan effektorok kialakítása, amelyek definiált aktivitással rendelkeznek, s amelyek segítségével a betegek egyedi igényei és tüneti kezelése megoldható. A találmány szerinti dipeptidvegyületek ennélfogva 10 μM koncentrációnál (a dipeptidvegyületek koncentrációjánál, különösen az 1. táblázatban feltüntetett körülmények között) a dipeptidilpeptidáz DP IV vagy DP IV-analóg enzimaktivitásokat legalább 10 %-kal, különösebben legalább 40%-kal csökkentik. Gyakran elérhető az aktivitásnak legalább 60%-os, vagy legalább 70%-os csökkenése. Előnyös effektorok lehetnek azok is, amelyek az aktivitást legfeljebb 20%-kal vagy 30%-kal csökkentik. Továbbá a jelenlegi vegyületek (találmány szerinti vegyületek), különösen a Pep T1 peptid-transzportáló anyag által a transzporttulajdonságok jelentős mértékben javulnak.

Különösen előnyös dipeptidvegyületek az L-allo-izoleucin-tiazolidid és sói. Ezek a vegyületek meglepő módon megközelítőleg ötszörösre javítják a Pep T1 peptid-transzporter általi transzportot az L-treo-izoleucin-tiazolididdel összehasonlítva, és a glükóz-modulációjával szemben közel azonos mértékű hatásuk van.

További előnyös vegyületeket mutatunk be az 1. táblázatban.

A találmány szerinti dipeptidvegyületek sói lehetnek például szerves sók, így acetátok, szukcinátok, tartarátok vagy fumarátok; vagy szervetlen savakkal képzett sók, például foszfátok vagy szulfátok. Különös előnyt nyújtanak a fumarátok, mivel kitűnő hatásuk meglepően nagyfokú stabilitással jár együtt hidrolizissel szemben, és jóval kevésbé oldhatók, mint a hidrokloridok. Ezek a sajátságok galenikus szempontból is előnyösek.

Előnyös továbbá az L-treo-izoleucil-pirrolidid és sói is, különösen a fumarátok, valamint az L-allo-izoleucil-pirrolidid és sói, különösen fumarátsói.

A dipeptidvegyületek sóiban a dipeptid (-analóg) komponensnek a sókomponenshez viszonyított mólaránya 1:1 vagy 2:1 lehet. Ilyen só például az (Ile-Tia)$_2$ fumársav összetételű só.

Különösen előnyösek az L-treo-izoleucil-tiazolidid és L-allo-izoleucil-tiazolidid fumarátsói.

Ennek megfelelően a találmány a dipeptidilpeptidáz OV (DP IV) és DP IV-analóg enzimaktivitást csökkentő effektorokra és azok alkalmazására vonatkozik a vércukorszint csökkentésében emlősállat szervezetének a szérumában azon glükóz-koncentrációnál alacsonyabb szintre, mint amely a hiperglikémiát jellemzi. A találmány főként a DP IV és DP IV-analóg enzimaktivitás effektorainak az alkalmazására vonatkozik a találmány értelmében az emlősök szervezetében fennálló kóros metabolikus anomáliák megelőzésében vagy megszüntetésében, így például a károsodott (romlott) glükóztolerancia, glükózuria, hiperlipidémia, metabolikus acidózisok, cukorbetegség, cukorbetegséggel járó idegbántalmak és vesebetegség, valamint a cukorbetegség szövődményeinek megelőzésére vagy megszüntetésére emlősökön. Egy másik előnyös megvalósítása szerint a találmány tárgya eljárás vércukorszint csökkentésére egy emlősállat szervezetének a szérumában a glükózkoncentráció olyan szintjénél alacsonyabb értékre, amely a hiperglikémiára jellemző; ez az eljárás abban áll, hogy legalább egy DP IV vagy DP IV-analóg enzimaktivitást csökkenő találmány szerinti effektor

terápiásan hatásos mennyiségét az emlősállat szervezetébe adagoljuk.

Egy további előnyös megvalósítás szerint a találmány olyan gyógyászati készítményekre, tehát gyógyszerekre is vonatkozik, amelyek legalább egy találmány szerinti vegyületet vagy annak valamely sóját, adott esetben egy vagy több, gyógyászati szempontból elfogadható vívőanyaggal és/vagy oldószerrel kombinálva tartalmazzák.

A gyógyászati készítmények például parenterális vagy enterális összetételek lehetnek, és megfelelő vívőanyagokat tartalmazhatnak; vagy orálisan alkalmazható összetételek lehetnek, amelyek megfelelő, orális adagolás szempontjából célszerű vívőanyagokat tartalmazhatnak. Ezek előnyösen orális kiszerelések alakjában vannak.

A fentieken kívül a gyógyászati készítmények egy vagy több, hipoglikémiás (cukorszintcsökkentő) hatású komponenst tartalmazhatnak, amelyek önmagukban véve ismert hatóanyagok (hatásos komponensek) lehetnek.

A találmány szerinti DP IV vagy DP IV-analóg enzimaktivitást befolyásoló effektorok felhasználhatók a vércukorszint csökkentésére egy emlősállat szervezetének szérumában azon glükózkoncentrációnál kisebb szintre, mint amely a hiperglikémiára jellemző, vagy egy megfelelő gyógyszer gyártására.

A találmány szerint adagolt DP IV vagy DP IV-analóg, enzimaktivitást csökkentő effektorok gyógyászati szempontból elfogadható összetételek, vagy formulázási komplexek alakjában gátlókként, szubsztrátumokként, pszeudoszubsztrátumokként, a DP IV kifejezésének gátlóiként, kötőfehérjékként vagy olyan enzimfehérjék vagy ezen különböző anyagok kombinációiként

alkalmazhatók, amelyek az emlősök szervezetében a DP IV vagy DP IV-analóg proteinkoncentrációt csökkentik. A találmány szerinti effektorok például a DP IV-gátlók, így dipeptidszármazékok vagy dipeptidmimetikumok; így az L-allo-izoleucil-tiazolidid, valamint az 1. táblázatban feltüntetett effektorok és fumarátsóik. A találmány szerinti effektorok lehetővé teszik a betegek kezelésének és betegségeiknek individuális kezelését és szabályzását, s így különösen kedvező lehetőség nyílik az intolerancia, allergiák és az egyedi esetekben előforduló mellékhatások elkerülésére.

A vegyületek különböző viselkedési hatásokat is mutatnak az időtartam előrehaladása szerint. Ennek eredményeként a kezelést kivitelező orvosnak kedvező lehetősége van egy beteg egyedi állapota szerinti különböző válaszokra: egyrészt megvan a lehetősége a hatás bekövetkezése sebességének pontos megállapítására, másrészt a hatás időtartamának, és különösen a hatás erősségének a megítélésére.

A találmány szerinti módszer (eljárás) új típusú eljárást jelent a megnövekedett vércukorkoncentráció (vérglükóz-koncentráció) csökkentésére emlősök szérumában. A módszer egyszerű, ipari felhasználásra alkalmas, terápiás felhasználás szempontjából célszerű, különösen olyan betegségek terápiájában, amelyek alapja az átlagértéken felüli vér-glükózkoncentráció emlősökön, és még különösebben az embergyógyászatban.

Az effektorokat például olyan gyógyászati készítmények alakjában adagoljuk, amelyek a hatásos komponenst szokásos, önmagukban véve ismert vívőanyaggal kombinálva tartalmazzák. A készítmények adagolhatók például parenterálisan (például intravénásan, fiziológiás konyhasóoldatban), vagy enterálisan

(például orálisan) a szokásos vívőanyaggal, például glükózzal formulázva.

Endogén stabilitásuktól és biológiai értékesülésüktől függően az effektorokat naponta egy vagy több alkalommal kell adagolni, a vér-glükózszintek megkívánt normalizálásának az elérésére. Egy ilyen adagolási tartomány embereken például naponta 0,01 mg és 30,0 mg közötti tartományban, előnyösen 0,01 és 10 mg közötti effektoranyag-tartományban van 1 kg testtömegre vonatkoztatva.

Megfigyeltük, hogy a DP IV vagy DP IV-analóg enzimaktivitás effektorainak adagolása közvetlen eredménye - az aktivitás ezzel járó átmeneti csökkenése következtében - az endogén (vagy kiegészítőleg exogén módon adagolt) inzulinotróp peptidek, - a gyomorgátló polipeptid 1-42 (GIP_{1-42}) és a glukagon-szerű peptid-amid-1 7-36 ($GLP\text{-}1_{7-36}$) (vagy alternatív módon $GLP\text{-}1_{7-37}$ vagy ezek analógjai) a DP IV és DP IV-szerű enzimek hatására csökkent szintre épülnek le, és ennek következtében ezeknek a peptidhormonoknak vagy analógjaiknak a koncentrációja csökken, vagy késleltetést szenved. Az (endogénen jelenlévő vagy exogén módon bevitt) inkretinek vagy analógjaiknak stabilitási növekedése - amelyet a DP IV-effektorok hatása idéz elő, azzal az eredménnyel, hogy az előbbi megnövekedett mennyiségekben áll rendelkezésre a hasnyálmirigyben lévő Langerhans-sejtek inkretin-receptorainak inzulinotróp stimulálására, - többek között a szervezet saját inzulinjának hatékonyságát is megváltoztatja, és ennek eredménye a kezelt szervezet szénhidrát-metabolizmusának a stimulálása (serkentése).

Ennek következtében a kezelés alatt álló szervezet szérumában a vércukorszint azon glükózkoncentráció alá csökken, amely a hiperglikémiára jellemző, s így lehetővé válik

metabolikus anomálik, például a károsodott glükóztolerancia, glükózuria, hiperlipidémia és esetleg súlyos metabolikus acidózisok és a cukorbetegség megelőzése vagy megszüntetése (enyhítése), amely betegségek a vérben hosszú idő alatt kialakult, megnövekedett glükózkoncentrációkból eredő klinikai tünetcsoportok.

A technika jelenlegi állása szerint ismert, orálisan hatásos antidiabetikumok között egy ilyen, hatásos, kis molekulatömegű anyagcsoport mindeddig ismeretlen volt (a metformin nevű biguanid kivételével, amelynek molekulatömege 130). Az aminoacil-tiazolididek molekulatömege: 146 (glicil-tiazolidid), 203 (izoleucil-tiazolidid) és 275 (triptofanil-tiazolidid). Összehasonlításképpen: a szulfonil-karbamidok molekulatömegei: 494 (glibenklamid), szacharidok (acarbose 630) és a tiazolidindionok (pioglitazon 586) körülbelül 500-700 Da közötti tartományban váltakoznak. A szervezetben az aminoacil-tiazolidideket az aminopeptidázok hidrolizálják, és savas hidrolizis útján endogén anyagok, így aminosavak és ciszteamin képződnek úgy, hogy a találmány szerinti vegyületek alkalmazása orálisan értékesülő (hatásos) antidiabetikumokként a gyógyszertudomány (gyógyszerkincs) gazdagodását jelentik.

Patkányokon és egereken kísérleti úton kiváltott hiperglikémia az átlagosnál kedvezőbb eredménnyel kezelhető a találmány szerint alkalmazott vegyületek orális adagolásával (2. és 3. táblázat). A hatásos adag 500-1000-szeresének adagolása során egy háromhetes, patkányokon és egereken végzett toxikológiai vizsgálatban nem figyeltünk meg kimutatható patológiai elváltozást. A találmány szerinti vegyületek DP IV-re kifejtett, előnyös hatását az 1. táblázatban példaként mutatjuk be.

1. táblázat

Különböző effektorok hatása a dipeptidilpeptidáz IV által katalizált hidrolizisre 0,4 mM Gly-Pro-pNA szubsztrátum esetében, 30 °C hőmérsékleten, 7,6 pH-n, 0,125 ionerősség mellett

Effektor	DP IV iránti effektor-affinitás K_i (nM)	A DP IV maradék aktivitásának %-a 10 μM effektor jelenlétében
Metformin	» 1,000,000	100
Glibenklamid	» 1,000,000	100
Acarbóz	» 1,000,000	100
H-Asn-pirrolidid	12,000	83.1
H-Asn-tiazolidid	3,500	47.2
H-Asp-pirrolidid	14,000	81.6
H-Asp-tiazolidid	2,900	45.6
H-Asp(NHOH)-pirrolidid	13,000	88.2
H-Asp(NHOH)-tiazolidid	8,800	54.5
H-Glu-pirrolidid	2,200	38.5
H-Glu-tiazolidid	610	25.0
H-Glu(NHOH)-pirrolidid	2,800	44.9
H-Glu(NHOH)-tiazolidid	1,700	36.5
H-His-pirrolidid	3,500	49.7
H-His-tiazolidid	1,800	35.2
H-Pro-pirrolidid	4,100	50.2
H-Pro-tiazolidid	1,200	27.2
H-Ile-azididid	3,100	43.8
H-Ile-pirrolidid	210	12.3
H-L-allo-Ile-tiazolidid	190	10.0
H-Val-pirrolidid	480	23.3
H-Val-tiazolidid	270	13.6

Ismert, hogy aminoacil-pirrolidinek és aminoacil-tiazolidinek a vékonybél nyálkahártyasejtjeiben jelenlévő prolin-aminopeptidáz és prolidáz enzimek hatására a szérumban és a májsejtekben leépülhetnek, és másrészt a tiazolidingyűrű hajlamos a gyűrűnyílásra savak jelenlétében (például a gyomorban, és ennek eredményeként a megfelelő ciszteaminszármazék képződik (lásd a 458 407 számú US szabadalmi dokumentumot). Ennek alapján meglepő volt az a megfigyelésünk, hogy orális adagolás után a hatóanyagok dózisfüggő hatékonyságot mutattak. Az alábbi 2. táblázatban igazoljuk az L-allo-Ile-tiazolidid hatásának dózisfüggését a szérum DP IV aktivitásra L-allo-izoleucin-tiazolidid egészséges Wistar patkányoknak végzett orális adagolása után.

2. táblázat

DP IV maradék aktivitása a szérumban 0,4 mM koncentrációjú H-Gly-Pro-pNA szubsztrátummal szemben 30 °C hőmérsékleten, 7,6 pH-n, 0,125 ionerősség mellett, orális adagolás után, függésben az L-allo-izoleucil-tiazolidid adagjának függvényeként; meghatározás 30 perccel a gátló anyag adagolása után

Dózis kisérleti állatonként	A DP IV maradék aktivitása %-ban
0 mg	100
2,5 mg	52
5,0 mg	40
10 mg	28
20 mg	29

Rendkívül meglepő és kívánatos az L-allo-izoleucil-tiazolidid hatóanyag glükózcsökkentő hatása a találmány szerint, amelyet a cukorbetegség állatmodelljén egyidőben, orális adagolás után végzett glükóz-stimulálással (orális úton) értünk el. Ennek eredményei a 3. táblázatban láthatók.

A különböző antidiabetikumok vércukorszintcsökkentő hatásának az erősítésére gyakran alkalmazzák különböző, orálisan hatásos antidiabetikumok kombinációit. Mivel a találmány szerinti effektorok hiperglikémia elleni hatása más, orálisan adagolható antidiabetikumoktól függetlenül megmutatkozik, a találmány szerinti hatásos komponensek analóg módon felhasználhatók kombinációs terápiákban, megfelelő galenikus formában a kívánt normoglikémiás (a vércukorszintet normalizáló) hatás elérése céljából.

A fentiekkel összhangban a találmány szerint alkalmazott vegyületek önmagában ismert módon alakíthatók ki a szokásos gyógyszerformákban, például tabletták, kapszulák, drazsék, pilulák, végbélkúpok, szemcsék, aeroszolok, szirupok, folyékony, szilárd és krémszerű emulziók és szuszpenziók alakjában, valamint oldatok alakjában inert, nemtoxikus, gyógyászati szempontból elfogadható vívőanyagokkal, adalékokkal vagy oldószerekkel együtt. Az ilyen összetételekben (formulákban) a terápiásan hatásos vegyületek minden esetben előnyösen megközelítőleg 0,1-80 tömeg%, előnyösen 1-50 tömeg% koncentrációban vannak jelen a keverék összes tömegére vonatkoztatva; azaz megfelelő mennyiségekben, amelyek lehetővé teszik az adag elérését a kijelölt tartományban.

3. táblázat

A keringő vérglükóz csökkenése 20 μM L-allo-Ile-tiazolidid különböző állatmodellekből származó patkányok számára végzett orális adagolása után, 60 perces időtartamon belül, egyidejű glükóztolerancia-teszt végrehajtásával (az adatokat a normoglikémiás értékek százalékában adtuk meg)

Állatmodell	Glükózkoncentráció %-ban kontroll	Glükózkoncentráció %-ban L-allo-Ile-tiazolididdel kezelt
Wistar patkány, normális	100	82
Wistar patkány (diabetes 2b-modell, elhízott)	100	73

A találmány szerint alkalmazott vegyületeknek a gyomor-bélrendszer nyálkahártyáin át végbemenő, kedvező felszívódása nagy számú galenikus készítmény alkalmazását teszi lehetővé.

A találmány szerinti anyagok gyógyszerként drazsék, kapszulák, rágható kapszulák, tabletták, cseppek és szirupok alakjában adagolhatók, valamint pesszáriumok és orrnyálkahártyára adott (nazális) permetek formájában is lehetnek.

Az összetételeket például úgy állítjuk elő, hogy a hatóanyagot oldószerekkel és/vagy vívőanyagokkal szaporítjuk, adott esetben emulgeáló és/vagy diszpergálószerekkel, valamint adott esetben - például ahol hígítószerként vizet alkalmazunk - kisegítő oldószerekként szerves oldószereket alkalmazhatunk.

Segédanyagok példáiként a következőket említhetjük: víz, nemtoxikus szerves oldószerek, például paraffinok (például az ásványolajfrakciók), növényi olajok (például a mustármagolaj, földimogyoróolaj, szezámolaj); alkoholok (például etanol, glicerin), glikolok (például propilénglikol, polietilénglikol); szilárd vívőanyagok, például a természetes talajásványok (így a diszpergált kovasav, szilikátok); cukrok (például a nem finomitott cukor, laktóz és dextróz); emulgeálószerek, így a nemionos és anionos emulgeálószerek (például polioxietilén, zsírsav-észterek, polioxietilén-zsíralkohol-éterek, alkil-szulfonátok és aril-szulfonátok); diszpergálószerek (például lignin, elhasznált szulfitoldatok, metilcellulóz, keményítő és polivinilpirrolidon); valamint csúsztatószerek (például magnézium-sztearát, talkum, sztearinsav és nátrium-lauril-szulfát) és adott esetben ízesítőszerek.

Az adagolást szokásos módon, előnyösen enterálisan vagy parenterálisan, különösen orálisan végezzük. Enterális adagolás esetén a fentebb említett vívőanyagokon kívül a tabletták más adalékokat - például nátrium-citrátot, kalcium-karbonátot és kalcium-foszfátot - is tartalmazhatnak, különböző kiegészítő komponensekkel, például keményítővel, különösen burgonyakeményítővel, zselatinnal és más hasonló anyagokkal együtt. A csúsztatószerek, így a magnézium-sztearát, nátrium-lauril-szulfát és talkum tablettázási célokra is felhasználhatók. Vizes szuszpenziók és/vagy orális alkalmazásra tervezett elixirek esetében lehetséges továbbá különböző ízjavítók vagy színezékek hozzáadása a hatóanyagokhoz a fentebb említett segédanyagokon kívül.

megközelítőleg 0,01-1,0 mg/kg mennyiségek adagolása naponta 1 kg testtömegre számítva, megfelelő eredmények elérésére; enterális adagolás esetében az adag megközelítőleg 0,01-2 mg/kg, előnyösen megközelítőleg 0,01-1 mg/kg tartományban van naponta 1 kg testtömegre számítva.

Egyes esetekben szükségessé válhat eltérni a fentebb megadott mennyiségektől egyrészt a kisérleti állat vagy beteg testtömegétől függően, vagy az adagolás útjának jellegében, vagy például az állat fajtája és annak egyedi válasza következtében a gyógyszerrel szemben; vagy ha meg kell változtatni az adagolások között eltelt intervallumokat. Egyes esetekben például elegendő a fentebb említett minimális adagoknál kisebb mennyiségnek a felhasználása, míg más esetekben szükségessé válhat a fentebb említett határérték túllépése. Ha viszonylag nagy mennyiségeket adagolunk, akkor ajánlatos lehet a napi adagot több részadagra elosztani a nap folyamán. Az embergyógyászatban való alkalmazás céljára azonos dózistartomány megfelelő, és a fentebb ehhez adott kommentárok megfelelően érvényesíthetők.

Példák gyógyászati készítmények előállítására

1. Kapszulánként 100 mg L-allo-izoleucil-tiazolididet tartalmazó kapszulák

Körülbelül 10 000 kapszula készítéséhez az alábbi összetételű oldatot állítjuk elő:

Komponensek	Kg
L-allo-izoleucil-tiazolidid-hidroklorid	1,0
Glicerin	0,5
Polietilénglikol	3,0
Víz	0,5
	5,0 kg

Az oldatot lágyzselatinkapszulákba helyezzük önmagában ismert módon. A kapszulák elrágás vagy lenyelés céljára alkalmasak.

2. 100 mg L-allo-izoleucil-tiazolididet tartalmazó tabletták/bevonatos tabletták vagy drazsék

100 000 tabletta gyártásához a következő mennyiségeket használjuk:

Komponensek	Kg
L-allo-izoleucil-tiazolidid-hidroklorid, finoman porított	10,0
Glükóz	4,35
Laktóz	4,35
Keményítő	4,50
Cellulóz, finoman porított	4,50

A fenti komponenseket összekeverjük, és utána az alábbi komponensekből készített oldattal egyesítjük:

Polivinilpirrolidon	2,0 kg
Poliszorbát	0,1 kg
Víz	körülbelül 5,0 kg

Ezt követően önmagában ismert módon a nedves tömeget aprítással szemcsézzük, majd 0,2 kg magnézium-sztearát hozzáadása után szárítjuk. A 30,0 kg tömegű, finomított tablettakeveréket egyenként 300 mg tömegű, domború tablettákká dolgozzuk fel. A tabletták ismert módon bevonhatók, vagy cukorburkolattal láthatók el.

Az előnyös vegyületekre vonatkozó műszaki adatok az alábbi táblázatban láthatók.

Az Ile-Tia*-fumarát (izomer) són és más sókon végzett tesztek

Hatóanyag	K_i	Op (°C)	CE (perc)	MS	$[\alpha]H_2O$
L-Treo-IT*F	$8*10^{-8}$	150DSC	160	203	-10.7 (405 nm)
D-Treo- IT*F	gátlás nincsen	147	158	203	nem határoztuk meg
L-Allo-IT*F	$2*10^{-7}$	145-6	154	203	-4.58 (380 nm)
D-Allo-IT*F	gátlás nincsen	144-6	150	203	4.5 (380 nm)

Rövidítések:

IT*F: izoleucil-tiazolidid-fumarát

Az NMR és HPLC adatok a fenti hatóanyagok azonosítását igazolják.

A hatóanyagok K_i értékei meghatározására alkalmazott mérési körülmények:

Enzim: DP $IV_{sertésvese}$, 0,75 mg/ml, 18 U/ml (GPpNA)
25 mM Tris pH 7,6 30% ammónium-szulfát,
0,5 mM EDTA és 0,5 mM DTE összetételű
oldatban
törzsoldat: a mérőpufferral 1:250 arányban
higitva

Puffer: 40 mM HEPES pH 7,6, I = 0,125 (KCl)

Szubsztrátum: GPpNA*HCl
törzsoldat: 2,1 mM

Mérőberendezés: Perkin-Elmer Bio Assay Reader,
RTS 7000 Plus,
T = 30 °C
λ = 405 nm

Mérési sarzs: 100 µl puffer
100 µl szubsztrátum (3 különböző koncentráció 0,8 mM - 0,2 mM
50 µl víz/gátló (7 különböző koncentráció 2,1 µM - 32,8 nM)
10 µl enzim

A puffert, vizet/gátló anyagot és az enzimet 30 °C hőmérsékletre előmelegítettük, majd a reakciót az ugyanígy előre felmelegített szubsztrátum hozzáadásával megindítottuk.

A meghatározásokat négy ismétlésben végeztük.

A mérési idő 10 percig tartott.

Olvadáspontmeghatározás

Az olvadáspontokat Koffler-féle hevítőlemezes mikroszkópon állapítottuk meg (Leica Aktiengesellschaft), ezek az értékek nem korrigáltak; vagy DSC eszközzel dolgoztunk (Heumann-Pharma).

Optikai forgatóképesség

A forgatóképesség értékeit különböző hullámhosszakon "Polarimeter 341", vagy magasabb szintű eszközzel vettük fel (Perkin-Elmer cég).

A tömegspektroszkópiai mérések körülményei

A tömegszínképeket elektronporlasztásos ionizációval (ESI) vettük fel "API 165" vagy "API 365" mérőműszeren (PE ScieX cég).

A műveletet megközelítőleg c = 10 µg/ml koncentráció alkalmazásával végeztük, az anyagot 50:50 arányú metanol-víz elegyben vettük fel (az elegy 0,1% hangysavat tartalmazott). Az infuziót porlasztó szivattyú alkalmazásával (20 µl/perc) végeztük. A méréseket pozitív üzemmódban $[M+H]^+$ szerint vettük fel, az ESI feszültsége U = 5600 V.

A sókra vonatkozó adatok az alábbiak:

L-Treo

IT*só	K_i	M ($gmól^{-1}$)	Op (°C)
Szukcinát	5.1 e-8	522.73	116
Tartarát	8.3 e-8	352.41	122
Fumarát	8.3 e-8	520.71	156
Hidroklorid	7.2 e-8	238.77	169
Foszfát	1.3 e-7	300.32	105

Az Ile-Tia-sók oldhatóságának a vizsgálata (tesztelése)

Ile-Tia*-fumarát:

Bemért mennyiség 10,55 mg;

megfelel 0,02 mmól-nak (520,72 g/mól);

hozzáadunk 100 µl desztillált vizet;

100 µl nem oldja, vizuálisan megfigyelhető, hogy az anyag felülete nem nedvesedik.

200 µl-től kezdve folyamatosan kezdődik az oldódás;

400 µl-nél teljes oldódás figyelhető meg;

2,63%

Ennek alapján megállapítható, hogy a só kevéssé nedvesedik, és nem bomlik.

Ile-Tia*-szukcinát:

A bemért mennyiség 16,6 mg;

megfelel 0,031 mmól-nak (522,73 g/mól);

16 µl desztillált vizet adunk hozzá;

16 µl-nél nem oldódik, vizuálisan megállapítható, hogy 66 µl-től kezdve az anyag nedvességet szippant be; 1,5 ml-nél az anyagnak nem teljes oldódása figyelhető meg.

Ile-Tia*-tartarát:

A bemért mennyiség 17,3 mg;

megfelel 0,049 mmól-nak (352,41 g/mól);

100 μl desztillált vizet adunk hozzá;

100 μl teljesen oldja;

17,3%

Ile-Tia*-foszfát

A bemért mennyiség: 15,5 mg;

megfelel 0,051 mmól-nak (30032 g/mól);

100 μl desztillált vizet adunk hozzá;

100 μl-nél némi oldódás figyelhető meg;

További 100 μl vizet adunk hozzá;

400 μl-nél teljes oldódás;

3,87%.

Ile-Tia*HCl

A bemért mennyiség 16,1 mg;

megfelel 0,067 mmól-nak (238,77 g/mól);

100 μl desztillált vizet adunk hozzá;

100 μl-nél teljes oldódás;

16,1%

Ile-Tia*-só általános szintézise

A Boc-védőcsoportot tartalmazó Boc-Ile-OH aminosavat etil-acetátba helyezzük, és az anyagkeveréket körülbelül -5 °C-ra hűtjük. N-metilmorfolint csepegtetünk hozzá, majd pivalinsav-kloridot (laboratóriumi méretben) vagy neohexanoil-kloridot (kisérleti üzemi méretben) csepegtetünk hozzá állandó hőmérsékleten. A reakciót aktiválás céljából néhány percig keverjük, majd N-metil-morfolint (laboratóriumi méretben) és tiazolidin-hidrokloridot (laboratóriumi méretben) csepegtetünk

hozzá sorrendben, vagy tiazolidint (kisérleti üzemi méretben) adunk hozzá. Laboratóriumi méretben a feldolgozást a szokásos módon, sóoldatokkal végezzük, kisérleti üzemi méretben a sarzsot NaOH és CH_3COOH oldatokkal tisztítjuk.

A Boc védőcsoport eltávolítását laboratóriumi méretben dioxános HCl-val, kisérleti üzemi méretben kénsavval végezzük.

Laboratóriumban a hidrokloridot etanol és éter keverékéből kristályosítjuk.

Kisérleti üzemi méretben $NaOH/NH_3$ hozzáadásával előállítjuk a szabad amint. A fumársavat forró etanolban oldjuk, és ehhez csepegtetjük a szabad amint. Az $(Ile\text{-}Tia)_2$-fumarát (M = 520,71 $gmól^{-1}$) kicsapódik.

Az izomerek és enantiomerek elemzését elektroforézissel végezzük.

Szabadalmi igénypontok

1. Aminosavból és tiazolidin- vagy pirrolidincsoportból kialakított dipeptid-mimetikumok, nevezetesen az L-allo-izoleucil-tiazolidin, L-allo-izoleucil-pirrolidin és sóik.

2. Az 1. igénypont szerinti dipeptid-mimetikumok, ahol a sók szerves sók, így acetátok, szukcinátok, tartarátok vagy fumarátok; vagy szervetlen savcsoportok, így foszfátok vagy szulfátok.

3. Az előző igénypontok bármelyike szerinti dipeptid-mimetikumok sói, ahol a dipeptid komponensnek a sókomponenshez (savkomponenshez) viszonyított mólaránya 1:1 vagy 2:1.

4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti dipeptid-mimetikumok sói, nevezetesen a fumársavas sóik.

5. A 4. igénypont szerinti dipeptid-mimetikum-sók, nevezetesen az L-allo-izoleucil-tiazolidin fumársavas sói.

6. Aminosavból és tiazolidin- vagy pirrolidincsoportból kialakított dipeptid-mimetikum-sók, nevezetesen az L-treo-izoleucil-tiazolidin és L-treo-izoleucil-pirrolidin sói.

7. A 6. igénypont szerinti sók, nevezetesen szerves sók.

8. A 6. igénypont szerinti sók, nevezetesen szukcinátok, tartarátok, fumarátok és hidrokloridok.

9. Gyógyászati készítmény, amely legalább egy, az előző igénypontok bármelyike szerinti vegyületet - adott esetben egy vagy több, gyógyászati szempontból elfogadható vívőanyaggal és/vagy oldószerrel kombinálva - tartalmaz.

10. A 9. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ahol a vívőanyag parenterális vagy enterális formulázásra alkalmas vívőanyag.

11. A 9. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely orális adagolásra alkalmas gyógyszerformában van.

12. A 9.-11. igénypontok bármelyike szerinti gyógyászati készítmény, amely kiegészítőleg hipoglikémiás (vércukorszintcsökkentő) hatóanyagot tartalmaz.

13. Az előző igénypontok bármelyike szerinti, legalább egy vegyület vagy gyógyászati készítmény alkalmazása a dipeptidil-peptidáz IV vagy dipeptidil-peptidáz IV-analóg enzimaktivitások aktivitásának csökkentésére alkalmazható gyógyszer gyártásában.

14. Az 1.-12. igénypontok bármelyike szerinti, legalább egy vegyület vagy készítmény alkalmazása olyan gyógyszer gyártásában, amely egy emlősállat szérumában a vércukorszintet azon glükózkoncentrációnál kisebb szintre csökkenti, mint amely a hiperglikémiára jellemző.

15. Az 1.-12. igénypontok bármelyike szerinti, legalább egy vegyület vagy készítmény alkalmazása a cukorbetegséggel (diabetes mellitus-sal) együttjáró metabolikus betegségek orális kezelésére alkalmazható gyógyszer gyártásában.

16. Az 1.-12. igénypontok bármelyike szerinti, legalább egy vegyület vagy készítmény alkalmazása károsodott glükóztolerancia, glükózuria, hiperlipidémia, metabolikus acidózisok, cukorbetegség, cukorbetegséggel kapcsolatos idegbántalmak és vesebetegség, valamint a cukorbetegség szövődményeinek kezelésére emlősállatokon alkalmazható gyógyszer gyártásában.

17. Aminosavból és tiazolidin- vagy pirrolidincsoportból kialakított, legalább egy dipeptid-mimetikum és sóinak az alkalmazása - ahol az aminosav leucin, glutamin, prolin, aszparagin vagy aszparaginsav - olyan gyógyszer gyártásában, amely emlősállatokon alkalmazható a vércukorszintnek a csökkentésére azon glükózkoncentráció alatti értékre, amely a hiperglikémiára jellemző.

18. A 17. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a sók szerves sók, így acetátok, szukcinátok, tartarátok vagy fumarátok; vagy szervetlen savcsoportokkal képzett sók, így foszfátok vagy szulfátok.

19. A 17. vagy 18. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a sókban a dipeptidkomponensnek a savkomponenshez viszonyított mólaránya 1:1 vagy 2:1.

20. A 17.-19. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a sók fumársavas sók.

21. A 17.-20. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás a cukorbetegséggel együttjáró metabolikus betegségek orális kezelésére alkalmazható gyógyszer gyártásában.

22. A 17.-21. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás károsodott glükóztolerancia, glükózuria, hiperlipidémia, metabolikus acidózisok, cukobetegség, cukorbetegséggel kapcsolatos idegbántalmak és vesebetegség, valamint cukorbetegség szövődményeinek kezelésére emlősállatokon alkalmazható gyógyszer gyártásában.

A meghatalmazott:

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA
KOVÁRI GYÖRGY
szabadalmi ügyvivő
1011 Budapest, Fő u. 19.

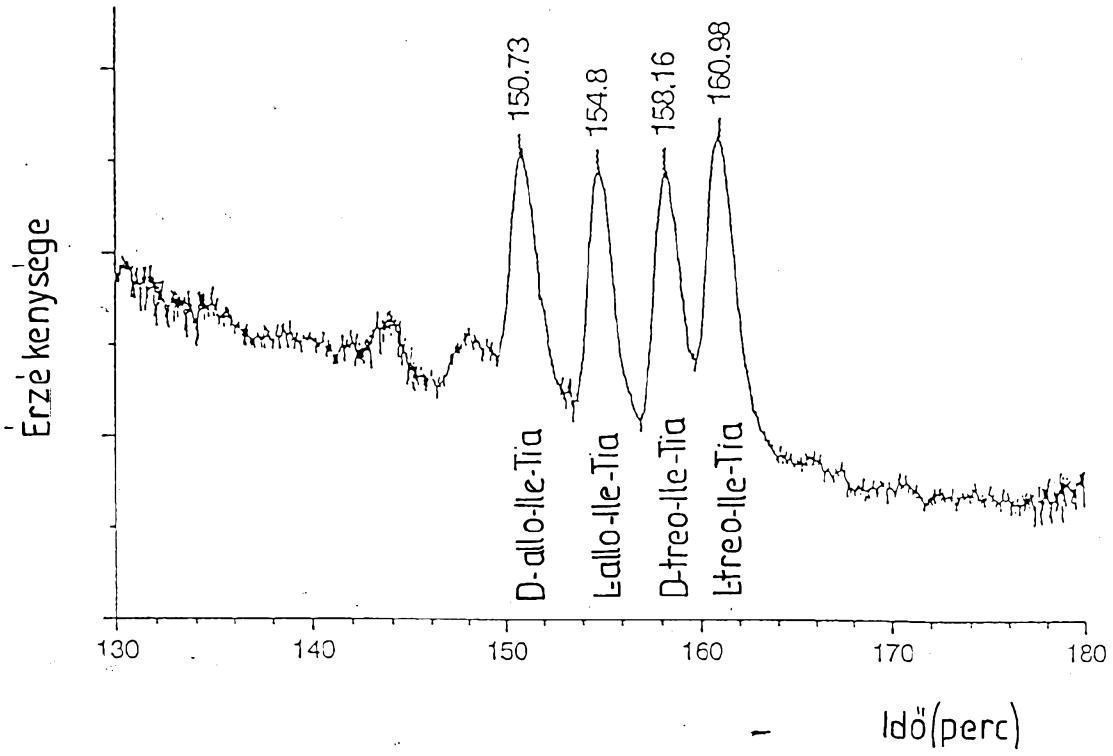
BOROS ISTVÁN

4 lap rajz

P01b2001 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

4/1

Az izoleucil—tiazolidid izomerjeinek kapilláris zóna –elektroforetikus (CE) elkülönítése



1.ábra

L-treo –Ile –Tia*fumarate, L-allo –Ile Tia* fum, D-treo–Ile –Tia*fum, D-allo–Ile –Tia*–fum 1:1:1:1 arányú elegyének CE elválasztása.

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA
KOVÁRI GYÖRGY
szabadalmi ügyvivő
1011 Budapest, Fő u. 19.

P010 2001 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

4/2

MÓDSZER ÉS MÉRÉSI KÖRÜLMÉNYEK

A CE vizsgálatokat egy "P/ACE™ rendszerű MOQ" alkalmazásával végeztük (amelyet a Beckmann cégtől szereztünk be.)

Hatóanyag:	CE (perc)
L-Treo-IT*F	160
D-Treo-IT*F	158
L-Allo-IT*F	154
D-Allo-IT*F	150

MŰVELETI KÖRÜLMÉNYEK:

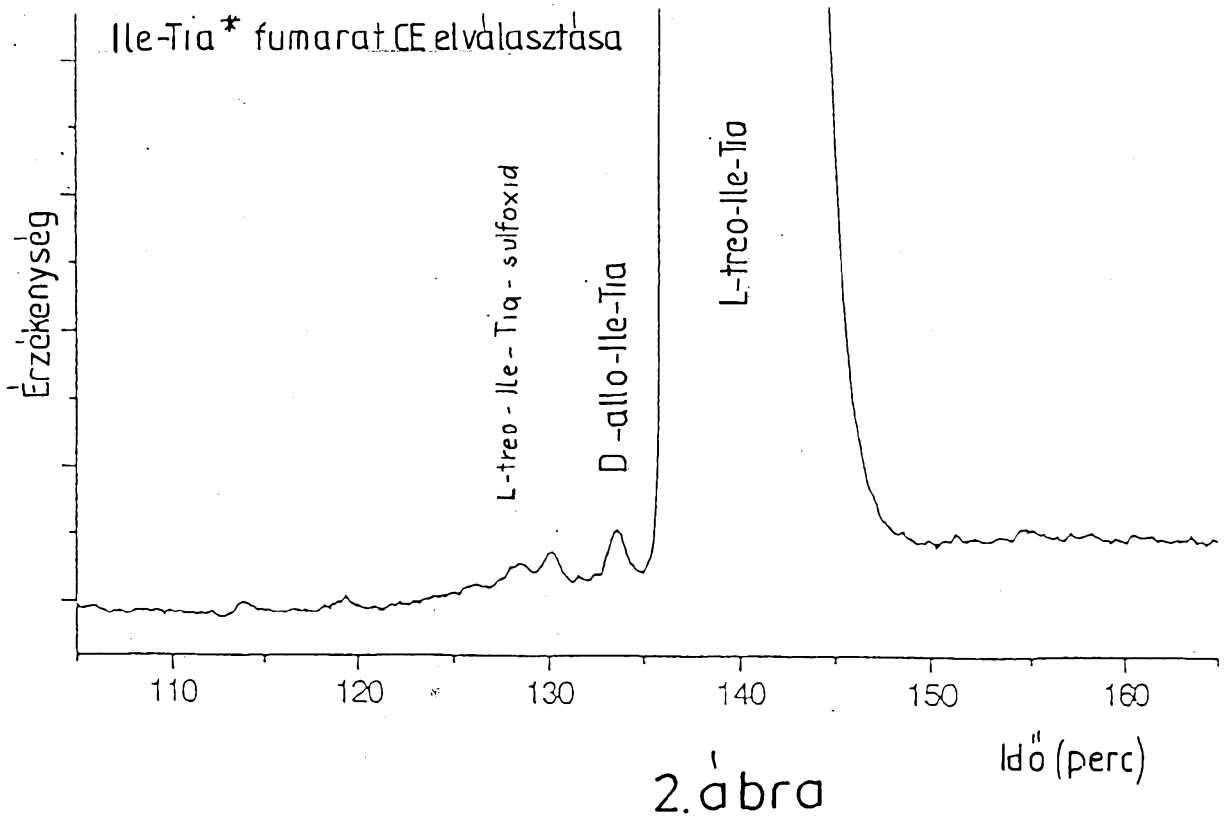
Puffer: 20 mM foszfát, pH 7,0, 100mM β-(hidroxi-propil) ciklodextrin

Kapilláris: 50/60,2cm 25 μm belső átmérő akrilamiddal bevonva

Feszültség: 10 kV

Kimutatás: fénydiódás tömbdetektor 214 nm-en

Hőmérséklet: 7C°



2. ábra

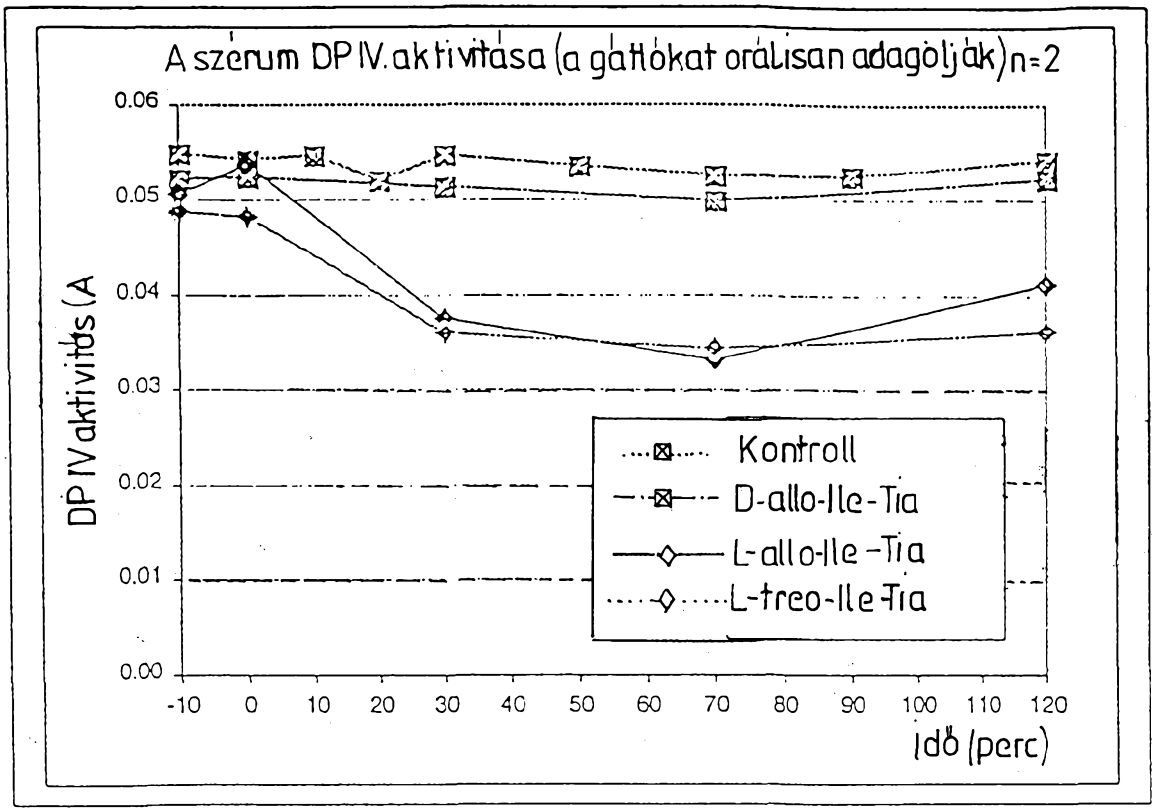
L-treo-Ile-Tia* fumarát és D-allo-Ile-Tia* fumarát 1:1000 arányú keverékének az elválasztása

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA
KOVÁRI GYÖRGY
szabadalmi ügyvivő
1011 Budapest, Fő u. 19.

P0102001

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

4/3



3. ábra

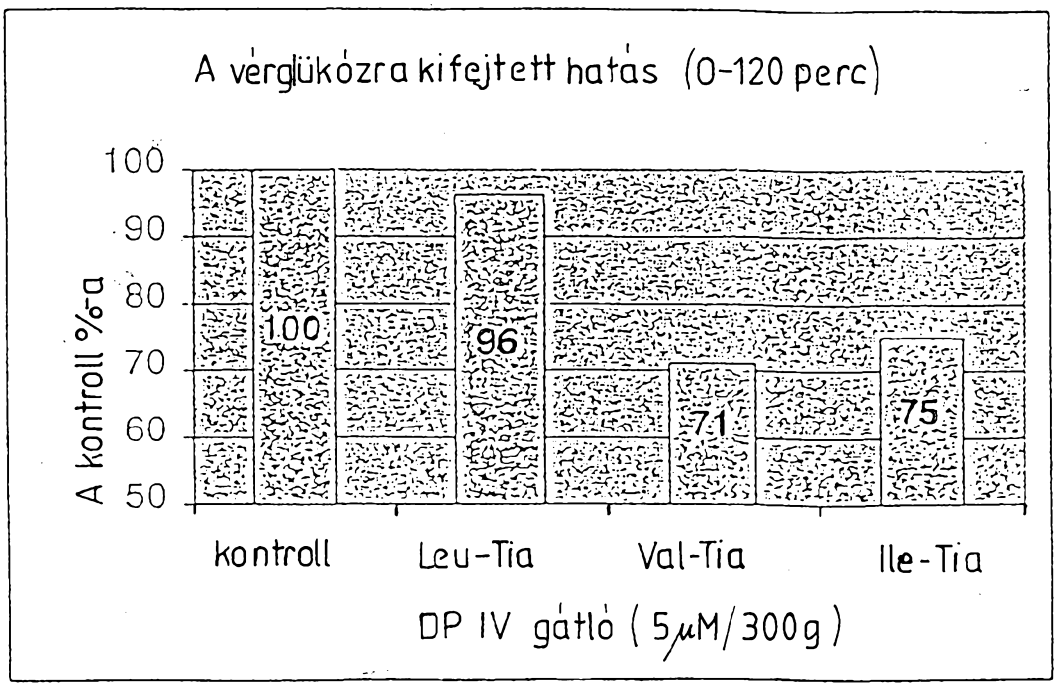
A szérum DPIV aktivitása különböző H-Ile-Tia sztereoizomerek orális adagolása után (5 μM / 300g patkány). Az enzimaktivitást csak az L-allo-Ile-Tia és L-treo-Ile-Tia befolyásolta.

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA
KOVÁRI GYÖRGY
szabadalmi ügyvivő
1011 Budapest, Fő u. 19.

P0102001

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

4/4



4. ábra

Különböző aminoacil -tiazolidídek hatása patkányok glükóztoleranciájára (orális glükóztolerancia teszt 2g/300g Wistar patkánnyal 0.időpontban; DPIV-gátlók adagolása 10 percel az orális glükóz stimulálás előtt)

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRO
KOVÁRI GYÖRGY
szabadalmi ügyvivő
1011 Budapest, Fő u. 19.