



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **170413**

(13) **B**

(51) Int Cl⁵ **C 07 C 323/59**

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	892787	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	16.11.88, PCT/SE88/00615
(22) Inng. dag	05.07.89	(85) Videreføringsdag	05.07.89
(24) Løpedag	16.11.88	(30) Prioritet	19.11.87, SE, 8704542
(41) Alm. tilgj.	05.07.89		
(44) Utlegningsdato	06.07.92		

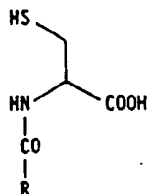
(71) Patentsøker	Aktiebolaget Draco, Box 34, S-221 00 Lund, SE
(72) Oppfinner	Anders Rudolf Hallberg, Lund, SE Per Anders Sigvald Tunek, Malmö, SE
(74) Fullmektig	Lars Brevig, Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte for fremstilling av nye, terapeutisk aktive cysteinderivater**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag**

Forbindelse med formelen:



hvor R er $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ eller $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ eller et fysiologisk akseptabelt salt eller optisk isomer derav som er nyttig for behandling av spesielt forskjellige lunge-sykdommer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremstilling av nye derivater av cystein med antiinflammatorisk effekt.

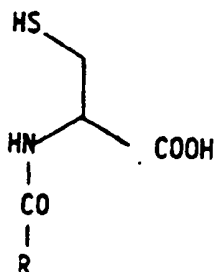
Formålet med oppfinnelsen er å tilveiebringe et anti-inflammatorisk cysteinderivat. Et slikt stoff vil være nyttig i behandlingen av forskjellige sykdommer.

N-acetyl-L-cystein har blitt benyttet som et terapeutisk middel mot f.eks. kronisk bronkitt i over 20 år. Et patent med tittelen "Decongestant Compositions comprising N-acetylated Sulphydryl Compounds" (GB 954.268) ble publisert i 1964.

Etter de tidligere undersøkelser og patenter har N-acetyl-L-cystein vært utbredt benyttet, primært mot obstruktiv lungesykdom slik som kronisk bronkitt som påstås å virke som et mukolitikum. I tillegg har denne forbindelsen vært benyttet som en motgift mot levertoksisitet forårsaket av paracetamol-overdose.

N-butyrylcystein er beskrevet i DE 1.208.450 som en bestanddel for et hårpreparat.

De ovennevnte nye cysteinderivatene har formelen:



hvor R er $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ eller $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$

og omfatter fysiologisk akseptabelt salt derav eller optisk isomer derav.

Disse nye forbindelsene har en mye bedre biotilgjengelighet etter oralt inntak enn tilfelle er for N-acetyl-L-cystein. Således vil de nye forbindelsene etter oralt inntak nå nivåer i det cystemiske kretsløp som er flere størrelsesordener høyere enn tilfellet er for maksimale nivåer av N-acetyl-L-cystein. Siden forbindelsene med formel (I) har like eller identiske potensialer som N-acetyl-L-cystein til å 1) bryte de sulfidbroer, 2) virke som antioksydasjonsmidler og 3) virke som radikalfjernere, bør oral behandling med de nye stoffene være mye mer effektivt enn N-acetyl-L-cystein mot lungesykdom, forutsatt at sykdommen er forårsaket eller opprettholdes av en eller annen type oksydativ stress.

Det skal også påpekes at en annen konsekvens av den biologiske stabiliteten til forbindelsene med formel (I) er at meget lite, om noe i det hele tatt, L-cystein vil bli frigjort. Dette betyr at disse forbindelsene vil gi opphav til bare meget lave nivåer av glutathion-forløpere. Derfor er det sannsynlig at effektene i det nedenfor beskrevne oksygentoksisitetssystem vil være avhengig av selve de syntetiske tiolene, og ikke av glutathion-biosyntese.

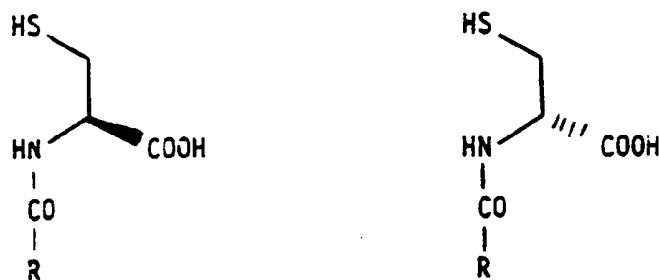
De nye forbindelsene med formel (I) og fysiologisk akseptable salter og isomerer derav som er nyttige i den terapeutiske behandlingen av inflammatoriske lungesykdommer, slik som kronisk bronkitt, og andre sykdommer, slik som

- 1) andre lungesykdommer som kompliseres av viskøst slim slik som cystisk fibrose, astma og emfysem,
- 2) bindevevssykdommer slik som reumatoid artritt,
- 3) lungeskadesykdommer slik som septisk sjokk, ARDS og bronkopulmonær dysplasi,
- 4) sykdommer forårsaket av stråling slik som gamma-stråle-indusert pneumonitt og fibrose,

- 5) sykdommer i lungeparenkymvevet slik som sarkoidose, fibrose, granulomatose, kollagenose, og
- 6) sykdommer forbundet med diabetes slik som ødeleggelse av beta-celler og retinopati.

Som nevnt omfatter forbindelsene (I) også fysiologisk akseptable salter derav og disse kan være saltene av natrium, ammonium, kalsium eller magnesium, sammen med de ikke-toksiske syreaddisjonssaltene derav.

Forbindelsen med formel (I) forekommer i to forskjellige optiske former, L- og D-isomerer:



som begge omfattes av foreliggende oppfinnelse.

Forbindelsene med formel (I) kan administreres oralt i form av farmasøytiske preparater omfattende den aktive bestanddel enten som en fri base eller som et farmasøytisk akseptabelt, ikke-toksisk syreaddisjonssalt i forbindelse med en farmasøytisk akseptabel bærer. Bæreren kan være et fast, halvfast eller flytende fortynningsmiddel eller kapsel. Vanligvis vil den aktive substansen utgjøre mellom 0,2 og 50 vekt-% for preparater egnet for oral administrasjon.

For å fremstille farmasøytiske preparater inneholdende en forbindelse med formel (I) i form av doseringsenheter for oral anvendelse, kan den valgte forbindelsen blandes med en fast pulverformig bærer, f.eks. laktose, sakkarose, sorbitol,

mannitol, stivelser slik som potetstivelse, maisstivelse eller amylopektin, cellulosederivater, et bindemiddel slik som gelatin eller polyvinylpyrrolidon, og et smøremiddel slik som magnesiumstearat, kalsiumstearat, polyetylenglykolvokser, o.l., og deretter sammenpresses til dannelsen av tabletter. Dersom det er nødvendig med belagte tabletter, kan kjernene, fremstilt som beskrevet ovenfor, belegges med en konsentrert sukkeroppløsning som kan inneholde f.eks. gummi arabikum, gelatin, talkum, titandioksyd, o.l. Alternativt kan tabletten belegges med en lakk oppløst i et lett flyktig, organisk oppløsningsmiddel eller blanding av organiske oppløsningsmidler. Fargestoffer kan tilsettes til disse beleggene for lett å kunne skjelne mellom tabletter inneholdende forskjellige aktive substanser eller forskjellige mengder av de aktive forbindelsene.

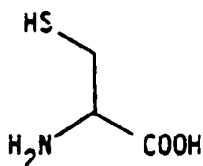
For fremstilling av myke gelatinkapsler (perleformede, lukkede kapsler) bestående av gelatin og f.eks. glycerol, eller lignende, lukkede kapsler, kan den aktive substans blandes med en vegetabilsk olje. Harde gelatinkapsler kan inneholde granuler av den aktive substans i kombinasjon med faste, pulverformige bærere slik som laktose, sakkarose, sorbitol, mannitol, stivelser (f.eks. potetstivelse, maisstivelse eller amylopektin), cellulosederivater eller gelatin.

Flytende preparater for oral anvendelse kan være i form av siruper eller suspensjoner, f.eks., oppløsninger inneholdende fra ca. 0,2 til ca. 20 vekt-% av den aktive substans som heri beskrives, idet resten er sukker og blanding av etanol, vann, glycerol og propylenglykol. Eventuelt kan slike flytende preparater inneholde fargestoffer, smaksstoffer, sakkarin og karboksymetylcellulose som fortykningsmiddel.

Egnede daglige doser av forbindelsene med formel I i terapeutisk behandling av mennesker er 100-1200 mg ved peroral administrasjon.

FREMSTILLINGSMETODE

Forbindelsene med formel (I) fremstilles ifølge oppfinnelsen ved omsetning av en forbindelse med formelen:

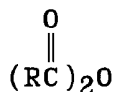


eller en optisk isomer derav, med et acyleringsmiddel med formelen:



hvor R har den ovenfor angitte betydning, og -COX er en reaktiv gruppe som kan reagere med en aminogruppe under dannelse av en amidgruppe, hvorefter, om ønsket, en således oppnådd forbindelse omdannes til en optisk isomer eller et fysiologisk akseptabelt salt derav.

Acyleringsmiddelet kan f.eks. være et anhydrid:



eller alternativt et syrehalogenid, et amid, en aktivert syre eller ester, tiolsyre, kiselsyreestere, acyloksyboran, metylselenolester, tiolester, acylacid, alfa-ketonitril eller et trihalogenketon.

ARBEIDSEKSEMPLEREksempel 1 - Fremstilling av N-isobutyryl-L-cystein

5 En suspensjon av 35,2 g (0,20 mol) L-cysteinhydroklorid-monohydrat i 100 ml av en blanding av 80% tetrahydrofuran (THF) og 20% vann ble omrørt under nitrogen ved romtemperatur og behandlet med 44,0 g (0,40 mol) natriumisobutytrat. Reaksjonsblandingen (hvit oppslemming) ble avkjølt til 0-5°C, 10 og 35 ml (0,21 mol) isobutyrylanhydrid ble tilsatt dråpevis under nitrogen. Den resulterende mobile suspensjon ble omrørt i 6 timer ved romtemperatur, ble hensatt natten over og ble til slutt oppvarmet under tilbaketrekning i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt på et isbad, og 18 ml 15 konsentrert hydrogenklorid ble tilsatt. Den organiske fasen ble inndampet til oppnåelse av en fargeløs olje. Oljen ble vasket med heksan og deretter behandlet med eter til oppnåelse av 12,9 g av tittelforbindelsen som et hvitt, fast stoff, smp. 103-104°C (omkrystallisert fra butylacetat), 20 $[\alpha]_D^{25} = +23,4^\circ$ (c 5,0, H₂O, pH = 7,0), ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,2 (6H, d, CH₃), 1,4 (1H, t, SH), 2,5 (1H, sept, CH), 3,1 (2H, m, CH₂), 4,9 (1H, dt, NCH), 6,7 (1H, d, NH), 10,6 (1H, s, OH). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ: 19, 19,5; 25,5; 36; 54, 172, 178. ms: 335 (M⁺ + 2TMS, etter silylering).

Eksempel 2 - Fremstilling av N-isobutyryl-D-cystein

30 Forbindelsen ble fremstilt i overensstemmelse med den metode som er beskrevet i eksempel 1 (med utgangspunkt i D-cystein-saltet) og viste identiske fysikalske data. $[\alpha]_D^{25} = -23,4^\circ$ (c 5,0, H₂O).

Eksempel 3 - Fremstilling av N-pivaloyl-L-cystein

Til en oppløsning av 17,6 g (0,10 mol) L-cysteinhydroklorid-monohydrat i 50 ml av en blanding av 80% tetrahydrofuran (THF) og 20% vann, ble det under nitrogen og under omrøring tilsatt 24,8 g (0,20 mol) natriumpivaloylat. Den tykke oppslemmingen ble avkjølt på et isbad, og 21,3 ml (0,105 mol) pivaloyl-anhydrid ble tilsatt dråpevis i løpet av 15 min. Etter tilsetning av 5 ml av en blanding av 80% THF og 20% vann, ble reaksjonsblandingen omrørt i 2 timer ved romtemperatur, og ble deretter tilbakeløpskokt i 0,5 timer. Etter avkjøling på et isbad ble 8,5 ml konsentrert hydrogenklorid tilsatt. Den organiske fasen ble inndampet, og råproduktet ble vasket flere ganger med heksan og deretter oppløst i 150 ml kloroform. Etter filtrering og inndampning av oppløsningsmiddelet ble råproduktet omkrystallisert fra etylacetat til oppnåelse av 8,2 g av tittelforbindelsen som et hvitt, fast stoff, smp. 140°C, $[\alpha]_D^{25} = +39,0^\circ\text{C}$ (c = 5,0, H₂O, pH = 7,0). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,2 (9H, s, CH₃), 1,4 (1H, t, SH), 3,1 (2H, m, CH₂), 4,9 (1H, dt, NCH), 6,7 (1H, d, NH), 10,6 (1H, s, OH). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 26, 27, 39, 53, 163, 180. ms: 349 (M⁺ + 2TMS, etter silylering).

Eksempel 4 - Fremstilling av N-pivaloyl-D-cystein

Forbindelsen ble fremstilt i overensstemmelse med fremgangsmåten beskrevet i eksempel 3 (med utgangspunkt i D-cystein-saltet) og viste identiske fysikalske data $[\alpha]_D^{25} = -39,0^\circ\text{C}$ (c = 5,0, H₂O, pH = 7,0).

Eksempel 5 - Fremstilling av N-isobutyryl-D,L-cystein

Forbindelsen ble fremstilt i overensstemmelse med den fremgangsmåten som er beskrevet i eksempel 1 (med utgangspunkt i

det (racemiske) D,L-cysteinsaltet) og viste identiske fysikalske data. $[\alpha]_D^{25} = 0^{\circ}$ (c = 5,0, H₂O).

5 Eksempel 6 - Fremstilling av N-pivaloyl-D,L-cystein

Forbindelsen ble fremstilt i overensstemmelse med den fremgangsmåte som er beskrevet i eksempel 3 (med utgangspunkt i det (racemiske) D,L-cysteinsaltet) og viste identiske
10 fysikalske data. $[\alpha]_D^{25} 0 0$ (C=5,0, H₂O, pH=7,0).

METABOLISKE FORSØK

15 Et formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe molekyler som etter oralt inntak vil gi høye nivåer av frie tioler i plasma og til slutt i lungen. Derfor ble det foretatt forsøk for å undersøke biologisk stabilitet og biotilgjengelighet av forbindelsene med formel (I), og for å
20 sammenligne disse med N-acetyl-L-cystein.

IN VITRO-DATA FOR DYR

25 N-acetyl-L-cystein ble hurtig hydrolysert til oppnåelse av L-cystein i homogenater av lever, tarmslim, og lunge fra rotte. N-isobutyryl-L-cystein og N-pivaloyl-L-cystein ble ikke hydrolysert i noen målbar grad in vitro.

30 Hydrolysen av N-acetyl-L-cystein fant sted hovedsakelig i det cytosoliske cellerom.

Sammenfatningsvis, det hydrofile N-acetylderivatet av L-cystein ble hydrolysert i den oppløselige cellefraksjonen, antageligvis av acyl-CoA-transferaser. De forgrenede
35 derivatene, N-isobutyryl- og N-pivaloyl-L-cystein ble ikke hydrolysert i noe cellerom.

IN VIVO-DATA FOR DYR

Tiolene ble injisert i tarmene til bedøvede rotter. Ved forskjellige tidspunkter etter injeksjonene ble det fjernet blodprøver, og plasmatiolene ble analysert. Konsentrasjonene av tiolene i plasma var: N-isobutyryl-L-cystein $13,0 \pm 2,5 \mu\text{M}$ (n=9), N-pivaloyl-L-cystein $11,8 \pm 22,9 \mu\text{M}$ (n=9), og N-acetyl-L-cystein $0,7 \mu\text{M}$ (kun ett forsøk foretatt). De gitte verdier representerer middel $\pm$ SEM, mens mindre annet er angitt.

Resultatene viser at plasmatiolnivåene oppnådd in vivo er relatert til den biologiske stabiliteten bestemt in vitro. Således kunne en lett hydrolyserbar forbindelse slik som N-acetyl-L-cystein såvidt detekteres i plasma etter intra-intestinal injeksjon, mens N-isobutyryl-L-cystein, som ikke ble hydrolysert in vitro, nådde betydelige konsentrasjoner.

DATA OPPNÅDD I FRIVILLIGE PERSONER

Plasmakonsentrasjoner og urinutskillelse i friske frivillige personer ble etter oralt inntak av N-acetyl-L-cystein og N-isobutyryl-L-cystein, $1,23 \text{ mmol}$ av hver. Topp-plasmakonsentrasjonene av de frie tiolene var $<1 \mu\text{M}$, og $10 \mu\text{M}$, respektivt. Prosentandelene av dosene som ble utskilt uendret i urin, var 2% og 74%.

OPPSUMMERING AV METABOLISKE FORSØK

De ovenfor beskrevne forsøk har vist at N-acetyl-L-cystein er biologisk ustabil, og at dette leder til dårlig biotilgjengelighet etter oralt inntak. Modifikasjon av acylgruppen forbedret på dramatisk måte den biologiske stabilitet og også biotilgjengeligheten. Således nådde N-isobutyryl-L-cystein

høye konsentrasjoner i plasma, og vil antageligvis også nå lungen i mye større grad enn N-acetyl-L-cystein.

5 EFFEKTMÅLINGER

Eksposering overfor rent oksygen leder til lungeødem. Mekanismen er at det forøkede oksygentrykket leder til ufullstendig reduksjon av oksygen og følgelig til dannelsen av aktiverte oksygenelementer slik som superoksyd, peroksyder og hydroksylradikaler. Noen av disse aktiverte oksygenelementene er identiske med dem som dannes under inflammasjon.

Andre forskere har vist at N-acetyl-L-cystein infusert intravenøst beskytter delvis mot oksygenindusert ødem i rotter. Man har i sammenheng med foreliggende oppfinnelse bekreftet disse funn, og har også demonstrert at N-isobutyryl-L-cystein gir beskyttelse som er noe bedre, ved administrasjon på samme måten. Som angitt ovenfor nådde konsentrasjonen av N-isobutyryl-L-cystein i humanplasma etter oralt inntak en topp ved 10 μ M. Det synes derfor fullt mulig å oppnå beskyttelse mot oksydativt stress og muligens mot inflammasjon i lunge ved oralt inntak av foreliggende nye tioler.

KONKLUSJONER

Metaboliske studier demonstrerte at N-isobutyryl-L-cystein og N-pivaloyl-L-cystein var mye mer biologisk stabile enn den terapeutisk benyttede N-acetyl-L-cystein. Plasmanivåene for de nye forbindelsene etter oralt inntak var mye høyere enn nivåer av N-acetyl-L-cystein. Oksygen-toksisitetsmodellen viste at de nye forbindelsene beskyttet mot lungeskade i det minste så effektivt som N-acetyl-L-cystein etter intravenøs administrasjon. Resultatene viser at de nye forbindelsene

170413

11

vil være mye mer effektive enn N-acetyl-L-cystein mot oksydativt stress i lunge ved oral inngivelse.

5

10

15

20

25

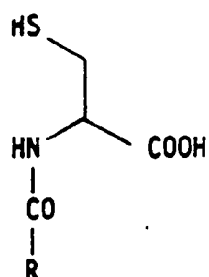
30

35

P a t e n t k r a v

1.

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutiske aktive
cysteinderivater med formelen:



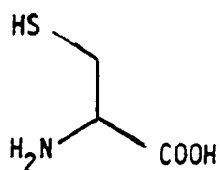
(I)

hvor R er $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ eller $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$

eller et fysiologisk akseptabelt salt eller optisk isomer
derav,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t m a n

omsetter en forbindelse med formelen:



eller en optisk isomer derav, med et acyleringsmiddel med
formelen:



hvor R har den ovenfor angitte betydning, og COX er en
reaktiv gruppe som kan reagere med en aminogruppe under
dannelse av en amidgruppe, hvorefter, om ønsket, en således

oppnådd forbindelse omdannes til en optisk isomer eller et fysiologisk akseptabelt salt derav.

2.

5 Analogifremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at man fremstiller en forbindelse med
formel (I) hvor R er $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

3.

10 Analogifremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at man fremstiller den optiske D-isomeren.

15

20

25

30

35