

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-2047**
 (22) Přihlášeno: **09.12.1996**
 (30) Právo přednosti: **28.12.1995 IT 1995MI/2772**
 (40) Zveřejněno: **11.11.1998**
(Věstník č. 11/1998)
 (47) Uděleno: **02.09.2005**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.11.2005**
(Věstník č. 11/2005)
 (86) PCT číslo: **PCT/EP1996/005496**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/024341**

(11) Číslo dokumentu:

295 804

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 D 275/02

C 07 D 277/30

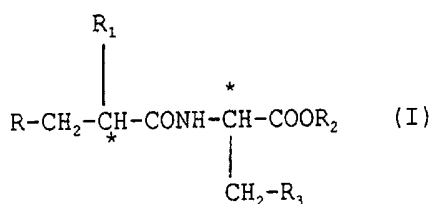
A 61 K 31/425

A 61 P 9/00

- (73) Majitel patentu:
ZAMBON GROUP S. P. A., Vicenza, IT
- (72) Původce:
Pellacini Franco, Milano, IT
Romagnano Stefano, Buccinasco, IT
Norcini Gabriele, Vizzola Ticino, IT
Santangelo Francesco, Milano, IT
Semeraro Claudio, Bresso, IT
- (74) Zástupce:
JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:
Thiolová sloučenina, způsob její přípravy a prostředek, který ji obsahuje

(57) Anotace:
Popsány jsou sloučeniny o vzorci I, způsob jejich přípravy a farmaceutické prostředky, které je obsahují jako aktivní složky. Sloučeniny o vzorci I jsou obdařeny směsnou inhibiční aktivitou ACE a NEP a jsou vhodné k léčbě kardiovaskulárních onemocnění.



CZ 295804 B6

Thiolová sloučenina, způsob její přípravy a prostředek, který ji obsahujeOblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká thiolových derivátů, vykazujících aktivitu inhibující metalopeptidázu a konkrétněji se týká N-merkaptocykloalaninových derivátů, vhodných k léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

10

Dosavadní stav techniky

Farmakologická zajímavost studia molekul s aktivitou inhibující metalopeptidázy je dána rolí, kterou tyto enzymy uplatňují vzhledem k úrovni kardiocirkulačního systému.

15

Ve skutečnosti je dobře známo, že sloučeniny, vykazující aktivitu, která inhibuje enzym konvertující angiotensin (ACE, angiotensin converting enzyme), jsou vhodné hlavně k léčbě vysokého tlaku (hypertenze), srdečního selhání a pohnatkového stavu z toho důvodu, že inhibují tvorbu angiotensinu II, látky, která zahrnuje několik účinků, mezi nimiž je i zvýšení krevního tlaku.

20

Sloučeniny, vykazující inhibiční aktivitu vzhledem k enzymu konvertujícímu endothelin (ECE), jsou vhodné jako anti-vasokonstriční látky, neboť inhibují tvorbu endothelinu, peptidu o 21 aminokyselinách, který vykazuje vasokonstriční aktivitu.

25

Sloučeniny s inhibiční aktivitou neutrálního endopeptidázového enzymu (NEP), zvaného také enkefalináza, jsou vhodné jako vasodilatační látky, neboť enzym NEP odpovídá za inaktivaci nejen endogenního enkefalinu, ale také některých natriuretických faktorů, v nichž například atrální faktor (ANF), hormon vylučovaný srdcem, který zvyšuje vasodilataci, na renální úrovni zvyšuje diurézu (vylučování moči ledvinami) a natriurézu (vylučování sodíku).

30

Proto jsou sloučeniny s aktivitou inhibující metalopeptidázu, i když jejich působení na kardiovaskulární systém vykazuje rozdílné mechanismy účinku, obecně používány, ať už samotné nebo ve vzájemné kombinaci, k léčbě vysokého tlaku, selhání ledvin, městnavého selhání srdce a ischemických kardiopatií.

35

Z thiolových derivátů, inhibitorů metalopeptidáz, jsou za mateřské sloučeniny inhibitorů NEP a inhibitorů ACE považovány Thiorphan [(DL)-(3-merkapt-2-benzylpropanoyl)glycin], poprvé popsány Roquesem se spoluautory v Nature 288, 286-288, 1988 a Kaptopril (Index Merck vydání XI, č. 1773, str. 267).

40

Další molekuly, mající thiolovou strukturu obdařenou inhibiční aktivitou metalopeptidázy, byly popsány v literatuře.

45

N-Merkaptocyklové dipeptidy obdařené aktivitou, inhibující ECE a konkrétněji N-merkaptocyklové deriváty tryptofanu byly popsány S.R. Bertenshawem se spoluautory v Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 10, 1953-1958, 1993.

50

Patent US 4 401 677 (E.R. Squibb and Sons, Inc.) popisuje merkaptocyklové aminokyseliny, obdařené inhibiční aktivitou enkefalinázy.

Patent US 4 199 512 (E.R. Squibb and Sons, Inc.) popisuje merkaptocyklové aminokyseliny, obdařené aktivitou inhibující ACE.

55

Evropská patentová přihláška EP 0 566 157 (Schering Corporation) popisuje N-merkaptocyklové deriváty alaninu, obdařené aktivitou inhibující NEP.

Evropská patentová přihláška EP 0 449 523 (E.R. Squibb and Sons, Inc.) popisuje merkapto-
nebo acylthiotrifluoromethylamidy s aktivitou inhibující NEP.

- 5 Evropská patentová přihláška EP 0 524 553 [Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)] popisuje acylmerkaptalkanoylové dipeptidy, obdařené aktivitou, inhibující neutrální endopeptidázu a peptidylpeptidázu A.

- 10 Mezinárodní patentová přihláška WO 93/08162 [Rhone-Poulenc Rorer S.A.-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)] popisuje β,β -disubstituované α -merkaptomethylpropionylamidy, obdařené směsnou inhibiční aktivitou vůči ACE/NEP.

- 15 Evropská patentová přihláška EP 0 419 327 (Société Civile Bioproject) popisuje aminokyselinové deriváty jako například N-merkaptocylové deriváty fenylalaninu, histidinu a tryptofanu, obdařené aktivitou, inhibující ACE a enkefalinázu.

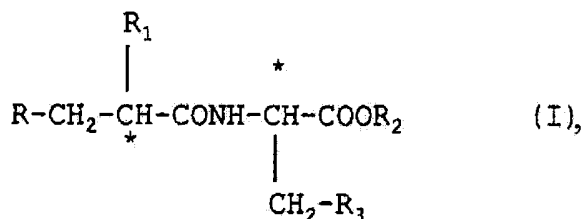
α -Merkaptocyldipeptidy, obdařené aktivitou inhibující ACE a NEP, jsou popsány rovněž S.S. Bhagwatem se spoluautory v Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 7, 735-738, 1995.

- 20 V této posledně jmenované práci bylo zjištěno, že zatímco přítomnost bifenylnemethylové skupiny uděluje molekulám s α -merkaptocyldipeptidovou strukturou zajímavou směsnou inhibiční aktivitu vzhledem k ACE/NEP, substituce bifenylové skupiny takovými skupinami jako α - nebo β -naftyl vyvolává významnou ztrátu aktivity.

25 Podstata vynálezu

- Byly zjištěny N-merkaptocyalaninové deriváty, které jsou obdařené pozoruhodnou aktivitou, inhibující enzym konvertující angiotensin, stejně jako neutrální endopeptidázový enzym (podvoj-
30 nou ACE/NEP inhibující aktivitu), což je činí zvláště vhodnými k léčbě kardiovaskulárních patologií.

Předmětem tohoto vynálezu jsou tedy sloučeniny obecného vzorce I



35

kde

R je merkaptoskupina nebo skupina R_4COS , v organismu konvertibilní na merkaptoskupinu;

40

- R_1 je přímá nebo větvená C_2 - C_4 alkylová skupina nebo arylová či arylalkylová skupina s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové skupině, v níž arylem je fenyl nebo pěti či šestičlenný aromatický heterocyklus s jedním nebo dvěma heteroatomy, zvolenými z dusíku, kyslíku a síry, volitelně substituovaný jedním nebo více substituenty, totožnými nebo odlišnými, zvolenými z halogeno-
45 vých atomů, hydroxyskupin, alkoxylových skupin, alkylových skupin, alkylthioskupin, alkylsulfonylových nebo alkoxykarbonylových skupin s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové skupině, C_1 - C_3 alkylových skupin obsahujících jeden či více fluoridových atomů, karboxyskupin, nitroskupin, aminových nebo aminokarbonylových skupin, acylaminoskupin, aminosulfonylových

skupin, mono- či di-alkylaminových nebo mono- či dialkylaminokarbonylových skupin s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové skupině;

R_2 je vodíkový atom, přímá nebo větvená C_1 – C_4 alkylová skupina nebo benzylová skupina;

5

R_3 je pěti či šestičetný aromatický heterocyklus s jedním nebo dvěma heteroatomy, zvolenými z dusíku, kyslíku a síry, volitelně substituovaný fenylovou skupinou, přičemž jsou fenyl a heterocyklická skupina volitelně substituované jedním nebo více substituenty, totožnými nebo odlišnými, zvolenými z halogenových atomů, alkylových skupin, alkoxylových skupin, alkylothioskupin nebo alkoxykarbonylových skupin s 1 až 3 uhlíkovými atomy v alkylové skupině;

10

R_4 je přímá nebo větvená C_1 – C_4 alkylová skupina nebo fenylová skupina;

uhlíkové atomy označené hvězdičkou jsou stereogenními centry (opticky aktivními uhlíkovými atomy);

15

a jejich farmaceuticky přijatelné sole;

za předpokladu, že R_3 není imidazolylovou nebo indolylovou skupinou.

20

Sloučeniny o vzorci I obsahují dvě stereogenní centra a mohou tedy existovat ve formě stereoizomerů.

Předmětem tohoto vynálezu jsou tedy sloučeniny o vzorci I ve formě stereoizomerní směsi, stejně jako ve formě jednotlivých stereoizomerů.

25

Sloučeniny o vzorci I, předmět tohoto vynálezu, jsou obdařeny podvojnou (duální), inhibiční aktivitou vůči ACE/NEP a hodí se k léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

30

Pokud není uvedeno jinak, je v předkládaném vynálezu výrazem přímá nebo větvená alkylová skupina míněn alkyl jako je methyl, ethyl, *n*-propyl, izopropyl, *n*-butyl, sekundární butyl, terciární butyl, izobutyl, *n*-pentyl, 2-pentyl, 3-pentyl, izopentyl, terciární pentyl, *n*-hexyl a izohexyl; výrazem přímá nebo větvená alkoxylová skupina je míněna alkoxylová skupina jako methoxylová, ethoxylová, *n*-propoxylová a izopropoxylová skupina; výrazem halogenový atom se míní fluorový, chlorový, bromový nebo jodový atom; výrazem acyl se míní acylová skupina, odvozená od alifatické nebo aromatické karboxylové kyseliny jako je kyselina octová, propionová, máselná a benzoová; výrazem pěti nebo šestičetný aromatický heterocyklus s jedním nebo dvěma heteroatomy, zvolenými z dusíku, kyslíku a síry, se míní skupina jako thiazol, izoxazol, oxazol, izothiazol, pyrazol, imidazol, thiofen, pyrrol, pyridin, pyrimidin, pyrazin, pyridazin a furan, volitelně benzokondenzovaná.

35

40

Příklady farmaceuticky přijatelných solí sloučenin o vzorci I jsou sole s alkalickými kovy nebo s kovy alkalických zemin a sole s farmaceuticky přijatelnými organickými bázemi.

45

Upřednostňovanými sloučeninami obecného vzorce I jsou sloučeniny, kde R_3 je pěti nebo šestičetná aromatická heterocyklická skupina s jedním nebo dvěma heteroatomy, zvolenými z dusíku, kyslíku a síry.

Stále upřednostňovanějšími sloučeninami jsou v rámci této třídy sloučeniny obecného vzorce I, kde R_1 představuje fenylnalkylovou skupinu, volitelně substituovanou jedním či více substituenty, stejnými nebo rozdílnými, zvolenými z halogenových atomů, hydroxylových, alkylových či alkoxylových skupin.

50

Upřednostňovanými příklady farmaceuticky přijatelných solí sloučenin o vzorci I jsou sole s alkalickými kovy, jako je sodík, lithium a draslík.

Odborníkovi v oboru je zřejmé, že sloučeniny o vzorci I, kde R je skupina $R_4\text{COS}$, která je v organismu přeměnitelná (konvertibilní) na merkaptoskupinu, stejně jako sloučeniny obecného vzorce I, kde R_2 je alkylová nebo benzylová skupina, jsou biologickými prekurzory (předchůdci) odpovídajících sloučenin o vzorci I, kde R je merkaptoskupina ($R=\text{SH}$) anebo R_2 je vodíkový atom.

Specifickými příklady upřednostňovaných sloučenin o vzorci I, předmětem předkládaného vynálezu, jsou:

methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(2-thienyl)alaninu;

methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(4-thiazolyl)alaninu;

methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(2-pyridyl)alaninu;

methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(3-pyridyl)alaninu;

methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(2-furyl)alaninu;

N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(2-thienyl)alanin;

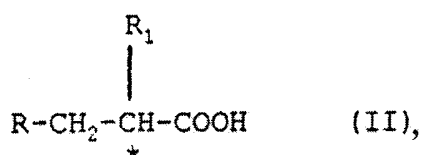
N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(4-thiazolyl)alanin;

N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(2-pyridyl)alanin;

N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(3-pyridyl)alanin;

N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(2-furyl)alanin.

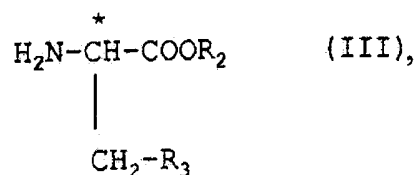
Výroba sloučenin obecného vzorce I, předmětu předkládaného vynálezu, se provádí syntetickým postupem, při němž se ponechá reagovat sloučenina o vzorci II



kde

R a R_1 mají dříve uvedené významy;

a alaninový derivát o vzorci III



kde R_2 a R_3 mají dříve uvedené významy.

Kondenzační reakce se provádí běžnými postupy, užívanými v chemii peptidů.

5 Před provedením reakce je vhodné důkladně chránit volitelné funkční skupiny, které by s reakcí mohly interferovat.

Volitelná ochrana se provádí běžnými postupy. Sloučeniny, kde R je skupina $R_4\text{COS}$, jsou tedy s výhodou užívány jako meziproducty o vzorci II, čímž se získávají odpovídající sloučeniny obecného vzorce I, kde $R=R_4\text{COS}$, z nichž lze hydrolýzou získat sloučeniny obecného vzorce I, kde $R=\text{SH}$.

10 Stanovení užitečnosti volitelné ochrany a výběru typu přijaté ochrany v závislosti na reakci která má proběhnout a s ohledem na funkční skupiny, které mají být chráněny, patří k normálním znalostem odborníka v oboru.

15 Odstranění volitelných ochranných skupin se provádí běžnými postupy.

Jako obecný odkaz k užívání ochranných skupin v organické chemii viz publikace Theodory W. Greene a Patera G. M. Wutse „Protective Groups in Organic Synthesis“, vyd. John Wiley and Sons, Inc, druhé vydání, 1991.

Sloučeniny o vzorcích II a III jsou známe nebo se snadno připravují běžnými metodami.

25 Jako příklad, sloučeniny o vzorci II mohou být připraveny podle popisu v britském patentu GB 1576161 firmy E.R. Squibb and Sons Inc.

Sloučeniny obecného vzorce I ve formě jednotlivých stereoizomerů se připravují stereoselektivní syntézou nebo separací směsi stereoizomerů za použití běžných postupů.

30 Běžnými postupy se provádí rovněž příprava solí sloučenin o vzorci I, předmětu předkládaného vynálezu.

Sloučeniny obecného vzorce I, předmět předkládaného vynálezu, jsou obdařeny duální aktivitou inhibující ACE i NEP a jsou vhodné k léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

35 Inhibiční aktivita sloučenin o vzorci I byla stanovena pomocí testů v uspořádání in vitro.

Konkrétně byla inhibiční aktivita sloučenin o vzorci I stanovena ve srovnání s dříve zmíněnými látkami Thiorphan a Kaptopril.

40 Inhibiční aktivita sloučenin obecného vzorce I v podmínkách in vitro, vyjádřená hodnotou IC_{50} , je farmakologicky významná v tom, že se pohybuje v nanomolárních koncentracích. Uvedená aktivita je srovnatelná s aktivitou Kaptoprilu pokud jde o inhibiční aktivitu ACE a s aktivitou Thiorphanu, pokud jde o inhibiční aktivitu NEP.

45 Pro praktické léčebné použití mohou být sloučeniny obecného vzorce I formovány do pevných nebo kapalných farmaceutických prostředků, vhodných k orálnímu nebo parenterálnímu podávání.

50 Farmaceutické prostředky, obsahující terapeuticky účinné množství sloučeniny obecného vzorce I ve směsi s nosičem pro farmaceutické použití jsou proto dalším předmětem předkládaného vynálezu.

Specifickými příklady farmaceutických prostředků podle předkládaného vynálezu jsou tablety, potahové tablety, kapsle, granuláty, roztoky a suspenze, vhodné k orálnímu podávání a roztoky a suspenze vhodné k parenterálnímu podávání.

- 5 Farmaceutické prostředky, předmět předkládaného vynálezu, se připravují běžnými postupy.

Denní dávka sloučeniny obecného vzorce I nebo odpovídající látky, z níž vzniká, bude záviset na více faktorech, jako je závažnost onemocnění, individuální citlivost pacienta nebo druh prostředku, ale obvykle se pohybuje mezi 0,1 mg a 10 mg na kilogram tělesné hmotnosti a je rozděluje se do 1 dávky nebo do více dávek podávaných v jednom dni.

K dokreslení předkládaného vynálezu jsou nyní uvedeny následující příklady.

15 Pokud není uvedeno jinak, bleskové chromatografie byly prováděny za použití silikagelu pro bleskovou chromatografii od firmy Baker (kód 7024-00).

Příklady provedení vynálezu

20

Příklad 1

Příprava methylesteru N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(4-thiazolyl)-L-alaninu (sloučeniny I)

25

30 Roztok hydroxybenzotriazolu (1,25 g; 9,25 mmol) v tetrahydrofuranu (30 ml) a následně roztok dicyklohexylkarbodiimidu (1,81 g, 9,25 mmol) v methylenchloridu (10 ml) byly při 0 °C a za míchání přidány ke směsi, tvořené kyselinou 3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionovou (2,78 g; 9,25 mmol), methylesterem (4-thiazolyl)-L-alaninu (2,40 g; 9,25 mmol), získaným působením methanolu a thionylchloridu na methylester N-*tert*-butoxykarbonyl-(4-thiazolyl)-L-alaninu (od firmy Synthetech Inc., Oregon), triethylaminem (2,58 ml; 18,5 mmol) v tetrahydrofuranu (25 ml) a methylenchloridem (40 ml).

35 Reakční směs byla udržována za míchání při teplotě místnosti po dobu 20 hodin, poté byla odfiltrována dicyklohexylmočovina a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Zbytek byl shromážděn za pomoci ethylacetátu a roztok byl promyt vodným roztokem 20% chloridu sodného, 5% hydrogenuhličitanu sodného a opět 20% roztokem chloridu sodného.

40 Po oddělení fází a odpaření organické fáze byla výsledná pevná látka čištěna bleskovou chromatografií (silikagel, eluent ethylacetát:hexan v poměru 1:1, tlak dusíku 0,01 MPa), poskytující tak jako olejovitý produkt methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(4-thiazolyl)-L-alaninu (3,85 g; 88% výtěžek).

45 Požadovaný produkt byl působením ethyletheru a hexanu na olejovitý produkt a následnou filtrací získán jako pevná látka (2,2 g; poměr stereoisomerů 2S:2R = 85:15).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 2,67–3,30 (m, 7H), CH₂–CH–CH₂, CH₂–thiazolyl; 3,6 (s, 3H, OCH₃); 4,77–4,89 (m, 1H, CONH–CH); 6,53 (s, 1H, NH); 7,15–7,90 (m, 10H, fenyl); 6,92–8,51 (m, 2H, thiazolyl).

50

Z matečných výluhů byl jako olejovitý produkt izolován další podíl sloučeniny 1 (1,5 g; stereoisomerní poměr 2S:2R = 65:35).

Analogickým způsobem byly připraveny následující sloučeniny:

methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(2-thienyl)-L-alaninu
(sloučenina 2)

5

teplota tání 68 až 70 °C

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 2,65–3,40 (m, 7H), CH₂-CH-CH₂, CH₂-thienyl; 3,61 a 3,62 (2s, 3H, OCH₃); 4,70–4,90 (2m, 1H, CONH-CH); 5,85–5,90 a 5,95–6,02 (2m, 1H, NH); 6,60–7,05 (m, 3H, thienyl); 7,10–8,00 (m, 10H, fenyl);

10

methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(2-pyridyl)-L-alaninu
(sloučenina 3)

15

teplota tání 84 až 86 °C

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 2,70–3,30 (m, 7H CH₂-CH-CH₂, CH₂-pyridyl; 3,59 (s, 3H, OCH₃); 4,71–4,92 (m, 1H, CONH-CH); 6,90–8,28 (m, 15H, NH, fenyl, pyridyl).

20

Příklad 2

Příprava N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(4-thiazolyl)-L-alaninu (sloučeniny 4)

25

Methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(4-thiazolyl)-L-alaninu (1,20 g; 2,56 mmol), připravený tak, jak je popsáno v Příkladu 1, byl suspendován v ethanolu (30 ml) a odplyněn probubláním dusíkem k odstranění kyslíku.

30

K suspenzi byl při 0 °C po kapkách a pod dusíkovou atmosférou přidán odplyněný roztok 1N (7,68 ml) hydroxidu sodného.

35

Reakční směs byla za míchání udržována 4 hodiny při teplotě místnosti, poté byla ochlazená na 0 °C a okyselena předem odplyněným roztokem 10% kyseliny chlorovodíkové (5 ml) a vody (5 ml).

Směs byla za sníženého tlaku odpařena do sucha, zbytek byl shromážděn za pomoci acetonitrilu a opět odpařen do sucha.

40

Zbytek, shromážděný za pomoci směsi methanol:methylenchlorid (1:1, 15 ml), byl zfiltrován k odstranění anorganických solí a poté byl roztok za sníženého tlaku odpařen do sucha.

Zbytek byl následně shromážděn za pomoci vody, obsahující kyselinu chlorovodíkovou (20 ml) a methylenchlorid (20 ml).

45

Fáze byly odděleny a organická fáze byla za sníženého tlaku odpařena do sucha, což poskytlo zbytek (0,81 g), z něhož byl působením terciárního butyletheru, filtrací a vysušením získán N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(4-thiazolyl)-L-alanin (0,52 g; 58% výtěžek; stereoizomerní poměr 2S:2R= 90:10).

50

teplota tání 145 až 147 °C

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1,53 (t, 1H, JHH=8,4 Hz, SH); 2,51–2,98 (m, 5H, CH₂-CH-CH₂); 3,39–3,51 (ABX, 2H, Jab=14,7 Hz, Jax=3,4 Hz, Jbx=5,9 Hz, CH₂-thiazolyl); 4,63–4,71 (m, 1H, HCOO); 6,51 (d, 1H, JHH=5,8 Hz, CONH); 7,09–7,30 [m, 6H, fenyl, CH(thiazolyl)]; 8,85 [d, 1H, JHH=2,0 Hz, CH(thiazolyl)].

55

Analogickým způsobem byly připraveny následující sloučeniny:

N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(2-thienyl)-L-alanin (sloučenina 5)

5

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1,40–1,61 (m, 1H, SH); 2,47–3,46 (m, 7H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-CH-COO}$); 4,78–4,91 (m, 1H, CHCOO); 6,00–6,06 (m, 1H, CONH); 6,40–7,33 (m, 8H, aromatický); 7,50 (bs, 1H, COOH).

10

N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(2-pyridyl)-L-alanin (sloučenina 6)

teplota tání 164 až 166 °C

15

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 1,78–1,86 (m, 1H, SH); 2,20–2,89 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$); 2,95–3,26 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-pyridyl}$); 4,64–4,75 (m, 1H, COCOO); 8,33 (d, 1H, $\text{JHH}=8,1$ Hz, NH); 7,10–8,47 (m, 9H, aromatický); 12,7 (bs, 1H, COOH).

Příklad 3

20

Stanovení farmakologické aktivity v podmínkách in vitro

a) inhibiční aktivity NEP

25

Inhibiční aktivita NEP byla stanovována v membránách kůry ledvin potkana albína, připravovaných postupem, popsaným T. Maedou a spoluautory v *Biochim. Biophys. Acta* **731**(1), 115–120, 1983.

30

Ledviny byly odejmuty samcům potkana albína druhu Sprague-Dawley, jejichž hmotnost činila přibližně 300 g a poté byly uchovávány při teplotě 4 °C.

35

Ledvinová kůra byla pečlivě oddělena, jemně nakrájena a suspendována v homogenizačním pufru (10 mmol.l^{-1} fosfát sodný o pH 7,4, obsahující 1 mmol.l^{-1} MgCl_2 , 30 mmol.l^{-1} NaCl a 0,02% NaN_3) v poměru hmotnosti a objemu 1:15.

Poté byla tkáň za studena 30 sekund homogenizována za použití homogenizéru Ultra-Turrax.

40

Přibližně 10 ml homogenátu bylo převrstveno na 10 ml sacharózy (41% hmotnost/objem) a odstředováno rychlostí 31 200 otáček za minutu (rpm) po dobu 30 minut při 4 °C v pevném úhlovém rotoru.

45

Membrány byly shromážděny z rozhraní pufru a sacharózy, dvakrát promyty 50 mmol.l^{-1} TRIS/HCl pufrem (pH 7,4) a opět suspendovány ve stejném pufru pro skladování alikvotních částí při –80 °C až do jejich použití.

Inhibiční aktivita NEP byla stanovována metodou, popsanou C. Lorenssem a spoluautory v *Eur. J. Pharmacol.* **69**, 113–116, 1981, jak bude uvedeno dále.

50

Alikvotní části membránové suspenze, připravené tak, jak bylo popsáno dříve (koncentrace bílkovin 5 $\mu\text{g/ml}$) byly preinkubovány v přítomnosti inhibitoru aminopeptidázy (Bestatin – 1 mmol.l^{-1}) po dobu 10 minut při teplotě 30 °C.

55

K získání konečného objemu 100 μl byly přidány [^3H][Leu 5]-enkefalin (15 nmol.l^{-1}) a pufr TRIS/HCl pH 7,4 (50 mmol.l^{-1}).

Enzymová reakce byla po 20 minutách inkubace při 30 °C zastavena přidavkem 0,1 mol.l⁻¹ HCl (100 µl).

5 Tvorba metabolitu [³H]Tyr–Gly–Gly byla po oddělení nezreagovaného substrátu chromatografií na polystyrenových sloupcích (Porapak Q) kvantifikována měřením relativní radioaktivity pomocí kapalinové scintilace.

10 Procento inhibice tvorby metabolitu v membránových preparátech ovlivněných sloučeninou o vzorci I a srovnávacími sloučeninami, vztažené k neovlivněným membránovým preparátům, bylo vyjádřeno jako hodnota IC₅₀ (nmol.l⁻¹).

b) inhibiční aktivita ACE

15 Inhibiční aktivita ACE byla stanovována metodou, popsanou v literatuře B. Holmquistem a spoluautory v *Analytical Biochemistry* 95, 540–548, 1979.

50 µmol.l⁻¹ ACE (250 mU/ml, purifikace: králíčí plíce, EC 3.4.15.1. SIGMA) bylo preinkubováno s 50 µl sloučeniny o vzorci I nebo srovnávací sloučeniny nebo odpovídajícího prostředí v termostátovaných kyvetách při 37 °C.

20 Reakce byla zahájena přidavkem 500 µl 0,8 mmol.l⁻¹ furylakryloylfenylalanylglycylglycinu (FAPGG–SIGMA).

25 Současně byla, za použití spektrofotometru Beckman DU–50, vybaveného programem pro výpočet delta A/minuty a regresních koeficientů křivek enzymových kinekit, spojitě po dobu 5 minut zaznamenávána absorbance při 340 nm.

30 Procento inhibice v preparátech inkubovaných se sloučeninami o vzorci I nebo se srovnávacími sloučeninami, vztažené k preparátům, inkubovaným s vehikulem, bylo vyjádřeno jako hodnota IC₅₀ (nmol.l⁻¹).

V následující tabulce 1 autoři uvádějí hodnoty IC₅₀ (nmol.l⁻¹), týkající se aktivity inhibující NEP a aktivity inhibující ACE u sloučenin 4, 5 a 6 a srovnávacích sloučenin Thiorphanu a Kaptoprilu.

35

Tabulka 1

Inhibiční aktivita ACE a inhibiční aktivita NEP, vyjádřené jako IC₅₀ (nmol.l⁻¹), sloučeniny 4, sloučeniny 5, sloučeniny 6, Thiorphanu a Kaptoprilu.

40

sloučenina	inhibiční aktivita ACE IC ₅₀ (nmol.l ⁻¹)	inhibiční aktivita NEP IC ₅₀ (nmol.l ⁻¹)
4	12	4,7
5	6,5	5,5
6	23	7,1
Thiorphan	99	18
Kaptopril	4,6	neaktivní

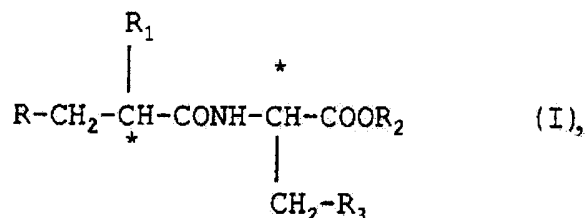
Údaje uvedené v Tabulce 1 ukazují, že sloučeniny obecného vzorce I, předmět předkládaného vynálezu, jsou obdařeny významnou duální inhibiční aktivitou ACE/NEP. Uvedená aktivita je výsledně srovnatelná s aktivitou Kaptoprilu, pokud jde o aktivitu inhibující ACE, a s aktivitou Thiorphanu, pokud jde o aktivitu inhibující NEP.

45

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Thiolová sloučenina o vzorci



10 kde

R je merkaptoskupina nebo skupina R_4COS ,

15 R_1 je přímá nebo větvená C_2-C_4 alkylová skupina nebo arylová či arylalkylová skupina s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové skupině, v níž arylem je fenyl nebo pěti či šestičlenný aromatický heterocykl s jedním nebo dvěma heteroatomy, zvolenými z dusíku, kyslíku a síry, volitelně substituovaný jedním nebo více substituenty, totožnými nebo odlišnými, zvolenými z halogenových atomů, hydroxyskupin, alkoxylových skupin, alkylových skupin, alkylthioskupin, alkylsulfonylových nebo alkoxykarbonylových skupin s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové skupině,
 20 C_1-C_3 alkylových skupin obsahujících jeden či více fluoridových atomů, karboxyskupin, nitroskupin, aminových nebo aminokarbonylových skupin, acylaminoskupin, kde acylová skupina je odvozena od karboxylové kyseliny, zvolené ze skupiny, sestávající z kyseliny octové, propionové, máselné a benzoové, aminosulfonylových skupin, mono- či dialkylaminových nebo mono- či dialkylaminokarbonylových skupin s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové skupině;

25

R_2 je vodíkový atom, přímá nebo větvená C_1-C_4 alkylová skupina nebo benzylová skupina;

R_3 je pěti či šestičlenný aromatický heterocyklus s jedním nebo dvěma heteroatomy, zvolenými z dusíku, kyslíku a síry, volitelně substituovaný fenylovou skupinou, přičemž fenyl a heterocyklická skupina jsou volitelně substituované jedním nebo více substituenty, totožnými nebo odlišnými, zvolenými z halogenových atomů, alkylových skupin, alkoxylových skupin, alkylthioskupin nebo alkoxykarbonylových skupin s 1 až 3 uhlíkovými atomy v alkylové skupině;

30

R_4 je přímá nebo větvená C_1-C_4 alkylová skupina nebo fenylová skupina;

35

uhlíkové atomy označené hvězdičkou jsou stereogenními centry;

a její farmaceuticky přijatelné sole;

40

za předpokladu, že R_3 není imidazolylovou nebo indolylovou skupinou.

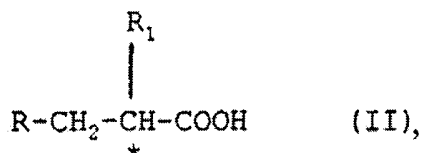
45

2. Thiolová sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R_3 je pěti či šestičlenný aromatický heterocykl s jedním nebo dvěma heteroatomy, zvolenými z dusíku, kyslíku a síry.

3. Thiolová sloučenina podle nároku 2 obecného vzorce I, kde R_1 je fenyalkylová skupina, volitelně substituovaná jedním nebo více substituenty, totožnými nebo odlišnými, zvolenými z halogenových atomů, hydroxylových, alkylových skupin nebo alkoxylových skupin.

4. Thiolová sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I ve formě sole s alkalickým kovem, zvoleným ze sodíku, lithia a draslíku.

5. Způsob výroby thiolové sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se nechá reagovat sloučenina o vzorci II

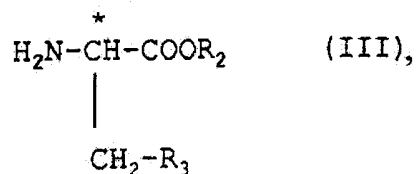


10 kde

R a R₁ mají významy, uvedené v nároku 1;

a alaninový derivát o vzorci III

15



kde R₂ a R₃ mají významy, uvedené v nároku 1.

- 20 6. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje terapeuticky účinné množství sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1, ve směsi s nosičem pro farmaceutické použití.

7. Farmaceutický prostředek podle nároku 6 pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění.

25

8. Použití sloučeniny podle nároku 1 k výrobě léčiva pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění.

9. Methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(4-thiazolyl)alaninu.

30

10. Methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(2-thienyl)alaninu.

11. Methylester N-(3-fenylkarbonylthio-2-fenylmethylpropionyl)-(2-pyridyl)alaninu.

35

12. N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(4-thiazolyl)alanin.

13. N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(2-thienyl)alanin.

14. N-(2-fenylmethyl-3-merkaptopropionyl)-(2-pyridyl)alanin.

40

45

Konec dokumentu
