HU 000220625 B1

(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

220 625 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 00202
(22) A bejelentés napja: 1993. 07. 23.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
9215665.2 1992. 07. 23. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 93/01557
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/02447

(40) A közzététel napja: 1995. 10. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2002. 03. 28.

(51) Int. Cl.[7]

C 07 C 259/06
A 61 K 31/16
A 61 P 19/00

(72) Feltalálók:
Beckett, Raymond Paul, Cowley, Oxfordshire (GB)
Crimmin, Michael John, Cowley, Oxfordshire (GB)
Dickens, Jonathon Philip, Milton Road, Cambridgeshire (GB)

(73) Szabadalmas:
British Biotech Pharmaceuticals Ltd., Cowley, Oxfordshire (GB)

(74) Képviselő:
ifj. Szentpéteri Ádám, S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Metalloproteáz enzimeket gátló hidroxámsavszármazékok, az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények, eljárás e vegyületek előállítására**

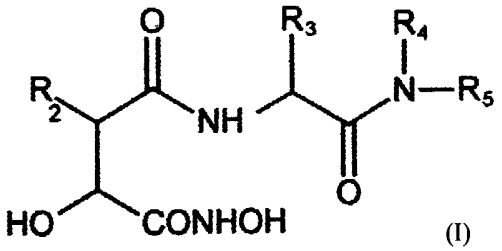
KIVONAT

A találmány tárgyát az (I) általános képletű vegyületek, ahol

R_2 jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport,
R_3 jelentése ciklohexil-metil- vagy terc-butil-csoport,
R_4 jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport, és
R_5 jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

valamint ezek sói, szolvátjai vagy hidrátjai képezik.

A találmány tárgyát képezik továbbá az ezen vegyületeket tartalmazó humán- vagy állatgyógyászati készítmények, valamint az ezen vegyületek előállítására irányuló eljárás is.



(I)

HU 220 625 B1

A leírás terjedelme 12 oldal (ezen belül 1 lap ábra)

A jelen találmány tárgyát gyógyászati hatással rendelkező hidroxámsav-származékok, azok sói, szolvátjai vagy hidrátjai, valamint az ezeket tartalmazó gyógyászati készítmények képezik, továbbá a találmány tárgya eljárás ezek előállítására. Részletesebben, e vegyületek gátolják a szövetek lebomlásában szerepet játszó metalloproteináz enzimeket, és ezenkívül gátolják a tumor nekrózis faktornak (a daganatsejtek elhalását előidéző anyagnak) a sejtekből való felszabadulását.

Az a vélemény alakult ki, hogy a kötőszövetek lebomlásában szerepet játszó metalloproteináz enzimek, például a kollagenáz, stromelizin és a zselatináz (amelyeket mátrix metalloproteináz néven ismerünk, rövidítésük: MMP) hatását gátolni képes vegyületeket feltehetőleg alkalmazni lehet majd bizonyos, a szövetek lebomlásával járó állapotok kezelésére vagy megelőzésére. Ilyen állapotok például a reumás ízületi gyulladás, a csont- és ízületi gyulladás, egyes csonthiánnyal járó betegségek, mint például a csontritkulás, a fogak körüli szövetek gyulladása, fogínygyulladás, a szaruhártya, felhám és a gyomor fekélyei, a daganatok áttételeződése, terjeszkedése és növekedése.

A tumor nekrózis faktor (rövidítése: TNF) egy citokin, amely egy 28 kiloD molekulatömegű prekurzor (előtermék) formájában, sejthez kötött állapotban keletkezik. A sejtből a 17 kiloD molekulatömegű aktív formában szabadul fel, e forma in vivo körülmények között (az élő szervezetben) számos káros hatást mediálhat (közvetíthet). Ha állatnak vagy embernek beadjuk, akkor e vegyület gyulladást, lázat, szív- és érrendszeri hatásokat, vérzéseket, véralvadást és heveny válaszreakciókat vált ki, e hatások hasonlóak a heveny fertőzéses és sokkos állapotokban fellépő tünetekhez. Tartós adagolása testi leromlást és étvágytalanságot is okozhat. A fölös tumor nekrózis faktor felhalmozódása a szervezetben halálos kimenetelű is lehet.

Állatkísérletes vizsgálatok számottevő bizonyítékot szolgáltattak arra nézve, hogyha a tumor nekrózis faktor hatását specifikus antitestekkel gátoljuk, akkor ez jótékony hatást fejthet ki heveny fertőzésekben, sokkos állapotokban, az átültetett szövetek által a gazdaszervezetben kiváltott reakciók esetében, és autoimmun betegségekben.

Továbbá, a tumor nekrózis faktor bizonyos csontvelődaganatokban és nyirokszövet-daganatokban autokrin növekedési faktorként működik, és az ilyen daganatokban szenvedő betegekben gátolni képes a normális vörösvértest-képződést.

Ezért úgy vélik, hogy a tumor nekrózis faktor termelését vagy hatását gátolni képes vegyületeket feltehetően számos gyulladásos, fertőzéses, immunológiai és rosszindulatú betegség kezelésére vagy megelőzésére lehet használni. Ilyen betegségek például, de nem kizárólag a szeptikus (vérmérgezéses) sokk, a vérnyomásváltozásból eredő sokk és szeptikus tünetegyüttes, a vérellátási zavarok után, a reperfúziós (a keringés újraindulása során fellépő) szövetkárosodás, malária, Crohn-kór, mikobaktérium-fertőzés, agyhártyagyulladás, pikkelysömör, dekompenzált szívbaj, a kötőszövetek rostos elfajulásával járó betegség, testi leromlás, az átültetett szövetek vagy szervek kilökődése, rák, autoimmun betegség, reumás ízületi gyulladás, általános elmeszesedés, sugárbetegség, immunszuppresszív hatású monoklonális antitestek, például OKT3 vagy CAMPATH-1 adagolását követően kialakuló toxicitás, és a fokozott oxigenizáció következményeként fellépő alveoláris (a tüdőhólyagocskákban fellépő) károsodás.

Ismeretes, hogy többféle, a mátrix metalloproteináz enzimek által mediált szövetkárosodásokkal járó betegségre és állapotra fokozott tumor nekrózis faktor termelés is jellemző. Ezért a mátrix metalloproteináz enzimeket és ezzel egyidejűleg a tumor nekrózis faktor termelését is gátló vegyületeknek különös előnyeik lehetnek olyan betegségek és állapotok kezelésében vagy megelőzésében, amelyekben mindkét mechanizmusnak szerepe van.

Az irodalomban leírtak több, a mátrix metalloproteináz enzimeket gátló vegyületcsaládot, ezek között vannak hidroxámsav-származékok is. Ilyen, hidroxámsav típusú mátrix metalloproteináz-gátlókat ismertetnek az alábbi szabadalmi közlések. 4,599,361 számú amerikai szabadalmi leírás (Searle);

EP–A–0236872 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés (Roche);

EP–A–0274453 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés (Bellon);

WO 90/05716 számon közzétett PCT szabadalmi bejelentés (British Bio-technology);

WO 90/05719 számon közzétett PCT szabadalmi bejelentés (British Bio-technology);

WO 91/02716 számon közzétett PCT szabadalmi bejelentés (British Bio-technology);

EP–A–0489577 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés (Celltech);

EP–A–0489579 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés (Celltech);

EP–A–0497192 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés (Roche);

WO 92/13831 számon közzétett PCT szabadalmi bejelentés (British Bio-technology);

WO 92/22523 számon közzétett PCT szabadalmi bejelentés (Research Corporation Technologies); és

WO 93/09090 számon közzétett PCT szabadalmi bejelentés (Yamanouchi).

E sokféle szerkezeti csoportba tartozó vegyületek közül a fenti közlésekben leírt hidroxámsav-származékoknak az egyes mátrix metalloproteináz enzimekkel szemben mutatott, belső hatékonysága esetenként igen nagy. Így például számos vegyület kollagenázgátló IC_{50}-értéke a Cawston és Barrett által leírt [Anal. Biochem., *99*, 340–345. (1979)] in vitro (nem az élő szervezetben végzett) tesztben kisebb mint 50 nanomol. Sajnálatos módon azonban az említett közlésekben leírt konkrét vegyületek fizikai-kémiai és/vagy farmakokinetikai tulajdonságai általában kiábrándítóak. Ezért e területen továbbra is igen kívánatos cél az olyan hidroxámsav típusú mátrix metalloproteináz-gátló vegyületek felfedezése, amelyek egyrészt nagy belső aktivitást mutatnak a kiválasztott mátrix metalloproteináz enzimekkel

szemben, másrészt, ezzel egyidejűleg jó fizikai-kémiai és/vagy farmakokinetikai tulajdonságaik vannak, tehát például az adagolás céljára egyszerűen lehet belőlük gyógyászati készítményeket előállítani, biológiai hozzáférhetőségük a beadást követően kellően hosszú ideig jó, és in vivo erős hatást fejtenek ki a kezelni kívánt betegségre vagy állapotra.

A fenti szabadalmi közlések nem tartalmaznak adatokat a tumor nekrózis faktor felszabadulásának gátlása tekintetében. Valójában úgy tűnik, hogy a tudomány mai állása szerint nem ismeretesek olyan, a mátrix metalloproteináz enzimeket gátló hidroxámsav-származékok, amelyek gátolnák a tumor nekrózis faktort.

A fenti közlésekben leírt hidroxámsav-származékok olyan, egyébként (I) általános képletű vegyületek, ahol a hidroxilcsoport helyén R_1 csoport áll [(IA) általános képletű vegyületek] és R_1, R_2, R_3, R_4 és R_5 jelentése az egyes közlésekben részletezett módon változik, de R_1 jelentése hidroxicsoporttól eltérő. Ezen R_1, R_2, R_3, R_4 és R_5 csoportok változtatásával az adott vegyületek belső aktivitása, a mátrix metalloproteináz enzimek adott típusára kifejtett hatásuk specifikus jellege, valamint fizikai-kémiai és farmakokinetikai sajátságaik nem előrelátható módon változik.

A fenti közlések közül csak az EP–A–0236872 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés utal arra a lehetőségre, hogy az (IA) általános képlettel jellemezhető kollagenázgátlók egyik csoportjában R_1 jelentése hidroxilcsoport is lehet. Ez a lehetőség R_1 számos egyéb jelentése között szerepel, olyan vegyületekkel összefüggésben, amelyekben R_3 jelentése egy természetes eredetű aminosav jellemző oldallánca, ahol bármely funkciós csoport védett formában, így bármely aminocsoport acilezett formában, és bármely karboxilcsoport észteresített formában lehet. Az EP–A–0236872 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés nem ír le olyan vegyületeket, amelyeknek előnyös vagy különösen jelentős kollagenázgátló hatásuk lenne, és valójában nem említ különösen egyetlen olyan konkrét vegyületet sem, ahol R_1 jelentése hidroxilcsoport lenne. A bejelentés nem említi e területnek fent tárgyalt, azon problémáját, hogy olyan hidroxámsav típusú mátrix metalloproteináz-gátlókra volna szükség, amelyeknek jó belső aktivitásprofilja mellett jó fizikai-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságaik vannak.

A jelen találmány tárgyát olyan, szintén az (IA) általános képlettel jellemezhető új vegyületek képezik, amelyek lényeges tulajdonsága, hogy R_1 jelentése hidroxilcsoport, és ahol a kiválasztott R_3 csoport nem valamely természetes eredetű aminosav oldallánca, hanem terc-butil- vagy ciklohexil-metil-csoport. Azt találtuk, hogy e vegyületeknek általában megvannak azok a kívánatos, de előre meg nem jósolható, és a gyógyászati készítmények előállításához, a jó formázhatósághoz szükséges tulajdonságaik, például a jó vízoldhatóság. Emellett, e vegyületek mátrix metalloproteináz-gátló hatása a kívánatos profilt mutatja, így gátolják mind a kollagenáz, mind a stromelizin enzimet. E csoportba olyan vegyületek tartoznak, amelyek orális (szájon át történő) beadást követően magas vérszintet érnek el, és amelyek mátrix metalloproteináz enzimek által mediált betegségek és állapotok tekintetében mérvadó állatkísérletes, modellekben, orális adagolást követően in vivo hatásosak. Továbbá, amint ezt már a fentiekben említettük, azt találtuk, hogy a jelen találmány szerinti vegyületeknek megvan az a váratlan, ám kívánatos tulajdonságuk, hogy gátolják a tumor nekrózis faktor termelését, így a jelen találmány tárgyát egyrészt az (I) általános képletű vegyületek, ahol

R_2 jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport,

R_3 jelentése ciklohexil-metil- vagy terc-butil-csoport,

R_4 jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport, és

R_5 jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

valamint ezek sói, szolvátjai vagy hidrátjai képezik.

A jelen leírásban az „1–6 szénatomos alkilcsoport" és a „telített, legfeljebb 6 szénatomos szénhidrogéncsoport" kifejezések egyenes vagy elágazó szénláncú, 1–6 szénatomos alkilcsoportokat jelentenek, ilyenek például a metilcsoport, etilcsoport, propilcsoport, izopropilcsoport, butilcsoport, tercier-butil-csoport, pentilcsoport és a hexilcsoport.

A jelen találmány szerinti vegyületek sói lehetnek élettanilag elfogadható savaddíciós sók, például hidrokloridok, hidrobromidok, szulfátok, metán-szulfonátok, p-toluolszulfonátok, foszfátok, acetátok, citrátok, szukcinátok, laktátok, tartarátok, fumarátok vagy maleátok. Bázisokkal is képezhetünk sókat, így például előállíthatunk nátrium-, kálium-, magnézium-, vagy kalciumsókat is.

A jelen találmány szerinti vegyületekben az aszimmetriás szénatomok jelenléte révén több királis centrum van. E több aszimmetriás szénatom jelenléte miatt e vegyületek több diasztereomer formájában létezhetnek, amelyekben az egyes királis centrumok sztereokémiája R vagy S. Úgy tekintjük, hogy az (I) általános képletű vegyületek és (ha nem adjuk meg másképp) a jelen leírásban előforduló valamennyi egyéb vegyület körébe beleértjük az összes ilyen sztereoizomert és ezek keverékeit (például racém keverékeit) is.

A jelen találmány szerinti vegyületekben az egyes királis centrumok előnyös sztereokémiája általában a következő:

- a hidroxilcsoportot és a hidroxámsavcsoportot viselő szénatom sztereokémiája: S
- az R_2 csoportot hordozó szénatom sztereokémiája: R, és
- az R_3 csoportot hordozó szénatom sztereokémiája: S,

de idetartoznak az olyan keverékek is, amelyekben túlnyomórészt a fent megadott konfigurációjú izomerek vannak jelen.

Jelenlegi ismereteink szerint különösen előnyöseknek tekintjük a jelen találmány szerinti alábbi vegyületeket, miután különféle tulajdonságaik előnyös egyensúlyban állnak, amennyiben jól formázhatók, miután vízben jól oldhatók: nagy belső hatékonyságot mutatnak a kollagenáz és stromelizin enzimek gátlásában, továbbá a tumor nekrózis faktor felszabadulásának gátlásában; jó farmakokinetikai sajátságokkal rendelkeznek, amit például az mutat, hogy a szakmában általánosan

használt, patkány adjuváns arthritis (ízületi gyulladás) modellkísérletben orális alkalmazásban erős in vivo hatást mutatnak:
N^2-[3S-hidroxi-4-(N-hidroxi-amido)-2R-izobutil-szukcinil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amid, és az
N^2-[3S-hidroxi-4-(N-hidroxi-amido)-2R-izobutil-szukcinil]-L-tercier-leucin-N^1-metil-amid,
és ezek sói, szolvátjai és hidrátjai.

A jelen találmány szerinti vegyületeket önmagában ismert módszerekkel állíthatjuk elő, továbbá az alábbi módon, amely ugyancsak a jelen találmány tárgyát képezi, így a jelen találmány tárgya továbbá eljárás az (I) általános képletű vegyületek előállítására, amely abban áll, hogy

a) valamely (II) általános képletű savat vagy annak aktivált, reakcióképes származékát hidroxil-aminnal, a hidroxil-aminnak az oxigénatomon védett származékával vagy sójával kapcsoljuk, ahol a (II) általános képletben
R_2, R_3, R_4 és R_5 jelentése az (I) általános képletre megadott, azzal az eltéréssel, hogy R_4 és R_5 helyén védőcsoport is állhat, majd az így kapott hidroxámsavról lehasítjuk az adott esetben jelen levő védőcsoportokat, valamint az R_4 és R_5 helyén adott esetben jelen levő védőcsoportokat; és
b) kívánt esetben a keletkező (I) általános képletű vegyületet sójává, szolvátjává vagy hidrátjává alakítjuk, és ilyen formában izoláljuk.

Egy (II) általános képletű savat úgy alakíthatunk át egy aktivált, reakcióképes köztitermékké, például pentafluor-fenil-észterré, hidroxi-szukcinil-észterré vagy hidroxi-benzotriazolil-észterré, hogy a savat egy vízelvonószer, például diciklohexil-karbodiimid, N,N-dimetil-amino-propil-N'-etil-karbodiimid vagy 2-etoxi-1-etoxi-karbonil-1,2-dihidro-kinolin jelenlétében a megfelelő alkohollal reagáltatjuk.

A fentiekben említett védőcsoportok önmagában ismertek, például a peptidek kémiájában alkalmazott módszerekből. Az aminocsoportokat gyakran megvédhetjük például benzil-oxi-karbonil-csoporttal, tercier-butoxi-karbonil-csoporttal vagy acetilcsoporttal, vagy pedig ftálimidocsoport formájában. A hidroxilcsoportokat gyakran megvédhetjük az egyszerűen elhasítható éterek, például a tercier-butil-éter vagy benzil-éter formájában, vagy pedig a könnyen elhasítható észterek, például acetát formájában. A karboxilcsoportokat gyakran megvédhetjük a könnyen elhasítható észterek, például a tercier-butil-észter vagy a benzil-észter formájában.

A (II) általános képletű vegyületeket úgy állíthatjuk elő, hogy valamely (III) általános képletű, ahol
R_2 jelentése az (I) általános képletre megadott, és
R_{10} és R_{11} jelentése egymástól függetlenül hidroxi-védőcsoport, vagy pedig együttes jelentésük olyan kétértékű csoport, amely egyidejűleg megvédi mindkét hidroxilcsoportot, savat vagy ennek aktivált, reakcióképes származékát egy (IV) általános képletű, ahol
R_3, R_4 és R_5 jelentése az (I) általános képletre megadott,
aminnal reagáltatjuk, majd ezután lehasítjuk a védőcsoportot vagy védőcsoportokat. Egy (III) általános képletű sav aktivált, reakcióképes származéka lehet például egy aktivált észter, mint például egy pentafluor-fenil-észter, egy savanhidrid vagy savhalogenid, például savklorid. R_{10} és R_{11} jelentése lehet bármely szokásos, önmagában ismert hidroxi-védőcsoport, de egy különösen jól alkalmazható módszer abban áll, hogy a két hidroxilcsoportot egyidejűleg, az (V) általános képletben bemutatott módon egy dioxolángyűrű formájában védjük, ahol R_{12} és R_{13} a dioxolángyűrű kialakításához használt reagensből származtatható le, és jelentésük például hidrogénatom, alkilcsoport, fenilcsoport vagy helyettesített fenilcsoport lehet.

Amint ezt a fentiekben említettük, az (I) általános képletű vegyületeket mátrix metalloproteináz enzimeket gátló hatásuk révén az ember- és állatgyógyászatban használhatjuk, és e vegyületek további előnye abban áll, hogy gátolják a tumor nekrózis faktornak a sejtekből való felszabadulását.

A találmány szerinti vegyületek alkalmasak mátrix metalloproteináz enzimek által mediált betegségek és állapotok, például a szövetek lebomlásával, például a csontszövet újrafelszívódásával járó betegségek, egyes gyulladásos betegségek, bőrgyógyászati állapotok és a daganatoknak a másodlagos áttételek formájában való elterjedése, és különösen a reumás ízületi gyulladás, a csont- és ízületi gyulladás, a fogak körüli szövetek gyulladása, fogínygyulladás, a szaruhártya fekélye, és a daganatoknak a másodlagos áttételek formájában való elterjedése, valamint

a tumor nekrózis faktor által mediált betegségek és állapotok, például a gyulladás, láz, szív- és érrendszeri hatások, vérzések, véralvadás és a heveny válaszreakciók, a testi leromlás és étvágytalanság, heveny fertőzések, sokkos állapotok, az átültetett szövetek által a gazdaszervezetben kiváltott reakciók és az autoimmun betegségek kezelésénél történő felhasználásra.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan ember- vagy állatgyógyászati készítmények, amelyek hatóanyagként valamely (I) általános képletű vegyületet tartalmaznak, egy ember- vagy állatgyógyászatilag elfogadható töltőanyag vagy vivőanyag kíséretében. Tekintettel a jelen találmány szerinti vegyületek olyan előnyeire, mint például a vízoldhatóságuk és az orális adagolást követően fennálló biológiai hozzáférhetőségük, a jelen találmány tárgyát képezik továbbá olyan ember- vagy állatgyógyászati készítmények, amelyek hatóanyagként valamely (I) általános képletű vegyületet tartalmaznak egy ember- vagy állatgyógyászatilag elfogadható töltőanyag vagy vivőanyag kíséretében, *azzal jellemezve,* hogy a készítmény orális adagolásban használható.

Egy ilyen készítményben egy vagy több (I) általános képletű vegyület lehet jelen, egy vagy több töltőanyaggal vagy vivőanyaggal együtt.

A jelen találmány szerinti vegyületekből tetszés szerinti úton adagolható készítményeket állíthatunk elő, ha az adagolás kiválasztott útja összhangban van a hatóanyag farmakokinetikai tulajdonságaival. Az orálisan adagolható készítmények, formájukat tekintve lehetnek kerek vagy szögletes tabletták, kapszulák, porok, granu-

látumok, cseppfolyós halmazállapotú vagy gélszerű készítmények, mint például az orálisan, helyileg vagy parenterálisan (a gyomor- és bélrendszer megkerülésével) adagolt steril oldatok vagy szuszpenziók. Az orálisan adagolt tabletták és kapszulák dózisegység formájúak lehetnek, és tartalmazhatnak szokásos, önmagában ismert töltőanyagokat, például kötőanyagokat, mint például szirupot, gumiarábikumot, zselatint, szorbitot, tragakantát vagy polivinil-pirrolidont; töltőanyagokat, mint például laktózt, répacukrot, kukoricakeményítőt, kalcium-foszfátot, szorbitot vagy glicint; a tabletta szétesését elősegítő anyagot, mint például magnézium-sztearátot, talkumot, polietilénglikolt vagy szilícium-dioxidot; a szétesést elősegítő anyagokat, például burgonyakeményítőt vagy elfogadható nedvesítőszereket, például nátrium-lauril-szulfátot. A tablettákat a gyógyszerészeti gyakorlatban szokásos, önmagában ismert módon bevonatokkal is elláthatjuk. Az orálisan adagolt, cseppfolyós halmazállapotú készítmények formája lehet például vizes vagy olajos szuszpenzió, oldat, emulzió, szirup vagy szörp, amelyet elkészíthetünk száraz formában is, amelyet felhasználás előtt egy megfelelő vivőanyaggal beadható formájúvá teszünk. Az ilyen cseppfolyós halmazállapotú készítmények tartalmazhatnak szokásos, önmagában ismert adalék anyagokat, például szuszpendálószereket, mint például szorbitot, szirupot, metil-cellulózt, glükózszirupot, zselatint, hidrogénezett, fogyasztható zsírokat; emulgeálószereket, mint például lecitint, szorbitán-monooleátot vagy gumiarábikumot; nem vizes vivőanyagokat (amelyek lehetnek például fogyasztható olajak), például mandulaolajat, frakcionált kókuszdióolajat, a glicerin olajos észtereit, propilénglikolt vagy etil-alkoholt; konzerválószereket, mint például metil- vagy propil-p-hidroxi-benzoátot vagy szorbinsavat, és kívánt esetben a szokásos ízesítő- vagy színezőanyagokat.

Az orális adagolásra szánt dózisegység a jelen találmány szerinti vegyületnek körülbelül 1 mg és 250 mg közötti, és előnyösen körülbelül 25 mg és 250 mg közötti mennyiségét tartalmazhatja. Egy emlős kezelésére használt, alkalmas napi dózis széles határok között változhat, a beteg állapotától függően. Egy (I) általános képletű vegyület megfelelő dózisa azonban a testtömeg 1 kg-jára számítva körülbelül 0,1 mg és 300 mg között, és különösen 1 mg és 100 mg között lehet.

A bőr kezelésére használt, helyileg alkalmazott készítmény formája krém, lotion vagy kenőcs lehet. Az ilyen hatóanyagokat tartalmazó krémek vagy kenőcsök a szokásos, önmagában ismert készítmények lehetnek, például olyanok, amelyeket a szokásos gyógyszerkönyvek, mint például a Brit Gyógyszerkönyv leír.

Ha a hatóanyagot helyileg a szembe akarjuk adagolni, akkor egy alkalmas, steril vizes vagy nem vizes vivőanyag segítségével oldatot vagy szuszpenziót készítünk belőle. E készítmények tartalmazhatnak adalékanyagokat, például pufferanyagokat, mint például nátrium-metabiszulfitot vagy dinátrium-edetátot (az etilén-diamin-tetraecetsav dinátriumsóját); konzerválószereket, például baktériumellenes vagy gombaellenes szereket, mint például fenil-merkuri-acetátot vagy -nitrátot, benzalkónium-kloridot vagy klór-hexidint, továbbá sűrítőszereket, mint például hipromellózt.

A helyileg alkalmazott készítmény dózisa természetesen a kezelni kívánt terület méretétől függ. A szemek kezelésére alkalmazott dózis általában 10 mg és 100 mg közötti mennyiségű hatóanyagot tartalmaz.

Adagolhatjuk a hatóanyagot parenterálisan, egy steril közegben is. A vivőanyagtól és az alkalmazott koncentrációtól függően a hatóanyagot vagy szuszpendáljuk, vagy feloldjuk a vivőanyagban. E vivőanyagban célszerűen feloldhatunk olyan segédanyagokat is, mint például helyi érzéstelenítőket, konzerválószereket és pufferanyagokat.

Ha a hatóanyagot a reumás ízületi gyulladás kezelésére kívánjuk használni, akkor adagolhatjuk orálisan vagy közvetlenül a betegség által érintett ízületbe, injekció formájában. Egy 70 kg testtömegű emlős napi dózisa 10 mg és 1 g között lehet.

A jelen találmány szerinti vegyületeket és az előállításukra szolgáló eljárást a továbbiakban – a találmány oltalmi körének szűkítése nélkül – példákkal szemléltetjük.

Az alábbi példákban kiindulási vegyületként használt aminosavak a kereskedelemben kaphatók, vagy pedig az irodalomban leírt, önmagában ismert módszerekkel készítjük el azokat. Ezen aminosavakat minden esetben a szokásos, önmagában ismert módszerekkel a kívánt N-metil-amidokká alakítjuk.

1. példa

N^2-[3S-Hidroxi-4-(N-hidroxi-amido)-2R-izobutil-szukcinil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amid

[(VI) képletű vegyület]

a) lépés

3R-Karboxi-izopropil-2S-hidroxi-5-metil-hex-5-énsav-izopropil-észter

80 ml (570 mmol) N,N-diizopropil-aminból és 48,1 ml (481 mmol) 10 mólos n-butil-lítium-oldatból 500 ml vízmentes tetrahidrofuránban készült lítium-N,N-diizopropil-amid-oldathoz –70 °C hőmérsékleten hozzáadunk 50 g (230 mmol) 2S-hidroxi-bután-disav-diizopropil-észtert. Az adagolás befejezése után az elegyet –15 °C hőmérsékletre melegítjük, és 8 órán át keverjük. Ezután –70 °C hőmérsékletre hűtjük, és lassan úgy adagolunk hozzá 46 g (252 mmol) metallil-jodidot, hogy eközben az elegy hőmérséklete ne emelkedjék –65 °C fölé. Ezt követően a reakcióelegyet –40 °C hőmérsékletre melegítjük, 18 órán át keverjük, majd –15 °C hőmérsékleten citromsav hozzáadásával a reakciót befagyasztjuk. A szerves részt elválasztjuk, 500 ml 10%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd 300 ml telített, vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, magnézium-szulfáton megszárítjuk, a szárítószert kiszűrjük, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az így kapott barna színű olajat (64 g) egy 1 kg szilikagéllel töltött oszlopon kromatografálva tisztítjuk, e célból 20%-tól 35%-ig növekvő mennyiségű dietil-étert tartalmazó hexánnal gradiens elúciót végzünk. Ily módon 30,9 g (hozam: 49%) kívánt terméket különítünk el, amely az NMR-vizsgálatok szerint a diasztereomerek 17:1 arányú keveréke.

^{1}H–NMR-spektrum ($CDCl_3$, fő diasztereomer), delta:

5,06 (1H, szeptett, J=6,3 Hz), 4,97 (1H, szeptett, J=6,3 Hz), 4,78 (2H, d, J=7,1 Hz), 4,16 (1H, m), 3,20 (1H, d, J=6,2 Hz), 3,00 (1H, m), 2,50, 2,35 (2H, ABX, J=7,0, 8,7, 14,4 Hz), 1,72 (3H, s) és 1,24–1,16 (12H, 2 m).

b) lépés

3R-Karboxi-izopropil-2S-hidroxi-5-metil-hexánsav-izopropil-észter

7,14 g (26,2 mmol) 3R-karboxi-izopropil-2S-hidroxi-5-metil-hex-5-énsav-izopropil-észtert feloldunk 80 ml etanolban, és éjszakán át 1,0 g 10%-os csontszenes palládiumkatalizátor jelenlétében, hidrogénatmoszférában keverjük. Utána a katalizátort kiszűrjük, és a szűrletről az oldószert ledesztilláljuk. Ily módon tiszta olaj formájában 7,03 g (hozam: 98%) terméket kapunk.

^{1}H–NMR-spektrum ($CDCl_3$), delta:

5,06 (1H, szeptett, J=6,3 Hz), 4,97 (1H, szeptett, J=6,3 Hz), 4,17 (1H, br s), 3,24 (1H, br s), 2,83 (1H, m), 1,68 (2H, m), 1,44 (1H, m), 1,24 (6H, d, J=6,2 Hz), 1,18 (6H, d, J=6,2 Hz) és 0,89 (6H, m).

c) lépés

3R-Karboxi-2S-hidroxi-5-metil-hexánsav

7,0 g (25,6 mmol) 3R-karboxi-izopropil-2S-hidroxi-5-metil-hexánsav-izopropil-észtert feloldunk 15 ml dioxán és 14 ml víz elegyében, hozzáadjuk 4,29 g kálium-hidroxid 22 ml vízzel készült oldatát, és az elegyet éjszakán át 90 °C hőmérsékleten melegítjük. Utána hagyjuk az oldatot lehűlni, majd átengedjük egy 200 ml Dowex 50X4-400 jelzésű ioncserélő gyantával töltött oszlopon. Ily módon 4,82 g (hozam: 99%) cím szerinti vegyületet kapunk.

^{1}H–NMR-spektrum ($CDCl_3$), delta:

8,70 (2H, br s), 4,32 (1H, br s), 3,10 (1H, m), 1,85–1,55 (3H, m) és 0,96 (6H, m).

d) lépés

2R-(2,2-Dimetil-4-oxo-1,3-dioxolán-5S-il)-4-metil-pentánsav

5,19 g (27,3 mmol) 3R-karboxi-2S-hidroxi-5-metil-hexánsavat feloldunk 150 ml 2,2-dimetoxi-propán és 40 ml N,N-dimetil-formamid elegyében, és az elegyet éjszakán át 30 °C hőmérsékleten, katalitikus mennyiségű p-toluolszulfonsav jelenlétében keverjük. Utána az oldószert ledesztilláljuk, ily módon 6,87 g (hozam: >100%), oldószerrel szennyezett, cím szerinti vegyületet kapunk.

^{1}NMR–spektrum ($CDCl_3$), delta:

4,41 (1H, d, J=4,8 Hz), 2,91 (1H, m), 1,69 (3H, m), 1,54 (3H, s), 1,48 (3H, s) és 0,88 (6H, m).

e) lépés

R-(2,2-Dimetil-4-oxo-1,3-dioxolán-5S-il)-4-metil-pentánsav-(pentafluor-fenil)-észter

558 mg (2,4 mmol) 2R-(2,2-dimetil-4-oxo-1,3-dioxolán-5S-il)-4-metil-pentánsavat feloldunk 10 ml diklór-metánban, az oldatot 0 °C hőmérsékletre hűtjük, és hozzáadunk 670 mg (3,6 mmol) pentafluor-fenolt és 560 mg (2,9 mmol) N-etil-N'-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimidet. A reakcióelegyet 2 órán át 0 °C hőmérsékleten keverjük, majd 50 ml 1 mólos nátrium-karbonát-oldattal és 20 ml telített, vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk. A szerves részt magnézium-szulfáton megszárítjuk, a szárítószert kiszűrjük, és az oldószert ledesztilláljuk. A maradékot egy szilikagéllel töltött oszlopon kromatografálva tisztítjuk, eluensként diklór-metánt használunk. Ily módon 552 mg (hozam: 58%) aktivált észtert kapunk.

^{1}H–NMR-spektrum ($CDCl_3$), delta:

4,57 (1H, d, J=6,5 Hz), 3,32 (1H, m), 1,86 (3H, m), 1,67 (3H, s), 1,58 (3H, s) és 1,03 (6H, m).

f) lépés

N^2-[2R-(2,2-Dimetil-4-oxo-1,3-dioxolán-5S-il)-4-metil-pentanoil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amid

1,06 g (2,7 mmol) 2R-(2,2-dimetil-4-oxo-1,3-dioxolán-5S-il)-4-metil-pentánsav-(pentafluor-fenil)-észtert és 0,33 g (1,8 mmol) L-ciklohexil-alanin-N-metil-amidot feloldunk 150 ml N,N-dimetil-formamidban, és az elegyet éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük. Utána az oldószert ledesztilláljuk, és a kapott olajat egy szilikagéllel töltött oszlopon kromatografálva tisztítjuk, e célból 0%-tól 5%-ig növekvő mennyiségű metanolt tartalmazó diklór-metánnal gradienselúciót végzünk. Ennek során először a reagálatlan észtert különítjük el, majd ezután 0,43 g (hozam: 60%) kívánt terméket kapunk.

^{1}H–NMR-spektrum ($CDCl_3$), delta:

6,47 (2H, br m és d, J=8,3 Hz), 4,53 (1H, d, J=6 Hz), 4,49 (1H, m), 2,76 (4H, m), 1,80–1,50 (12H, br m), 1,62 (3H, s), 1,54 (3H, s), 1,35–1,10 (4H, br m) és 0,91 (6H, m).

g) lépés

N^2-[3S-Hidroxi-2R-izobutil-szukcinil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amid

0,43 g (1,1 mmol) N^2-[2R]-(2,2-dimetil-4-oxo-1,3-dioxolán-5S-il)-4-metil-pentanoil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amidot feloldunk 15 ml 2 mólos sósav és 20 ml tetrahidrofurán elegyében, és a reakcióelegyet éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük Utána az oldószert ledesztilláljuk, ily módon majdnem fehér színű, habos anyag formájában 0,35 g (hozam: 91%) kívánt terméket kapunk.

^{1}H–NMR-spektrum (CD_3OD), delta:

4,37 (1H, m), 4,16 (1H, d, J=5,6 Hz), 2,75 (1H, m), 2,68 (3H, s), 1,80–1,50 (12H, m), 1,38–1,10 (4H, br m) és 0,90 (6H, m).

h) lépés

N^2-[4-(N-Benzil-oxi-amido)-3S-hidroxi-2R-izobutil-szukcinil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amid

0,35 g (1,0 mmol) N^2-[3S-hidroxi-4-hidroxi-2R-izobutil-szukcinil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amidot feloldunk 5 ml tetrahidrofuránban, majd az oldathoz hozzáadunk 5 ml vizet és 0,24 g (1,5 mmol) O-benzil-hidroxil-amin-hidrokloridot. A kapott oldatot 0 °C hőmérsékletre hűtjük, majd hozzáadunk 0,38 g (2,0 mmol) N-etil-N'-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid-hidrokloridot, és a reakcióelegyet éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük. Utána a tetrahidrofuránt csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, ennek során a termék kikristályosodik. Az elegyet azonos térfogatú vízzel hígítjuk, a terméket kiszűrjük, vízzel mossuk, majd

nagymértékben csökkentett nyomáson megszárítjuk. Ily módon 0,30 g (hozam: 65%) terméket kapunk.

^{1}H–NMR-spektrum (CD_3OD), delta:

7,50–7,30 (5H, m), 4,81 (2H, s; a víz jele alatt), 4,36 (1H, t, J=7,6 Hz), 3,98 (1H, d, J=6,1 Hz), 2,72 (1H, m), 2,67 (3H, s), 1,85–1,43 (12H, br m), 1,38–1,10 (4H, br m) és 0,88 (6H, m).

i) lépés

N^2-[3S-Hidroxi-4-(N-hidroxi-amido)-2R-izobutil-szukcinil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amid

1,0 g (2,16 mmol) N^2-[4-(N-benziloxi-amido)-2S-hidroxi-2R-izobutil-szukcinil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metil-amidot feloldunk 100 ml etanolban, az oldathoz hozzáadunk 100 mg 10%-os csontszenes palládiumot, és az elegyet hidrogénatmoszféra alá helyezzük. 4 óra múlva a katalizátort kiszűrjük, és az oldószert ledesztilláljuk. Ily módon 650 mg (1,75 mmol, hozam: 81%) cím szerinti vegyületet kapunk.

^{1}H–NMR-spektrum (CD_3OD), delta:

4,35 (1H, t, J=7,6 Hz), 3,99 (1H, d, J=6,4 Hz), 2,69 (4H, m és s), 1,80–1,50 (12H, br m), 1,40–1,10 (4H, br m) és 0,89 (6H, m).

^{13}C–NMR-spektrum (CD_3OD), delta:

175,6, 175,3, 171,5, 72,9, 52,4, 40,2, 39,2, 35,2, 34,9, 33,2, 30,9, 27,6, 27,4, 27,1, 26,9, 26,3, 23,7 és 22,1.

Analízis a $C_{18}H_{33}N_3O_5$ képlet alapján:

számított: C: 58,20, H: 8,95, N: 11,31;

talált: C: 58,27, H: 8,93, N: 11,20%.

2. példa

2S-Hidroxi-3R-[1S-(terc-butil-karbamoil)-2,2-dimetil-propil-karbamoil]-5-metil-hexán-hidroxámsav előállítása

a) lépés: 2S-hidroxi-3R-izobutenil-bután-1,4-dionsav-diizopropil-észter előállítása

500 ml száraz tetrahidrofuránban oldott LDA-hoz (amelyet 80 ml (570 mmol) N,N-diizopropil-aminból és 48,1 ml (481 mmol) 10 mólos n-butil-lítiumból állítunk 50 g (230 mmol) 2S-hidroxi-bután-1,4-dionsav-diizopropil-észtert adunk, miközben a hőmérsékletet –70 C°-on tartjuk. Az addíció befejeztével az elegyet 15 C°-ra melegítjük fel, és ezen a hőmérsékleten 8 órán át kevertetjük. Ezután a keverék hőmérsékletét –70 C°-ra csökkentjük, és lassan 46 g (252 mmol) metallil-jodidot adunk hozzá, miközben ügyelünk arra, hogy a hőmérséklet ne emelkedjen –65 C° fölé. Az elegyet –40 C°-ig melegítjük, 18 órán át kevertetjük, majd a reakciót –15 C°-on citromsav hozzáadásával állítjuk meg. A szerves fázist elkülönítjük, 500 ml 10%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és 300 ml sós vízzel mossuk, majd vízmentes magnézium-szulfát fölött szárítjuk. Az oldatot leszűrjük és vákuumban bepároljuk, végtermékként 64 g barna olajszerű anyagot kapunk, amelyet oszlopkromatográfiával tisztítunk (1 kg szilikagél, elúciós gradiens: 20→35% dietil-éter hexánban). A kívánt terméket 30,9 g-nyi színtelen olajként választjuk el amely a vizsgálatok alapján 17:1 arányú diasztereomer keveréknek bizonyult (kitermelés: 49%).

^{1}H–NMR ($CDCl_3$, fő diasztereomer):

δ=5,06 (1H, szeptett, J=6,3 Hz), 4,97 (1H, szeptett, J=6,3Hz), 4,78 (2H, d, J=7,1 Hz), 4,16 (1H, m), 3,20 (1H, d, J=6,2 Hz), 3,00 (1H,m), 2,50, 2,35 (2H, ABX, J=7,0, 8,7, 14,4), 1,72 (3H, s), 1,24–1,16 (12H, m)

b) lépés: 2S-hidroxi-3R-izobutil-bután-1,4-dionsav-diizopropil-észter előállítása

7,14 g (26,2 mmol) 2S-hidroxi-3R-izobutenil-bután-1,4-dionsav-diizopropil-észtert 80 ml etanolban oldunk, és az oldatot egy éjszakán át 1 g, 10%-os, csontszénre felvitt palládiumkatalizátorral hidrogénezzük 10^5 Pa nyomás alatt. A katalizátort szűréssel eltávolítjuk, majd a szűrletet szárazra párolva a 7,03 g-nyi terméket tiszta olaj formájában kapjuk meg (kitermelés: 98%)

^{1}H–NMR ($CDCl_3$):

δ=5,06 (1H, szeptett, J=6,3 Hz), 4,97 (1H, szeptett, J=6,3Hz), 4,17 (1H, br, s), 3,24 (1H, br, s), 2,83 (1H, m), 1,68 (2H, m), 1,44 (1H, m), 1,24 (6H, d, J=6,2Hz), 1,18 (6H, d, J=6,2Hz), 0,89 (6H, m)

c) lépés: 2S-hidroxi-3R-izobutil-bután-1,4-dionsav előállítása

7,0 g (25,6 mmol) 2S-hidroxi-3R-izobutil-bután-1,4-dionsav-diizopropil-észtert 15 ml dioxán és 15 ml víz elegyében oldunk, majd az így kapott oldathoz 4,29 g kálium-hidroxid 22 ml vízzel készített oldatát adjuk, és a keveréket egy éjszakán keresztül 90 C°-on tartjuk. Ezután hagyjuk lehűlni, majd ioncserélő gyantán (Dowex 50X4-400, 200 ml) engedjük át, majd bepárlás után 4,82 g cím szerinti terméket kapunk (kitermelés: 99%).

^{1}H–NMR ($CDCl_3$):

δ=8,70 (2H, br, s), 4,32 (1H, br, s), 3,10 (1H, m), 1,85–1,55 (3H, m), 0,96 (6H, m)

d) lépés: 2R-(2,2-dimetil-4-oxo-1,3-dioxalan-5S-il)-4-metil-pentánsav előállítása

5,19 g (27,3 mmol) 2S-hidroxi-3R-izobutil-bután-1,4-dionsavat 150 ml 2,2-dimetoxi-propán és 40 ml dimetil-formamid elegyében oldunk, és az így kapott oldatot katalitikus mennyiségű p-toluolszulfonsav jelenlétében 30 °C-on egy éjszakán át kevertetjük. Az oldószer eltávolítása után 6,87 g nyers, oldószerrel szennyezett terméket kapunk.

^{1}H–NMR ($CDCl_3$):

δ=4,41 (1H, d, J=4,8Hz), 2,91 (1H, m), 1,69 (3H, m), 1,54 (3H, s), 1,48 (3H, s) 0,88 (6H, m)

e) lépés: 2R-(2,2-dimetil-4-oxo-1,3-dioxalan-5S-il)-4-metil-pentánsav-petafluor-fenil-észter

558 mg (2,4 mmol) 2R-(2,2-dimetil-4-oxo-1,3-dioxalan-5S-il)-4-metil-pentánsavat 2 ml diklór-metánnal keverünk el, majd a keveréket 0 C°-ra hűtjük, és 670 mg (3,6 mmol) pentafluor-fenolt és 560 mg (2,9 mmol) EDC-t adunk hozzá. Az így kapott elegyet 0 C°-on 2 órán át kevertetjük, majd 50 ml 1 mólos nátrium-karbonáttal és 20 ml sós vízzel mossuk. A szerves fázist vízmentes magnézium-szulfát fölött szárítjuk, leszűrjük, majd szárazra pároljuk, és oszlopkromatográfiával (szilikagél, diklór-metán) tisztítjuk, amelynek eredményeképpen 552 mg cím szerinti, aktivált észtert kapunk (kitermelés: 58%).

^{1}H–NMR ($CDCl_3$):
δ=4,57 (1H, d, J=6,5Hz), 3,32 (1H, m), 1,86 (3H, m), 1,67 (3H, s), 1,03 (6H, m)

f) lépés: N^a-terc-butoxi-karbonil-L-terc-leucin-N-terc-butil-amid előállítása

15,60 g (72,5 mmol) N^a-terc-butoxi-karbonil-L-terc-leucint 200 ml diklór-metánban oldunk, az oldatot 0 C°-ra hűtjük, és kevertetés közben 14,67 g (79,7 mmol) pentafluor-fenolt, majd 15,28 g (79,7 mmol) EDC-t adunk hozzá. A keveréket hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni, egy órán át kevertetjük, majd visszahűtjük 0 C°-ra. Ezután a kapott elegyhez cseppenként 13,2 g (181,2 mmol) terc-butil-amint adunk, hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni, majd további 3 órán át kevertetjük. A képződő fehér szilárd anyagot szűréssel gyűjtjük össze, diklór-metánban oldjuk, és 1 mólos nátrium-karbonát-oldattal, 1 mólos sósavval és végül sós vízzel mossuk és vízmentes magnézium-szulfát fölött szárítjuk. Az oldatot leszűrjük, és olajjá pároljuk be, amely etil-acetáttal összekeverve kikristályosodik. A keveréket lehűtjük, a keletkező szilárd anyagot leszűrjük, majd hideg etil-acetáttal mossuk, 8,04 g végterméket kapva (kitermelés: 41%).

^{1}H–NMR ($CDCl_3$):
δ=5,47 (1H, s), 5,21 (1H, br, d), 3,64 (1H, d, J=9,3Hz), 1,42 (9H, s), 1,33 (9H, s), 0,97 (9H, s)

g) lépés: L-terc-leucin-N-terc-butilamid-trifluor-acetát só előállítása

Az f) lépésében előállított vegyület 8,00 g-ját (27,9 mmol) 7 ml diklór-metán és 7 ml trifluor-ecetsav elegyében oldjuk, és a kapott oldatot egy éjszakán keresztül 4 °C-on tároljuk.

Az oldószereket csökkentett nyomáson eltávolítjuk, és a maradékot dietil-éterrel keverjük el. A képződő fehér csapadékot szűréssel választjuk le, dietil-éterrel mossuk, és nagy vákuumban szárítjuk.

^{1}H–NMR ($CDCl_3$):
d=3,45 (1H, s), 1,37 (9H, s)

h) lépés: N^a-[2R-(2,2-dimetil-4-oxo-1,3-dioxolán-5S-il)-4-metil-pentanoil]-L-terc-leucin-N-terc-butilamid előállítása

A g) lépés szerint előállított vegyület 3,60 g-ját 2 ml dimetil-formamidban oldjuk, a kapott oldatot 0 C°-ra hűtjük és kevertetés közben 1,21 g (12,0 mmol) NMM-et adunk hozzá. További 10 perc elteltével az elegyhez az e) lépésben előállított vegyület 15,0 g-ját (12,6 mmol) adjuk. A kapott elegyet 30 percen keresztül 0 C°-on majd 60 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetjük. Az oldószereket csökkentett nyomáson eltávolítjuk, a maradékot diklór-metánnal vesszük fel, és 1 mólos nátrium-karbonát-oldattal és sós vízzel mossuk. A szerves fázist vízmentes magnézium-szulfát fölött szárítjuk, majd bepároljuk, amelynek eredményeképpen fehér szilárd anyagot kapunk, amelyet hexánnal elegyítve és leszűrve 3,36 g végtermékhez jutunk (kitermelés: 70%).

^{1}H–NMR ($CDCl_3$):
δ=6,44 (1H, d, J=8,7 Hz), 5,46 (1H, s), 4,46 (1H, d, J=6,5 Hz), 4,03 (1H, d, J=9,3 Hz), 2,70 (1H, m), 1,64 (2H, m), 1,62 (3H, s), 1,33 (9H, s), 0,92 (3H, d, J=6,3 Hz)

i) lépés: 2S-hidroxi-3R-[1S-(terc-butil-karbamoil)-2,2-dimetil-propil-karbamoil]-5-metil-hexán-hidroxámsav előállítása

2,32 g (33,5 mmol) hidroxilamin-hidrokloridot 50 ml metanolban oldunk, majd az így kapott oldathoz 1,81 g (33,5 mmol) vízmentes nátrium-metoxidot adunk, és a kapott anyagot szobahőmérsékleten 2 órán át kevertetjük. A megmaradt szilárd anyagot szűréssel eltávolítjuk, és a szűrletet kevertetés mellett, cseppenként, 3,33 g (8,4 mmol) N^2-[2R-(2,2-dimetil-4-oxo-1,3-dioxolan-5S-il)-4-metil-pentanoil]-L-terc-leucin-N-terc-butilamid minimális mennyiségű metanollal készített hűtött (0 °C-os) oldatát adjuk. A kapott elegyet 0 C°-on további 10 percig, majd egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertetjük. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk, és a maradékot 60 ml dietil-éterrel és 15 ml vízzel osztjuk meg. A szerves fázist elválasztjuk, vízmentes magnézium-szulfát fölött szárítjuk, szűrjük, és szilárd anyaggá pároljuk be, amelyet egy kisebb léptékű (5,2 mmolos) reakció termékével egyesítünk. Oszlopkromatográfiával (savval mosott szilika, gradiens elúció 5%-os metanolos diklór-metánnal) 2,49 g cím szerinti vegyülethez jutunk fehér, szilárd anyag formájában (kitermelés: 71%)

^{1}H–NMR (CD_3OD):
δ=4,16 (1H, s), 3,98 (1H, d, J=6,5 Hz), 2,82 (1H, m), 1,55 (2H, br, m), 1,29 (9H, s), 1,22 (1H, m), 0,96 (9H, s), 0,89 (3H, d, J=6,4 Hz), 0,85 (3H, d, J=6,4 Hz)

^{13}C–NMR ($CDCl_3$)
δ=174,7, 169,7, 168,7, 72,8, 61,3, 51,7, 45,5, 39,2, 34,7, 28,5, 26,7, 25,8, 22,8

Elemanalízis: $C_{18}H_{35}N_3O_5.0{,}2\ H_2O$
számított: C=57,33 H=9,46 N=11,14
mért: C=57,38 H=9,35 N=10,78

3. példa

2S-Hidroxi-3R-[1S-(N,N-dimetil-karbamoil)-2,2-dimetil-propil-karbamoil]-5-metil-hexán-hidroxámsav előállítása

A vegyületet a 2. példában leírt módszer szerint eljárva állítjuk elő.

^{1}H–NMR (CD_3OD):
δ=4,85 (1H, s), 4,01 (1H, d, J=6,5 Hz), 3,14 (3H, s), 2,90 (3H, s), 2,83 (1H, m), 1,59 (1H, m), 1,28 (H, m), 0,97 (9H, s), 0,87 (6H, m)

^{13}C–NMR d (CD_3OD):
δ=175,6, 173,2, 171,4, 73,2, 56,1, 56,0, 49,3, 39,8, 38,9, 36,3, 36,1, 27,0, 23,5, 22,5

Elemanalízis: $C_{16}H_{31}N_3O_5.0{,}2\ H_2O$
számított: C=55,06 H=9,07 N=12,04
mért: C=55,11 H=8,92 N=12,06

4. példa

N^2-[3S-Hidroxi-4-(N-hidroxi-amido)-2R-izobutil-szukcinil]-L-tercier-leucin-N^1-metil-amid

[(XV) képletű vegyület]

A cím szerinti vegyületet az 1. példában leírttal analóg módon eljárva, és L-tercier-leucin-N-metil-amidot használva állítjuk elő.

^{1}H–NMR-spektrum (CD_3OD), delta:
4,17 (1H, s), 4,00 (1H, d, J=5,6 Hz), 2,81 (1H, m), 2,69 (3H, s), 1,65–1,44 (2H, br m), 1,29–1,21 (1H, br m), 0,95 (9H, s), 0,88 (3H, d, J=6,5 Hz) és 0,86 (3H, d, J=6,5 Hz).
^{13}H–NMR-spektrum (CD_3OD), delta:
175,4, 173,2, 171,5, 73,0, 62,1, 39,8, 35,4, 27,2, 26,9, 26,0, 23,5 és 22,4.
Analízis a $C_{15}H_{29}N_2O_5$ képlet alapján:
számított: C: 54,36, H: 8,82, N: 12,68;
talált: C: 54,36, H: 8,74, N: 12,73%.

1. biológiai vizsgálati példa

A jelen találmány szerinti vegyületeknek mint a kollagenáz enzim inhibitorainak hatékonyságát Cawston és Barrett módszerével [Anal. Biochem., *99,* 340–345. (1979)] határozzuk meg, e közleményre itt utalunk. A meghatározást úgy végezzük, hogy a vizsgált vegyület 1 mmol-os oldatát, vagy ennek hígított változatát [5 mmol kalcium-kloridot, 0,05% Brij 35-öt (polietilénglikol-dodecil-étert) és 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 25 mmol-os Hepes [4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-etánszulfonsav]-oldattal (pH=7,5)] pufferolt kollagénnel és kollagenáz enzimmel 16 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Kollagénként ^{14}C-izotóppal jelzett, acetilezett kollagént használunk, amelyet Cawston és Murphy módszerével [Methods in Enzymology, *80,* 711. (1981)] állítunk elő, e közleményre itt utalunk. Az inkubálás után az emésztetlen kollagén kiülepítése céljából a mintákat centrifugáljuk, és a radioaktív felülúszó egy meghatározott térfogatú részletében szcintillációs számlálóval meghatározzuk a minta radioaktivitását, amely jellemző a hidrolízis mértékére. A vizsgált vegyület 1 mmol-os koncentrációja vagy ennek hígított változata jelenlétében mért kollagenázaktivitást összehasonlítjuk a gátló anyag nélkül végzett kontrollkísérletben mért aktivitással. Az alábbiakban megadjuk a gátlóanyag azon koncentrációját, amely a kollagenáz aktivitását felére csökkenti (IC_{50}).

A jelen találmány szerinti vegyületeknek mint a stromelizin enzim inhibitorainak hatékonyságát Cawston és munkatársai módszerével [Biochem. J., *195,* 159–165. (1981)] határozzuk meg, e közleményre itt utalunk. A meghatározást úgy végezzük, hogy a vizsgált vegyület 1 mmol-os oldatát, vagy ennek hígított változatát [5 mmol kalcium-kloridot, 0,05% Brij 35-öt (polietilénglikol-dodecil-étert) és 0,02% nátrium-azidot tartalmazó, 25 mmol-os Hepes [4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-etánszulfonsav]-oldattal] pufferolt stromelizinnel és ^{14}C-izotóppal jelzett, acetilezett kazeinnel 16 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Kazeinként ^{14}C-izotóppal jelzett, acetilezett kazeint használunk, amelyet a Cawston és munkatársai fent idézett közleményében leírt módon állítunk elő. A vizsgált vegyület 1 mmol-os koncentrációja vagy ennek hígított változata jelenlétében mért stromelizin aktivitást összehasonlítjuk a gátlóanyag nélkül végzett kontrollkísérletben mért aktivitással. Az alábbiakban megadjuk a gátlóanyag azon koncentrációját, amely a stromelizin aktivitását felére csökkenti (IC_{50}).

Az alábbiakban megadjuk az 1. és 4. példa szerinti vegyületeknek a fenti tesztekben mért hatékonyságát, az EP–A–236872 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés (Roche) 13. és 27. példája szerinti vegyületeknek ugyanezen tesztben mért hatékonyságával összehasonlítva, e korábbi vegyületek:
[4-(N-hidroxi-amido)-2(R)-izobutil-szukcinil]-L-leucil-L-alanin-etil-észter és a
[4-(N-hidroxi-amido)-3(S)-ftaloil-amino-butil-2(R)-izobutil-szukcinil]-L-leucil-glicil-etil-észter.

A fenti vegyületek közül az elsőként említett vegyületet (amelyet a továbbiakban C1-vegyületként említünk) azért választottuk összehasonlító anyagnak, mert azon kollagenázgátló anyagok közül, amelyeknek a hatékonyságát az EP–A–236872 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés megadja, ez a vegyület a leghatékonyabb. A fenti vegyületek közül másodikként említett vegyületet (amelyet a továbbiakban C2-vegyületként említünk) pedig azért választottuk összehasonlító anyagnak, mert azon kollagenázgátló anyagok közül, amelynek hatékonyságát az EP–A– 236872 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés megadja, ez az egyetlen olyan származék, amely a jelen találmány szerinti vegyületekben jelenlevő hidroxilcsoporttal egyenértékű helyzetben helyettesítőt visel.

EREDMÉNYEK

Vegyület (példa száma)	Kollagenáz IC_{50}	Stromelizin IC_{50}
1.	5	60
4.	8	200
C1-vegyület	15	300
C2-vegyület	7	70

2. biológiai vizsgálati példa

A jelen találmány szerinti vegyületeket beadjuk kísérleti állatoknak, és mérjük a vegyületek vérszintjének időbeli lefutását.

A vizsgált vegyületeket csoportonként hat-hat hím, 300 g testtömegű patkánynak, gyomorszondán keresztül adjuk be. Az állatok farokvénájából 0,5, 1,0, 2,0, 6,0 és 24 órával a vegyületek beadása után vérmintákat veszünk. 0,4 ml térfogatú vérmintákat 4,5 ml térfogatú, alvadásgátlóként 0,1 ml citromsavas dextrózoldatot tartalmazó kémcsövekbe teszünk. A hatóanyag kivonatolása céljára a mintákhoz 3-3 ml metanolt adunk, és a kicsapott vért 30 percig 3000 fordulat/perc fordulatszámmal centrifugáljuk. A felülúszókból 2-2 ml térfogatú mintákat kiveszünk, és fagyasztva szárítjuk. A kapott kivonatokat 200 µl dimetil-szulfoxidban újra feloldjuk, és az oldatok 10 µl térfogatú részletében meghatározzuk a kollagenázgátló aktivitást. A kivonatok gátló aktivitását a fenti első biológiai vizsgálati példában leírt kollagenázmeghatározási módszerrel mérjük ki, és a gátló anyag (vagyis a hatóanyag és aktív metabolitjai) koncentrációját a standard görbékkel való összehasonlítás útján kapjuk meg. Az eredményeket az alábbi értékek formájában adjuk meg: csúcskoncentráció (ng/ml); görbe alatti terület (ng/ml×óra) az első 6 óra alatt; vala-

mint a görbe alatti terület, mint az IC_{50}-érték többszöröse × óra egységekben kifejezve.

A fenti 1–10. példa szerinti vegyületeket összehasonlítjuk a C1- és C2-vegyülettel.

EREDMÉNYEK

Vegyület (Példa száma)	Csúcskoncentráció, ng/ml	AUC (görbe alatti terület, 0–6 óra) ng/ml × óra	AUC (görbe alatti terület, 0–6 óra) n.IC_{50} × óra
1.*	59; 0,5 óra	143,25	46,2
4.	139; 0,5 óra	343	190
C1-vegyület	25; 0,5 óra	91,7	7,4
C2-vegyület	1; 1 óra	5,3	2,12

*=2 mérés átlaga

3. biológiai vizsgálati példa

A fenti 1. példa szerinti vegyület és a C1 jelzésű összehasonlító vegyület (lásd a fenti 1. biológiai vizsgálati példát) aktivitását adjuvánssal kiváltott ízületi gyulladásos modellben is meghatározzuk.

Hím Lewis-patkányokon (Charles River) adjuváns ízületi gyulladást hozunk létre oly módon, hogy egyszeri intradermális (bőrbe adott) injekcióval 0,75 mg Mycobacterium butyricumot adunk be könnyű paraffinolajban (Freund-féle teljes adjuváns) az állatok farkának alsó részébe. A másodlagos károsodások 10 napos késleltetési idő után alakulnak ki, ez az állatok hátsó lábának gyulladásában nyilvánul meg. A kialakuló ödéma mértékét térfogatméréses módszerrel, vízkiszorítással mérjük. A vizsgált vegyületeket a 13. naptól a 17. napig, naponta kétszer adjuk be. Az állatok hátsó lábának térfogatát a 20. napon is lemérjük, és összehasonlítjuk a 13. napon mért értékkel. A kísérletet a 23. napon fejezzük be.

A 20. napon mért érték alapján a 10 mg/kg dózisban beadott, 1. példa szerinti vegyület a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns módon ($p<0,01$) csökkenti a duzzadás mértékét, ezzel szemben a C1-vegyület hatástalan.

4. biológiai vizsgálati példa

A fenti 1. példa szerinti vegyület aktivitását in vivo patkány emlőrák modellen is vizsgáljuk. Meghatározzuk az állatok tüdejében a daganatsejttelepek képződését, ezzel arra keresünk választ, hogy az 1. példa szerinti vegyület orálisan (szájon át) beadva hatékonyan meg tudja-e gátolni azt a folyamatot, amikor HOSP1.P emlőráksejtek a tüdőben daganatsejttelepeket képeznek. A kísérletet úgy végezzük, hogy 12-12 patkányból álló két állatcsoportnak, az állatok nyaki vénájába adott injekció formájában HOSP1.P-sejteket (állatonként 1×10^5 sejtet) adunk be. Az 1. példa szerinti vegyületet orálisan, 30 mg/kg dózisban az egyik csoport állatainak adagoljuk, mégpedig a −4, +1, +6, +24 és +72 óra időpontban (a daganatsejtek bevitelét tekintjük 0 órának). A második (kontroll) csoportnak csak a vivőanyagot adjuk be orálisan, ugyanilyen időbeli eloszlásban. 34 nap múlva az állatokat leöljük, tüdejüket kivesszük, 24 órán át Methacarn segítségével fixáljuk (rögzítjük), és a daganatokat egyenként megszámoljuk. A tüdőn kívül nem találunk daganatokat. Az 1. példa szerinti vegyülettel való kezelés hatására a kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan csökken a tüdőben kialakuló daganatsejttelepek száma ($p<0,01$, Mann–Whitney, kétoldalú teszt).

EREDMÉNYEK

(A tüdőben képződő daganatsejttelepek száma)

Csoport	Átlag	Standard szórás		Középérték
Kontroll	70,50	27,74	71,50	–
Kezelt	38,91	12,49	38,50	<0,01

5. biológiai vizsgálati példa

Megvizsgáljuk, milyen mértékben képesek a jelen találmány szerinti vegyületek a tumor nekrózis faktor felszabadulását gátolni. A meghatározás azon alapszik, hogy a forbol-mirisztát-acetát (PMA) serkenti a tumornekrózis faktor alfa felszabadulását egy U937 jelzésű humán monocita (egymagvú falósejt) sejtsor sejtjeiből.

A vizsgálatot úgy végezzük, hogy 5% borjúmagzatszérumot tartalmazó RPMI 1640 közegben tenyésztett U937 sejteket 5 percig 1000 × g gyorsulással centrifugálunk, majd a kiülepített sejtekből a fenti közeggel 2×10^6 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítünk, 1 ml sejtszuszpenziót egy 24-lyukú mikrotitráló lemez mélyedéseibe szétosztunk. A vizsgált vegyületekből dimetil-szulfoxiddal 100 mmol koncentrációjú törzsoldatot készítünk, majd RPMI 1640 közeggel a kívánt ötvenszeres végső hígításra hígítjuk. A vegyületek hígított oldatából 20-20 µl-t két – két, U937 sejtet tartalmazó mélyedésbe mérünk. A tumor nekrózis faktor felszabadulását úgy indítjuk be, hogy a sejtekhez forbol-mirisztát-acetátot adunk, ennek végső koncentrációja: 50 nanomol. Megfelelő kontrollmintákat is készítünk (2-2 párhuzamos). A lemezeket 18 órán át 5% szén-dioxid jelenlétében 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd 5 percig 1000 × g gyorsulással centrifugáljuk. A tumor nekrózis faktor alfa szintjét a tenyészetek felülúszójában egy, a tumor nekrózis faktor alfára specifikus ELISA kittel (British Bio-technology Products Limited, Abingdon, Anglia) mérjük.

Meghatározzuk a vizsgált vegyületeknek azt az átlagos koncentrációját, amely a tumor nekrózis faktor alfa felszabadulását a kontrolltenyészethez képest 50%-kal csökkenti. A fenti 1., 2., 5. és 10. példa szerinti vegyület hatékonyságát meghatározva IC_{50}-értékük 50 µmolnál kisebbnek adódik.

Vízoldhatósági példa

Meghatározzuk a jelen találmány szerinti vegyületek szobahőmérsékleten mérhető vízoldhatóságát, és a kapott értékeket összehasonlítjuk az első biológiai vizsgálati példában bemutatott C1- és C2-jelzésű összehasonlító vegyületek oldhatóságával.

EREDMÉNYEK

Vegyület (példa száma)	Oldhatóság, mg/ml
1.	0,1
4.	1,4
C1-vegyület	0,3
C2-vegyület	<0,1

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Az (I) általános képletű vegyületek, ahol
R_2 jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport,
R_3 jelentése ciklohexil-metil- vagy terc-butil-csoport,
R_4 jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport, és
R_5 jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,
valamint ezek sói, szolvátjai vagy hidrátjai.

2. Az 1. igénypont szerinti vegyületek, ahol
a hidroxicsoportot és a hidroxámsavláncot viselő szénatom S konfigurációjú,
az R_2 csoportot viselő szénatom R konfigurációjú, és
az R_3 csoportot viselő szénatom S konfigurációjú.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyületek, amelyekben R_3 jelentése terc-butil-csoport.

4. A 3. igénypont szerinti vegyületek, ahol R_5 jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport.

5. Az 1. igénypont szerinti N^2-[3S-hidroxi-4-(N-hidroxi-amido)-2R-izobutil-szukcinil]-L-ciklohexil-alanin-N^1-metilamid vagy ennek sója, szolvátja vagy hidrátja.

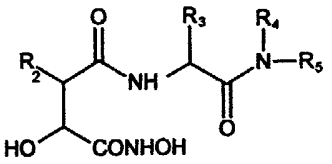
6. Az 1. igénypont szerinti N^2-[3S-hidroxi-4-(N-hidroxi-amido)-2R-izobutil-szukcinil]-L-terc-leucin-N^1-metilamid vagy ennek sója, szolvátja vagy hidrátja.

7. Az 1. igénypont szerinti 2S-hidroxi-3R-[1S-(terc-butil-karbamoil)-2,2-dimetil-propil-karbamoil]-5-metil-hexán-hidroxámsav vagy ennek sója, szolvátja vagy hidrátja.

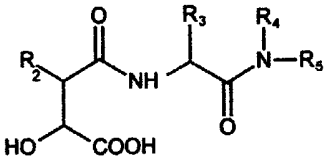
8. Az 1. igénypont szerinti 2S-hidroxi-3R-[1S-(N,N-dimetil-karbamoil)-2,2-dimetil-propil-karbamoil]-5-metil-hexán-hidroxámsav vagy ennek sója, szolvátja vagy hidrátja.

9. Az (I) általános képletű vegyületeket, vagy ezek gyógyászatilag elfogadható sóit, szolvátjait vagy hidrátjait, ahol
R_2 jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport,
R_3 jelentése ciklohexil-metil- vagy terc-butil-csoport,
R_4 jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport, és
R_5 jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,
valamilyen gyógyászatilag vagy állatgyógyászatilag elfogadható segédanyaggal vagy hordozóval együtt tartalmazó gyógyászati vagy állatgyógyászati készítmény.

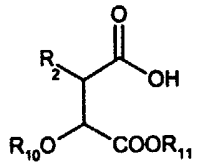
10. Eljárás az 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyületek előállítására, *azzal jellemezve,* hogy egy (II) általános képletű vegyületet, ahol R_2, R_3, R_4 és R_5 jelentése a fenti vagy annak valamely védett és/vagy aktivált származékát hidroxilaminnal, O-védett hidroxilaminnal, vagy ezek sójával reagáltatjuk, majd a kapott hidroximsav-származékból, adott esetben a védőcsoportokat eltávolítjuk, majd kívánt esetben a keletkező (I) általános képletű vegyületet sójává, szolvátjává vagy hidrátjává alakítjuk, és ilyen formában izoláljuk.



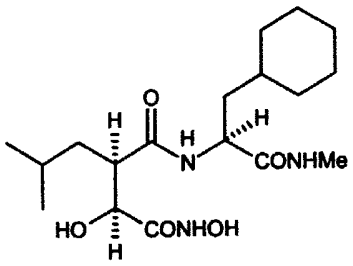
(I)



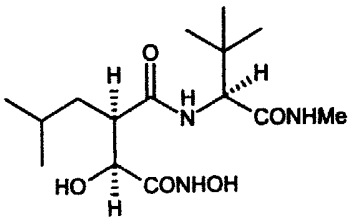
(II)



(III)



(VI)



(XV)

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest