

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 961976 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **961976**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 5/06

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **10.11.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **09.05.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **09.05.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **10.11.1994 PCT/GB1994/002471**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

10.11.1993 GB 9323165

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Darwin Discovery Limited, Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Montana, John, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)

2 • Owen, David Alan, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)

3 • Dickens, Jonathon, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)

4 • Baxter, Andrew Douglas, Cambridge CB4 4WE, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Peptidyyliyhdisteitä ja niiden terapeuttinen käyttö metalloproteinaasi en inhibiittoreina

Peptidylföreningar och deras terapeutisk användning som metalloprotein asinhibitorer

Peptidyyliyhdisteitä ja niiden terapeuttinen käyttö metalloproteinaasien inhibiittoreina

Keksinnön alue

5 Tämä keksintö koskee uutta luokkaa peptidyylijohdannaisia, menetelmiä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttöä lääkkeissä.

Keksinnön tausta

10 Normaalissa kudoksessa sidekudossolusynteesin vastapainona on solunulkoisen sidekudoksen perusaineen (matriksi) hajoaminen, jotka molemmat vastakkaiset vaikutukset ovat dynaamisessa tasapainossa. Matriksin hajoaminen tapahtuu olemassa olevista sidekudossoluista vapautuvien proteinaasien ja tunkeutuvien tulehdussolujen vaikutuksesta ja johtuu osittain vähintään kolmen metalloproteinaasiryhmän aktiivisuudesta. Nämä ovat kollagenaasit (välikollagenaasi, MMP-1; PMN-kollagenaasi, MMP-8) gelatinaasit (gelatinaasi A, MMP-2, 72kDa-gelatinaasi, tyypin IV kollagenaasi; gelatinaasi B, MMP-9, 92kDa-gelatinaasi, tyypin 20 IV kollagenaasi) ja stromelysiinit (proteoglykanaasi, MMP-3, stromelysiini-1, transiini, stromelysiini-2, MMP-10; stromelysiini-3, MMP-11). Normaalisti näiden katabolisten entsyymien synteesi- ja erittymistasot ja myös niiden solunulkoisen aktiivisuus on tarkasti säänneltyä, joka viimeksi mainittu säätely tapahtuu sellaisten spesifisten inhibiittorien, kuten TIMP-inhibiittorien (metalloproteinaasien kudoshinhibiittorit) vaikutuksesta, jotka muodostavat inaktiivisia komplekseja metalloproteinaasien kanssa, ja yleisempien proteinaasi-inhibiittorien, kuten 25 α_2 -makroglobuliinin vaikutuksesta.

30 Sidekudoksen nopeutunut, kontrolloimaton hajoaminen solunulkoisen matriksin metalloproteinaasikatalysoitun resorption vaikutuksesta on tunnusomaisena piirteenä monissa sairaustiloissa, kuten nivelreumassa, luumivaltulehduksessa, septisessä nivelvauriossa, sarveiskalvon,

5 orvaskeden tai mahalaukun haavaumissa, kasvainten metas-
 taaseissa tai invaasiassa, hampaan ympäriskudoksen tau-
 deissa, valkuaisvirtsaaisuudessa, ateroskleroottisten plak-
 kien repeytymän yhteydessä esiintyvässä sepelvaltimotukok-
 10 sessa ja luusairaudessa. Inhibiittorit voivat olla myös
 käyttökelpoisia estämään traumaattisten vammojen seuraauk-
 sena olevia patologisia ilmiöitä, jotka voisivat johtaa
 pysyvään vammautumiseen. Näillä yhdisteillä saattaa olla
 15 myös käyttöä syntyvyyden säännöstelyssä estämällä mu-
 nasolun irtomisen tai kiinnittymisen. Voidaan odottaa, että
 tällaisten tautien syntytapaa voidaan muuntaa edullisella
 tavalla antamalla lääkkeeksi metalloproteinaasi-inhibiit-
 toreita; tähän tarkoitukseen on ehdotettu lukuisia yhdis-
 teitä [yleinen katsaus: Wahl et al., Ann. Rep. Med. Chem.
 25, 175-184, Academic Press Inc., San Diego (1990)].

Aikaisemmin on kuvattu useita pieniä peptidinkal-
 taisia yhdisteitä, jotka estävät metalloproteinaaseja.
 Ehkä kaikkein huomattavin näistä koskee sellaista an-
 giotensiiniä muuttavaa entsyymiä (ACE), joka vaikuttaa
 20 estävästi decapeptidin, angiotensiini I:n muuttumisen an-
 giotensiini II:ksi, joka on vahvasti vaikuttava veren-
 painetta kohottava aine. Tämänäyttypisiä yhdisteitä on ku-
 vattu EP-hakemusjulkaisussa 0 012 401. Myös niitä lähellä
 25 olevilla merkaptamidipeptidyylijohdannaisilla on osoitet-
 tu olevan ACE-inhibiittoriaktiivisuutta in vitro ja in
 vivo (Weller et al. (1948) Biochem. Biophys. Res. Comm.
 125 (1), 82 - 89).

TNF on sytokiini, jota muodostuu alunperin soluas-
 sosioituna 28 kD:n prekursorina. Se vapautuu aktiivisena
 30 17 kD-muotona (Jue et al. (1990) Biochemistry 29, 8371 -
 8377), joka voi välittää suuren joukon vahingollisia vai-
 kutuksia in vivo. Eläimille tai ihmisille annostettuna se
 aiheuttaa tulehdusta, kuumetta, sydän-verisuonireaktioita,
 verenvuotoa, senkaltaisia koagulaatiovasteita ja akuuttien
 35 vaiheiden vasteita, joita havaitaan akuuttien infekti- ja

sokkitilojen aikana. Jatkuva annostus saattaa myös aiheuttaa kuihtumista ja anoreksiaa. Ylimääräisen TNF:n kertyminen voi aiheuttaa kuoleman.

5 Eläinmalleja tutkimalla on saatu huomattavasti todistusaineistoa siitä, että estämällä TNF:n vaikutukset spesifisillä vasta-aineilla voi auttaa akuuteissa infektioissa, sokkitiloissa, siirteiden hylkimisreaktioissa ja autoimmuunitaudeissa. TNF on myös autokriininen kasvuteki-
 10 jä joillekin luuydinkasvaimille ja imukudoskasvaimille ja voi toimia estävästi normaaliin punasolunmuodostukseen potilailla, joilla on näitä kasvaimia.

TNF:n tuottamisen tai vaikutuksen estämisellä ennustetaan siten olevan vahva terapeutinen teho useisiin tulehdus- ja tartuntatauteihin, immunologisiin tauteihin
 15 tai pahanlaatuisiin kasvaimiin. Näihin kuuluvat - joihin ei kuitenkaan rajoituta - verenmyrkytyssokki, hemodynaaminen sokki ja septinen oireyhtymä (Mathison et al. (1988) J. Clin. Invest. 81, 1925 - 1937; Miethe et al. (1992) J. Exp. Med. 175, 91 - 98), verettömyydenjälkeinen reperfuusio-
 20 sioaurio, malaria (Grau et al. (1989) Immunol. Rev. 112, 49 - 70); mykobakteeri-infektio (Barnes et al. (1992) Infect. Imm. 60, 1441 - 1446), aivokalvontulehdus, psoriaasi, verentungosta aiheuttava sydämen toiminnanvajavuus, sidekudostauti, kuihtuminen, siirteen hylkiminen, syöpä,
 25 autoimmuunitauti, nivelreuma, MS-tauti, säteilyvaurio, myrkytys seurauksena immunosuppressiivisten monoklonaalisten vasta-aineiden, kuten OKT3:n tai CAMPATH-1:n annostuksesta, liikahappisuuden aiheuttama keuhkorakkuloiden vaurio.

30 Nykyisin kliinisessä anti-TNF-strategiassa käytetään kortikosteroideja, kuten deksametasonia, ja syklosporiini-A:ta tai FK506:ta, jotka ovat sytokiinigeeni-transkription ei-spesifisiä inhibiittoreita. Fosfodiester-
 35 raasi-inhibiittorien kuten pentoksifilliinin on osoitettu olevan TNF-geenitranskription spesifisempiä inhibiittorei-

ta (Endres S. (1991), Immunol. 72, 56 - 60; Schandene et al. (1992), Immunol. 76, 30 - 34; Alegre et al. (1991), Transplantation 52, 674 - 679; Bianco et al. (1991), Blood 78, 1205 - 1221). Talidomidin on o myös osoitettu estävän leukosyyttien TNF:n tuottamista (Sampajo et al. (1991), J. Exp. Med. 173, 699 - 703). Kokeellisesti on osoitettu, että anti-TNF monoklonaaliset vasta-aineet, liukoiset TNF-reseptorit ja liukoiset TNF-reseptori/immunoadhesiinit spesifisesti estävät TNF-vaikutuksen tehoa (Bagby et al. (1991), J. Infect. Dis. 163, 83 - 88; Charpentier et al. (1991), Presse-med. 20, 2009 - 2011; Silva et al. (1990), J. Infect. Dis. 162, 421-427; Franks et al. (1991), Infect. Immun. 59 2609-2614; Tracy et al. (1987), Nature 330, 662 - 664; Fischer et al. (1992), PNAS USA, painossa; Lesslauer et al. (1991), Eur. J. Immunol. 21, 2883 - 2886; Ashkenazi et al. (1991), PNAS USA 88, 10535 - 10539).

Äskettäin on osoitettu, että TNF:n vaikutuksen välittäjänä on kaksi peptidiä, TNF-a ja TNF-b. Vaikka näiden peptidien homologisuus toistensa suhteen on vain 30 %, niin ne aktivoivat samoja reseptoreja ja niitä koodaavat välittömästi vieressä olevat geenit. Tässä käytettynä kasvaimen nekroositekijä (tumor necrosis factor) eli TNF tarkoittaa siten nekroositekijä a:ta ja peptidejä, joilla on TNF-a:n kanssa korkea-asteinen sekvenssihomologia tai olennaisesti samanlaiset fysiologiset vaikutukset kuin TNF-a:lla, esimerkiksi TNF-b:tä.

On osoitettu, että sellaiset yhdisteet, jotka pysyvät estämään sidekudoksen hajoamiseen vaikuttavien metalloproteinaasien, kuten kollagenaasin, stromelysiinin ja gelatinaasin vaikutusta, estävät TNF:n vapautumista sekä in vitro että in vivo (Gearing et al. (1994), Nature 370, 555 - 557; McGeehan et al. (1994), Nature 370, 558-561; WO 93/20 047). Kaikki nämä ilmoitetut inhibiittorit sisältävät hydroksaamihapposinkki-sideryhmän.

Kollagenaasia estäviä yhdisteitä on esitetty US-patenttijulkaisuissa 4 511 504 (julk. 16.04.1985) ja 4 568 666 (julk. 04.02.1986). Samankaltaisen rakenteen omaavia yhdisteitä, joiden ilmoitetaan estävän stromelysiiniä (proteoglykanaasi), on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 771 037 (julk. 13.09.1988).

Stromelysiini- ja kollagenaasi-inhibiittoreilla saattaa olla käyttöä septiseen niveltulehdukseen liittyvän nivelruston vaurioiden estämisessä. Nivelten bakteerinfektiot voivat aiheuttaa tulehdusvasteen, joka sitten voi säilyä yli sen, mitä tarvitaan tartunta-aineen poistamiseen, mistä on seurauksena rakennekomponenttien pysyvä vaurio. Eläinmalleissa on käytetty bakteeriatteita proteolyyttistä aktiivisuutta aiheuttavan nivelvasteen saamiseksi. Katso: Case et al. (1989), J. Clin. Invest. 84, 1731 - 1740; ja Williams et al. (1990) Arth. Rheum. 33, 533 - 541.

Stromelysiinin, kollagenaasin ja gelatinaasin inhibiittoreilla saattaa olla käyttöä kasvainten metastaasien kontrolloimisessa, mahdollisesti nykyisen kemoterapian ja/tai säteilyhoidon yhteydessä. Katso: Matrisian et al. (1986) PNAS USA 83, 9413-9417; Wilhelm et al. (1987), Ibid. 84, 6725-6729; Werb et al. (1989), J. Cell. Biol. 109, 872-889; Liotta et al. (1983), Lab. Invest. 49, 636 - 649; ja Reich et al., Metastasis, Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chicester, 1988, 193 - 210.

Erittyneiden proteinaasien, kuten stromelysiinin, kollagenaasin ja gelatinaasin merkitys saattaa olla tärkeä solujen liikkumiseen liittyvissä prosesseissa kasvainten etäpesäkkeiden invaasion aikana. Niinpä on myös todisteita siitä, että metalloproteinaasimatriksi on yli-ilmentynyt tietyissä metastaattisissa kasvainsolulinjoissa. Tällöin entsyymi toimii tunkeutumalla alla oleviin peruskalvoihin, jolloin kasvainsolut pääsevät karkuun primaarisesta kasvaimesta verenkiertoon. Kiinnittymisen jälkeen verisuonien

seinämiin kasvainsolut käyttävät samoja metalloproteinaaseja alla olevien peruskalvojen puhkaisemiseen ja tunkeutuvat muihin kudoksiin aiheuttaen siten kasvaimen etäpesäkkeitä. Tämän prosessin inhibitio estäisi etäpesäkkeiden muodostumista ja parantaisi nykyisten kemoterapeuttisilla aineilla ja/tai säteilyllä suoritettujen käsittelyjen tehoa.

Nämä inhibiittorit olisivat myös käyttökelpoisia hampaanympäryskudossairauksien kuten ientulehduksen kontrolloimiseen. Sekä kollagenaasiaktiivisuutta että stromelysiiniaktiivisuutta on löydetty tulehtuneista ikenistä peräisin olevista fibroblasteista (Uitto et al. (1981), J. Periodontal Res. 16, 417 - 424). Entsyymitasojen on osoitettu korreloivan iensairauden vakavuuden kanssa (Overall et al. (1987), J. Periodontal Res. 22, 81 - 88).

Alkalisyöpymisen seurauksena olevassa sarveiskalvon haavaumassa on myös havaittu proteolyyttisiä prosesseja (Brown et al. (1969), Arch. Ophthalmol. 81, 370 - 373).

Merkaptoryhmiä sisältävät peptidit estävät kaniinin alkalisyöpyneestä sarveiskalvosta eristettyä kollagenaasia (Burns (1989), Invest. Ophthalmol. 30, 1569 - 1575). Käsittelemällä alkalisyöpyneitä silmiä tai silmiä, joissa infektion seurauksena esiintyy sarveiskalvon haavautumista, näiden metalloendoproteinaasien inhibiittoreilla yhdistelmänä natriumsitraatin tai natriumaskorbaatin ja/tai antimikrobisten aineiden kanssa, saatetaan mahdollisesti estää sarveiskalvon hajoaminen.

Munuaisissa, joiden pääasiallisena tehtävänä on rajoittaa plasmaproteiinien kulkeutumista virtsaan, stromelysiinin on osoitettu vaikuttavan munuaiskerästen peruskalvon (glomerular basement membrane, GMB) rakennekomponenttien hajoamiseen (Baricos et al. (1989), Biochem. J. 254, 609 - 612). Munuaiskerässairauden seurauksena olevassa valkuaisvirtsaaisuudessa plasmaproteiinien lisääntyneen GMB-läpäisyn johdosta virtsa sisältää ylimäärin proteiini-

nia. GBM:n lisääntyneen läpäisykyvyn perimmäisiä syitä ei tunneta, mutta proteinaasit, mukaan lukien stromelysiini, saattavat olla tärkeänä tekijänä munuaiskerässairauksissa. Tämän entsyymin estäminen voi lievittää munuaisten toimintahäiriöön liittyvää valkuaisvirtsaaisuutta.

Stromelysiiniaktiivisuuden inhibitio saattaa estää sepelvaltimotukokseen johtavan ateroskleroottisten plakkien repeytymisen. Ateroskleroottisten plakkien repeytymisen tai hajoaminen on tavallisin tapahtuma, joka panee alulle sepelvaltimotukoksen. Proteolyyttisten entsyymien tai tulehdussolujen tunkeutumisen vapauttaman sytokineesin aiheuttamaa näitä plakkeja ympäröivän sidekudosmatriksin destabiloitumista ja hajoamista on ehdotettu plakkien repeytymisen syyksi.

Tällaisella plakkien repeytymisellä voi olla akuutti trombolyyttinen vaikutus veren virratessa nopeasti verisuonesta. Stromelysiini-RNA-lähetin korkeita tasoja on havaittu leikkauksen aikana sydämensiirtopotilaista poistettujen ateroskleroottisten tautiplakkien yksittäisissä soluissa (Henney et al. (1991) PNAS USA 88, 8154 - 8158). Stromelysiinin inhibitio näillä yhdisteillä saattaa auttaa ateroskleroottisia plakkeja stabiloivan sidekudosmatriksin hajoamisen estämisessä tai viivyttämisessä siten estäen tapahtumia, jotka johtavat akuuttiin sepelvaltimotukokseen.

Stromelysiinin ja kollagenaasin spesifiset inhibiittorit voivat olla käyttökelpoisia syntyvyydensäätelyaineina. On olemassa näyttöä siitä, että metalloproteiinien, mukaan lukien stromelysiini ja kollagenaasi, ilmentyminen havaitaan hedelmöittymättömissä munissa ja tsygoteissa ja myöhemmissä jakautumisvaiheissa ja että se lisääntyy sikiökehityksen alkiorakkulavaiheessa ja endodermisessä differentioitumisessa (Brenner et al. (1989) Genes & Develop. 3, 848-859). Analogisesti kasvaininvasiion kanssa alkiorakkula saattaa ilmentää metallopro-

teinaaseja, jotta se pystyisi tunkeutumaan kohdun solunulkoiseen matriksiin kiinnittymisen aikana. Stromelysiinin ja kollagenaasin inhibiointi näiden varhaisten kehitysprosessien aikana oletettavasti estäisi normaalin sikiökehityksen ja/tai alkion kiinnittymisen kohtuun. Tällainen estäminen saattaisi olla menetelmä syntyvyyden säätelyseen. Lisäksi on olemassa näyttöä siitä, että kollagenaasi on tärkeä tekijä ovulaatioprosessissa. Tässä esimerkissä munasolun täytyy vapautuakseen puhkaista munarakkulan kärkeosan peittävä kollageenisuoja. Kollagenaasia on havaittu esiintyvän tässä prosessissa ja sen inhibiittorin on osoitettu tehokkasti estävän munasolun irtoamista (Woessner et al. (1989), *Steroids* 54, 491 - 499). Stromelysiiniaktiivisuudella saattaa myös olla merkitystä munasolun irtoamisen aikana (Too et al. (1984), *Endocrin.* 115, 1043 - 1050).

Kollagenolyyttistä ja stromelysiiniaktiivisuutta on myös havaittu surkastumista aiheuttavassa rakkulaihotau-
dissa (Kronberger et al. (1982), *J. Invest. Dermatol.* 79, 208-211); Sawamura et al. (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1003 - 1008). Metalloendoproteinaasien eston tulisi rajoittaa ihon sidekudoskomponenttien nopeata tuhoutumista.

Rakennekomponentteja sisältävän solunulkoisen matriksin lisäksi stromelysiini voi hajottaa in vivo myös muita substraatteja, esimerkiksi α_1 -proteinaasi-inhibiittoria, ja voi siten vaikuttaa muiden proteinaasien, kuten elastaasin aktiivisuuteen (Winyard et al. (1991), *FEBS Letts.* 279 (1), 91-94). Metalloendoproteinaasien matriksin inhibiointi saattaa vahvistaa näiden endogeenisten inhibiittorien proteiinaasinvastaista aktiivisuutta.

Äskettäisistä julkaisuista ilmenee, että on identifioitu useita uusia MMP-lajin entsyymejä, joista joillakin voi olla merkitystä sairauksissa. Kollagenaasi 3:lla, rintasyöpäsolujen erityisellä entsyymillä, saattaa olla mer-

kitystä rintasyövässä (Freije et al. (1994), J. Biol. Chem. 269 (24), 16766-16773), MMP-lajin toisen jäsenen, MT-MMP:n on osoitettu olevan avainentsyymi gelatinaasi A:n aktivoinnissa (Sato et al. (1994), Nature 370, 61 - 65).
 5 Gelatinaasi A on tärkeä kasvainten kasvuun ja etäpesäkkeisiin (kuten edellä määriteltäisiin) vaikuttava entsyymi.

On osoitettu, että b-amyloidin prekursoriproteiinin (APP) hajotessa syntyy amyloidiplakkeja, jotka ovat pääasiallisia Alzheimerin tautia (AD) sairastavissa potilaissa esiintyvien seniilien plakkien aineosia. Kahdessa äskettäin ilmestyneessä julkaisussa on identifioitu metalloproteiinientsyymejä, jotka hajottavat APP:n amyloidiplakkeiksi (Abraham et al. (1994), Biochemistry 33, 192 - 199; Huber et al. (1994), Biochem. Biophys. Res. Comm. 201 (1),
 10 45 - 53).
 15

Kuten alan asiantuntijalle on selvää, näiden uusien entsyymien ja muiden MMP-entsyymien merkittävä homologi-suuden osuus johtaa mahdollisuuteen, että yhdiste, joka inhiboi yhden entsyymin, saattaa jossain määrin inhiboida
 20 näitä uusia entsyymejä. Siten tähän keksintöön sisältyvät inhibiittorit saattavat olla käyttökelpoisia sellaisten tautien hoidossa, joissa nämä uudet entsyymit ovat vaikuttamassa.

Esillä oleva keksintö perustui pyrkimykseen löytää
 25 yhdisteitä, jotka olennaisesti estävät TNF:n vapautumista soluista ja joita senvuoksi voitaisiin käyttää sellaisten tautien käsittelemiseen, joissa TNF toimii välittäjäaineena. Tällaisia käyttömahdollisuuksia - joihin ei kuitenkaan rajoituta - ovat tulehduksen, kuumeen, sydänverisuonitau-
 30 din vaikutusten, verenvuodon, koaguloitumisen ja akuutin faasivasteen, kuihtumisen ja anoreksian, akuuttien infektioiden, sokkitilojen, siirteensaajan hylkimisreaktion ja autoimmuunitautien käsittely.

Toisena tämän keksinnön kohteena oli sellaisten
 35 yhdisteiden löytäminen, jotka mahdollisen TNF:n vapautu-

misen eston lisäksi inhiboivat MMP-entsyymien vaikutusta ja joita siten saatetaan käyttää sellaisten potilaiden käsittelymiseen, jotka kärsivät TNF:n ja/tai MMP-entsyymien välittämistä taudeista.

5 Keksinnön yhteenveto

Keksintö käsittää kaavan (I) mukaisia uusia merkaptotalkyylipeptidyyliyhdisteitä, jotka ovat käyttökelpoisia metalloproteinaasimatriksin ja/tai TNF-välitteisten tautien - mukaan lukien degeneratiiviset taudit (kuten edellä määritellyt) - ja tiettyjen syöpälajien inhibiittoreita.

Keksinnön eräs aspekti koskee uusia yhdisteitä, joiden yleinen kaava on jäljempänä kaavasivulla esitetty kaava (I). Siten keksinnön kohteena on kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa

15 R^1 on C_{1-6} -alkyyli, C_{2-6} -alkenylyli, aryyli, (C_{1-6} -alkyyli)aryyli tai C_{1-6} -alkyyli- AR^9 , jossa A on O, NR^9 tai $S(O)_m$, jossa $m = 0 - 2$ ja kumpikin R^9 on H, C_{1-4} -alkyyli, aryyli tai (C_{1-4} -alkyyli)aryyli;

R^2 on H tai C_{1-6} -alkyyli;

20 X on NR^4R^5 ;

joko R^4 on H tai C_{1-6} -alkyyli, jossa on mahdollisesti substituenttina amino (NH_2), aryyliamino, suojattu amino, aryyli, di(C_{1-6} -alkyyli)amino, mono(C_{1-6} -alkyyli)amino, CO_2H , suojattu karboksyyli, karbamoyyli, mono(C_{1-6} -alkyyli)karbamoyyli, di(C_{1-6} -alkyyli)karbamoyyli ja R^5 on H tai C_{1-6} -alkyyli, tai NR^4R^5 on pyrrolidino, piperidino tai morfolino;

25 R^3 on $[Alk]_nR^6$ ja R^6 on mahdollisesti substituoitu C_{3-6} -sykloalkyyli, C_{3-6} -sykloalkenylyli, C_{1-6} -alkyyli, bentsyyli, (C_{1-6} -alkoksi)bentsyyli, bentsyylioksibentsyyli tai 3-indolyylimetyyli, Alk on C_{1-6} -alkyyli tai C_{2-6} -alkenylyli ja $n = 0$ tai 1;

30 R^7 on H tai $R^{10}CO$, jossa R^{10} on C_{1-4} -alkyyli, (C_{1-4} -alkyyli)aryyli, C_{3-6} -sykloalkyyli, (C_{3-6} -sykloalkyyli) C_{1-4} -alkyyli, C_{2-6} -alkenylyli tai (C_{2-6} -alkenylyli)aryyli; ja

R^8 on H, C_{1-4} -alkyyli, (C_{1-4} -alkyyli)aryyli tai aryyli;

tai sen suola, solvaatti tai hydraatti.

Keksinnön kuvaus

5 On huomattava, että keksinnön mukaiset yhdisteet voivat sisältää yhden tai useampia asymmetrisesti substituoituja hiiliatomeja, joista esimerkkejä ovat ne, jotka kaavassa (I) on merkitty asteriskilla. Kun kaavan (I) mukaisessa yhdisteessä on yksi tai useampi tällainen asym-

10 metriakeskus, niin yhdiste voi esiintyä eri stereoisomeereina, ja kaikissa tapauksissa keksinnön käsitetään sisälttävän kaikki tällaiset stereoisomeerit mukaan lukien niiden enantiomeerit ja diastereomeerit ja niiden seokset mukaan lukien raseemiset seokset.

15 Tässä esitetyissä kaavoissa aaltoviivaa käytetään mahdollisessa asymmetriakeskuksessa edustamaan R- ja S-konfiguraatioiden mahdollisuutta, viivaa ja viivaa edustamaan yhtä ainoata konfiguraatiota asymmetriakeskuksessa.

20 Tässä selityksessä yksin tai yhdistelmässä käytettynä ilmaisu " C_{1-6} -alkyyli" tarkoittaa suora- tai haaraketjuista alkyyli ryhmää, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, joista esimerkkejä ovat metyyli, etyyli, propyyli, isopropyyli, butyyli, tert-butyli, pentyyli, heksyyli. Siten esimerkiksi $[Alk]_n R^6$ voi olla tert-butyli.

25

Ilmaisu " C_{1-4} -alkyyli" tarkoittaa suora- tai haaraketjuista alkyyli ryhmää, jossa on 1 - 4 hiiliatomia, joista esimerkkejä ovat metyyli, etyyli, propyyli, isopropyyli, butyyli ja tert-butyli.

30 Ilmaisu " C_{2-6} -alkenyli" tarkoittaa suora- tai haaraketjuista alkyyli ryhmää, jossa on 1 - 6 hiiliatomia ja lisäksi yksi kaksoissidos, jolla on joko E- tai Z-stereokemia tapauksesta riippuen. Tähän ilmaisuun sisältyvät esimerkiksi vinyyli, 1-propenyli, 1- ja 2-butenyli ja 2-metyyli-2-propenyli.

35

Ilmaisu " C_{3-6} -sykloalkyyli" tarkoittaa tyydyttynyttä alisyklistä ryhmää, jossa on 3 - 6 hiiliatomia ja joista esimerkkejä ovat syklopropyyli, syklobutyyli, syklopentyyli ja sykloheksyyli.

- 5 Ilmaisu " C_{3-6} -sykloalkenyyli" tarkoittaa alisyklistä ryhmää, jossa on 3 - 6 hiiliatomia ja lisäksi yksi kaksoissidos. Tähän ilmaisuun sisältyvät esimerkiksi syklopentenyyli ja sykloheksenyyli.

- 10 Ilmaisu "aryyli" tarkoittaa mahdollisesti substituoitua fenyyli- tai naftyyli-ryhmää, jonka substituentti tai substituentit on valittu esimerkiksi seuraavista: halogeeni, trifluorimetyyli, C_{1-6} -alkyyli, alkoksi, fenyyli jne. Ilmaisu "halogeeni" tarkoittaa fluoria, klooria, bromia tai jodia.

- 15 Ilmaisut "suojattu amino" ja "suojattu karboksyyli" tarkoittavat amino- ja karboksiryhmiä, jotka suojattu alalla hyvin tunnetulla tavalla. Esimerkiksi aminoryhmän suojaryhmänä voi olla bentsyylioksikarbonyyli, tert-butoksikarbonyyli, asetyyli ym. tai se voidaan suojata ftalimido-ryhmänä tms. ryhmänä. Karboksyyli-ryhmä voidaan suojata helposti poistettavan esterin muodossa, kuten metyyli-, etyyli-, bentsyyli- tai tert-butyylimesterinä.
- 20

- Ilmaisu "alkoksi" tarkoittaa suora- tai haaraketjuista alkoksiryhmää, jossa on korkeintaan 6 hiiliatomia, kuten metoksia, etoksia, propoksia, isopropoksia, butoksia tai tert-butoksia.
- 25

- Kaavan (I) mukaisten yhdisteiden suolat käsittävät farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, esimerkiksi epäorgaanisista tai orgaanisista hapoista johdettuja happoadditiosuoloja, joista esimerkkejä ovat hydrokloridit, hydrobromidit, p-tolueenisulfonaatit, fosfaatit, sulfaatit, perklooraatit, asetaatit, trifluoriasetaatit, propionaatit, sitraatit, malonaatit, sukkinaatit, laktaatit, oksalaatit, tatraatit ja bentsoaatit.
- 30

Suoloja voidaan muodostaa myös emästen kanssa. Tällaisia suoloja ovat epäorgaanisten tai orgaanisten emästen suolat, esimerkiksi maa-alkalimetallisuolat, kuten magnesium- ja kalsiumsuolat, ja orgaanisten amiinien suolat, kuten morfoliini-, piperidiini-, dimetyylaimiini- ja dietyyliamiinisuolat.

Kun "suojattu karboksiryhmä" keksinnön mukaisissa yhdisteissä on esteröity karboksyyli-ryhmä, niin se voi olla metabolisesti labiili esteri, jonka kaava on CO_2R^{11} , jossa R^{11} voi olla etyyli, bentsyyli, fenetyyli, fenyyli-propyyli tai α - tai β -naftyyli, 2,4-dimetyylifenyyli, 4-tert-butyyli-phenyyli, 2,2,2-trifluorietyyli, 1-(bentsyylioksi)bentsyyli, 1-(bentsyylioksi)etyyli, 2-metyyli-1-propionylioksi-propyyli, 2,4,6-trimetyyli-bentsyylioksimetyyli tai pivaloylioksimetyyli.

Edullisia keksinnön mukaisia yhdisteitä ovat sellaiset, joissa toisistaan riippumatta ja minä tahansa yhdistelmänä:

R^1 on C_{1-4} -alkyyli- tai C_{1-3} -alkyyli-OH-ryhmä, esimerkiksi 2-metyylipropyyli- (isobutyyli) tai 2-hydroksietyyli-ryhmä;

R^2 on vety;

n on 0;

R^4 on vety tai C_{1-3} -alkyyli-ryhmä, esimerkiksi metyyli-ryhmä;

R^5 on vety tai C_{1-3} -alkyyli-ryhmä, esimerkiksi metyyli-ryhmä;

R^6 on bentsyyli- tai 3-indolyylimetyyli-ryhmä;

R^7 on vety tai ryhmä R^{10}CO , jossa R^{10} on C_{1-4} -alkyyli-ryhmä, esimerkiksi metyyli;

R^8 on C_{1-4} -alkyyli-, aryyli- tai (C_{1-3} -alkyyli)aryyli-ryhmä, esimerkiksi fenyyli- tai bentsyyli-ryhmä.

Erityisen edullisiin keksinnön mukaisiin yhdisteisiin kuuluvat seuraavat:

- N-[N-(merkaptosetyyli)-L-leusyyli]-L-fenyylialaniinime-
tyyliamidi,
N-(asettylimerkaptoasyyli)-L-leusyyli]-L-fenyylialaniini-
metyyliamidi,
- 5 (RS)-2-(asettylilitio)pentanoyyli-L-leusyyli-L-fenyyliala-
niini-N-metyyliamidi,
(RS)-2-(asettylilitio)propanoyyli-L-leusyyli-L-fenyyliala-
niini-N-metyyliamidi,
(RS)-2-(asettylilitio)-3-metyylibutanoyyli-L-leusyyli-L-fe-
10 nyylialaniini-N-metyyliamidi,
(RS)-2-(asettylilitio)-2-fenyyliasetyyli-L-leusyyli-L-fenyy-
lialaniini-N-metyyliamidi,
(RS)-2-(asettylilitio)-3-fenyylipropanoyyli-L-leusyyli-L-
fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
- 15 (RS)-2-(asettylilitio)-4-fenyylibutanoyyli-L-leusyyli-L-fe-
nyylialaniini-N-metyyliamidi,
N-(asettylimerkaptoasyyli)-L-treonyyli]-L-fenyylialaniini-
metyyliamidi,
N-(asettylimerkaptoasyyli)-L-leusyyli-L-tryptofaanimetyy-
20 liamidi,
(RS)-2-merkaptopentanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-
metyyliamidi,
(RS)-2-merkaptopropanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-
metyyliamidi,
- 25 (RS)-2-merkaptosetyyli-L-leusyyli-L-fenyy-
lialaniini-N-metyyliamidi,
(RS)-2-merkaptosetyyli-L-leusyyli-L-fenyy-
lialaniini-N-metyyliamidi,
(RS)-2-merkaptosetyyli-L-leusyyli-L-fenyy-
30 lialaniini-N-metyyliamidi,
(RS)-2-merkaptosetyyli-L-leusyyli-L-fenyy-
lialaniini-N-metyyliamidi,
N-[N-(merkaptosetyyli)-L-treonyyli-L-fenyylialaniinime-
tyyliamidi ja

N-[N-(merkaptoasetyyli)-L-leusyyli-L-tryptofaanimetyyliamidi.

Yleisen kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa millä tahansa alalla tunnetulla sopivalla menetelmällä ja/tai seuraavilla menetelmillä, jotka sellaisenaan muodostavat osan keksintöä. On huomattava, että milloin tässä kuvatuissa synteesisprosesseissa on valmistettava erityinen kaavan (I) mukainen stereoisomeeri, niin tässä kuvatuissa prosesseissa voidaan käyttää sopivaa homokiraalista materiaalia ja/tai isomeerit voidaan erottaa seoksista käyttäen tavanomaisia erotusmenetelmiä (esim. HPLC).

Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa seuraavalla menetelmällä. Seuraavassa kuvauksessa ja kaa-voissa ryhmät R^1 , R^2 , R^3 , R^6 , R^7 , R^8 ja X merkitsevät edellä määriteltä, jollei muuta osoiteta. On huomattava, että seuraavissa kuvatuissa eri yhdisteissä läsnäolevat funktionaaliset ryhmät, kuten amino-, hydroksyyli- tai karboksyyli-ryhmät, jotka halutaan säilyttää, on mahdollisesti suojattava ennen reaktioiden alkua. Tällaisissa tapauksissa tietyn reaktion viimeisenä vaiheena voi olla suojaryhmän poistaminen. Tällaisten funktionaalisten ryhmien sopivat suojaryhmät ovat alalla hyvin tunnettuja. Yksityiskoh- taisesti niitä on esitetty teoksessa "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley Interscience, T.W. Greene, PGM Wuts.

Yleisen kaavan (I) mukaisia yhdisteitä valmistetaan poistamalla suojaryhmä (esimerkiksi hydrolyysin avulla) yhdisteestä, jonka yleinen kaava on [II], joka on sama kuin kaava (I), jossa R^7 on sopiva suojaryhmä (esim. tert-butyyli tai asetaatti).

On huomattava, että kun on valmistettava erityinen kaavan (I) mukainen stereoisomeeri, niin se voidaan saada tavanomaisella resoluutiotekniikalla kuten suurisuoritus- kykyisellä nestekromatografialla. Haluttaessa voidaan kui- tenkin kytkentäreaktiossa käyttää sopivia homokiraalisia

lähtöaineita kaavan (I) mukaisen tietyn stereoisomeerin valmistamiseksi. Tästä on esitetty esimerkki jäljempänä.

Yleisen kaavan (II) mukaisia välituotteita voidaan valmistaa kytkemällä yhteen happo, jonka kaava on (III), jossa R^7 ja R^8 merkitsevät samaa kuin edellä, tai sen aktiivinen johdannainen, ja kaavan (IV) mukainen amiini. Kaavan (III) mukaisen hapon aktiivisia johdannaisia ovat esimerkiksi happoanhydridit tai happohalogenidit, kuten happokloridit.

Kyt kentäreaktio voidaan suorittaa täm äntyyppisissä aminointireaktioissa käytetyissä standardiolosuhteissa. Niinpä reaktio voidaan suorittaa liuottimessa, esimerkiksi orgaanisessa liuotuksessa kuten eetterissä, esimerkiksi syklisessä eetterissä kuten tetrahydrofuraanissa, amidissa, esim. substituoidussa amidissa kuten dimetyyliformamidissa, tai halogenoidussa hiilivedyissä kuten dikloorimetaanissa, alhaisessa lämpötilassa, esim. lämpötilassa $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$:n ja huoneenlämpötilan välillä, kuten $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, mahdollisesti emäksen läsnä ollessa, esim. orgaanisen emäksen, kuten trietyyliamiinin tai syklisen amiinin kuten N-metyylimorfoliinin läsnä ollessa. Kun käytetään kaavan (III) mukaista happoa, niin reaktio voidaan lisäksi suorittaa kondensointiaineen läsnä ollessa, esimerkiksi di-imidin, kuten N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidin läsnä ollessa, edullisesti triatsolin, kuten 1-hydroksibentsotriatsolin läsnä ollessa. Vaihtoehtoisesti happo voidaan ennen reaktiota kaavan (IV) mukaisen amiinin kanssa saattaa reagoimaan klooriformiaatin, esimerkiksi etyyliklooriformiaatin kanssa.

Yleisen kaavan (IV) mukainen amiini voidaan valmistaa kytkemällä kaavan (V) mukainen happo tai sen aktiivinen johdannainen kaavan (VI) mukaiseen amiiniin ja sen jälkeen poistamalla suojaryhmät.

Kaavan (V) mukaisen hapon aktiivisia johdannaisia ovat esimerkiksi happoanhydridit tai happohalogenidit kuten happokloridit, kuten edellä esitettiin.

Yleisillä kaavoilla (V) ja (VI) kuvatut aminohapot ja niiden johdannaiset voidaan saada kiraalisessa muodossa tai rasemaatteina. Kiraalisessa muodossa ne toimivat yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden asymmetrisinä rakennuselementteinä. Monia näistä johdannaisista voidaan helposti valmistaa kaupallisesti saatavista lähtöaineista alalla hyvin tunnetuin menetelmin (katso: "The Practice of Peptide Synthesis", M. Bodanszk et al., Springer Verlag, New York, 1984; WO 92/21 360).

Yleisen kaavan (II) mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa nukleofiilisesti substituomalla yhdiste, jonka yleinen kaava on (VII), jossa R^{14} on sopiva poistuva ryhmä (esim. halogeeni, kuten bromi, tai alkyylisulfonaattiesteri, kuten metaanisulfonaatti), tiolilla, jonka yleinen kaava on (VIII), jossa R^7 on sopiva suojaryhmä (esim. tert-butyylili tai asetaatti), alalla tunnetuissa standardiolosuhteissa, joista esimerkkinä ovat julkaisussa WO 90/05 719 kuvatut.

Yleisen kaavan (VIII) mukaisia tioleja voidaan valmistaa alalla tunnetuin menetelmin kaupallisesti saatavista lähtöaineista. Monia yleisen kaavan (VIII) mukaisia tioleja on myös kaupallisina tuotteina.

Yleisen kaavan (VII) mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa kytkemällä happo, jonka yleinen kaava on (IX), jossa R^{14} ja R^8 merkitsevät samaa kuin edellä (tai happo sopivasti suojattunna), tai sen aktiivinen johdannainen, yhteen yleisen kaavan (IV) mukaisen amiinin kanssa käyttäen samankaltaisia kytkentäolosuhteita kuin edellä kaavan (II) mukaisten yhdisteiden valmistuksen yhteydessä kuvattut.

Kaavoilla (III) ja (IX) kuvatut karboksyylihapot voidaan saada rakenteeltaan kiraalisina muotoina tai rase-

maatteina. Monia näistä johdannaisista voidaan helposti valmistaa kaupallisesti saatavista lähtöaineista käyttäen alalla hyvin tunnettuja menetelmiä (katso WO 90/05 719).

5 Kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan myös valmistaa muista kaavan (I) mukaisista yhdisteistä intrerkonver-

siolla. Niinpä esimerkiksi kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa R^1 on C_{1-6} -alkyyli, voidaan valmistaa hydraamalla (käyttäen Pd/C-katalyysaattoria sopivassa liuottimessa kuten etanolissa) kaavan (I) mukaisesta yhdisteestä, jossa R^1

10 on C_{2-6} -alkenyyliryhmä. Kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa R^7 on $R^{10}CO$, voidaan valmistaa asyloimalla (käyttäen sopivaa happokloridia $R^{10}COCl$ emäksen, kuten trietyyliamiinin läsnä ollessa sopivassa liuottimessa, kuten klooratussa hiilivedyissä, esimerkiksi dikloorimetaanissa) kaavan (I) mukainen

15 yhdiste, jossa R^7 on H.

Saatujen lopputuotteiden tai välituotteiden seokset voidaan tunnetulla tavalla aineosiensa erilaisten fysikaaliskemiallisten ominaisuuksien perusteella erottaa puhtaiksi lopputuotteiksi tai välituotteiksi käyttäen esimerkiksi kromatografiaa, fraktiokiteytystä tai suolanmuodostusta, milloin se olosuhteista riippuen on sopivaa tai mahdollista.

20

Keksinnön mukaisilla yhdisteillä on in vitro estoaktiivisuutta stromelysiinin, kollagenaasin ja gelatinaasin suhteen. Keksinnön mukaisilla yhdisteillä on myös

25 TNF:n vapautumista estävää vaikutusta in vitro. Yhdisteiden aktiivisuus ja selektiivisyys voidaan määrittää käyttäen sopivaa entsyymien estotestiä, esimerkiksi jäljempänä esimerkissä A kuvatulla tavalla.

30 Tämä keksintö koskee myös menetelmää sellaisten potilaiden (käsittää ihmisen ja/tai meijeri-, liha- tai turkisteollisuutta varten tai lemmikkieläiminä kasvatetut nisäkkäät) käsittelemiseksi, joiden huonokuntoisuuden tai sairauden voidaan katsoa johtuvan stromelysiinistä siten

35 kuin edellä kuvattiin, ja erityisesti menetelmää, jossa

käsittely suoritetaan annostamalla aktiivisina aineina kaavan (I) mukaisia metalloproteinaasien inhibiittoreita.

5 Siten kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää mm. luu-niveltulehduksen ja nivelreuman käsittelyseen ja sairauksissa ja indikaatioissa, jotka ovat sairauksena sellaisesta näiden metalloproteinaasien yli-ilmentymisestä, jollaista löytyy tietyissä metastaattisissa kasvainsolulinjoissa.

10 Kuten edellä mainittiin, kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää ihmis- ja eläinlääkinnässä, koska ne ovat aktiivisia TNF:n ja MMP-entsyymien inhibiittoreita. Siten toisen aspektin mukaan tämä keksintö koskee menetelmää TNF:n tai MMP-entsyymien välittämän sairauden tai tautitilan hoitamiseksi (hoidolla tarkoitetaan käsittelyä tai ennaltaehkäisyä) 15 nisäkkäissä, varsinkin ihmisissä siten, että nisäkkäälle annostetaan vaikuttava määrä edellä olevaa kaavan (I) mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa. Tähän tarkoitukseen kaavan (I) mukaista yhdistettä voidaan käyttää TNF:n tai MMP-entsyymien välittämän sairauden tai tautitilan hoitamiseen (hoidolla tarkoitetaan käsittelyä tai ennaltaehkäisyä) 20 sopivan valmisteiden muodossa.

Edellä mainittuihin sairauksiin tai tautitiloihin kuuluvat tulehdus, kuume, sydänverisuonioireet, verenvuoto, koagulaatio ja akuutti faasivaste, kuihtuminen ja 25 anoreksia, akuutit infektiot, sokkitilat, siirteiden hylkimisreaktiot ja autoimmuunitaudit; ja sellaiset sairaudet, joissa esiintyy kudoksen tuhoutumista, kuten luukato, tulehdustaudit, ihosairaudet, kasvainten kasvu, 30 angiogeneesi ja sekundaaristen metastaasien invaasio, varsinkin nivelreuma, luu-niveltulehdus, periodontiitti, ientulehdus, sarveiskalvon haavauma, kasvaimen kasvu, angiogeneesi ja sekundaaristen metastaasien invaasio.

35 Nivelreuman ja luu-niveltulehduksen käsittelyyn ja sellaisten tautien ja indikaatioiden käsittelyyn, jotka

ovat seurausta sidekudoksen perusaineen (matriksi) metalloendoproteinaasien yli-ilmentymästä ja joita on löydetty tietyissä metastaattisissa kasvainlinjoissa, tai muiden matriksin metalloendoproteinaasien välittämien tautien tai

5 lisääntyneestä TNF-tuotannosta johtuvien tautien käsitte-
lyyn kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan antaa lääkkeeksi suun kautta, paikallisesti, ruuansulatuskanavan ulkopulisesti, inhalaationa, suihkeena tai peräsuolen kautta annosyksikkökoostumuksina, jotka sisältävät myrkyt-

10 tömiä farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantaja-aineita, apu-
aineita ja kuljettimia. Ilmaisu ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti käsittää tässä käytettynä ihonalaiset injektiot, suonensisäiset, lihaksensisäiset, rintalastansisäiset injektiot tai infuusiotekniikat. Sen lisäksi, että

15 keksinnön mukaiset yhdisteet ovat vaikuttavia lämmينveristen eläinten käsittelyssä, kuten hiirien, rottien, hevosten, nautakarjan, lampaiden, koirien ja kissojen käsittelyssä, ne ovat vaikuttavia myös ihmisten käsittelyssä.

Suun kautta otettavaksi olevassa muodossa aktiivista ainetta sisältävä farmaseuttinen koostumus voi olla esimerkiksi tablettien, pastillien, lääkenappien, vesitai öljysuspensioiden, dispergoituvien jauheiden tai rakeiden, emulsioiden, kova- ja pehmeäkapselien tai siirappien tai eliksiirien muodossa. Suun kautta otettaviksi

20 tarkoitettut koostumukset voidaan valmistaa millä tahansa farmaseuttisten koostumusten valmistuksessa käytetyllä tunnetulla menetelmällä, ja jotta saataisiin farmaseuttisesti miellyttäviä ja maittavia valmisteita, koostumukset voivat sisältää yhtä tai useampaa seuraavista aineista:

25 makeutusaineet, makuaineet, värit ja säilöntäaineet. Tabletit sisältävät aktiivista aineosaa seoksena sellaisten myrkyttömien farmaseuttisesti hyväksyttävien täyteaineiden kanssa, jotka ovat sopivia tablettien valmistukseen. Tällaiset täyteaineet voivat olla esimerkiksi inerttejä laimentimia, kuten kalsiumkarbonaatti, natriumkarbonaatti,

30

35

laktoosi, kalsiumfosfaatti tai natriumfosfaatti; rakeis-
 tusaineita tai hajoamista helpottavia aineita, esimerkiksi
 maissitärkkelystä tai algiinihappoa; sideaineita, esimer-
 kiksi tärkkelystä, gelatiinia tai akaasiakumia, tai luis-
 5 toaineita, esimerkiksi magnesiumstearaattia, steariinihap-
 poa tai talkkia. Tabletit voivat olla päällystämättömiä
 tai tunnetuilla menetelmillä päällystettyjä siten, että
 niiden hajoaminen imeytyminen ja ruuansulatuskanavassa
 tapahtuu säädetysti ja että saadaan kauemmin kestävä hi-
 10 dastettu vaikutus. Voidaan käyttää esimerkiksi hidastavaa
 materiaalia kuten glyseryylimonostearaattia tai glyseryy-
 lidistearaattia. Tabletit voidaan myös päällystää US-pa-
 tenttijulkaisuissa 4 256 108, 4 166 452 ja 4 265 874 kuva-
 tuilla menetelmillä säädetysti aktiiviainetta vapautta-
 15 vien, osmoottisten, terapeuttisten tablettien muodostami-
 seksi.

Suun kautta otettaviksi tarkoitettut koostumukset
 voivat olla myös kovagelatiinikapseleina, joissa aktiivi-
 20 nen aineosa on sekoitettuna inertin kiinteän laimennusai-
 neen kanssa, esimerkiksi kalsiumkarbonaatin, kalsiumfos-
 faatin tai kaoliinin kanssa, tai pehmeägelatiinikapselei-
 na, joissa aktiivinen aineosa on sekoitettuna veteen tai
 öljyväliaineeseen, esimerkiksi maapähkinäöljyyn, parafii-
 niöljyyn tai oliiviöljyyn.

Vesipitoiset suspensiot sisältävät aktiivisia ai-
 neita seoksena sellaisten lisäaineiden kanssa, jotka so-
 veltuvat vesipitoisten suspensioiden valmistukseen. Sel-
 25 laisia lisäaineita ovat suspendointiaineet, esimerkiksi
 natriumkarboksimeetyyliselluloosa, metyyliiselluloosa, hyd-
 30 roksipropyylimetyyliiselluloosa, natriumalginaatti, polyvi-
 nyylipyrrolidoni, traganttikumi ja akaasiakumi; disper-
 gointi- ja kestutusaineina voi olla luonnossa esiintyviä
 fosfatideja, esimerkiksi lesitiini, tai alkyleenioksidin
 kondensaatiotuotteita rasvahappojen kanssa, esimerkiksi
 35 polyoksietyleenistearaatti, tai etyleenioksidin kondensaa-

tiotuotteita pitkäketjuisten alifaattisten alkoholien kanssa, esimerkiksi heptadekaetyleenioksisetanoli, tai etyleenioksidin kondensaatiotuotteita rasvahapoista ja heksitolista johdettujen osittaisesterien kanssa, kuten
 5 polyoksietyleenin ja rasvahapoista ja heksitolianhydrideistä johdettujen osittaisesterien väliset kondensaatiotuotteet, esimerkiksi polyoksietyleenisorbitaanimonoleaatti. Vesipitoiset suspensiot voivat myös sisältää yhtä tai useampaa säilöntäainetta, esimerkiksi etyyli- tai
 10 n-propyyli-p-hydroksibentsoaattia, yhtä tai useampaa väriainetta, yhtä tai useampaa makuainetta ja yhtä tai useampaa makeutusainetta, kuten saakkaroosia tai sakariinia.

Öljysuspensiot voidaan koostaa suspendoimalla aktiivinen aineosa kasviöljyyn, esimerkiksi maapähkinäöljyyn,
 15 oliiviöljyyn, seesamöljyyn tai kookosöljyyn, tai mineraaliöljyyn kuten parafiiniöljyyn. Öljysuspensiot voivat sisältää makeutusainetta, esimerkiksi mehiläisvahaa, kovaparafiinia tai setyylialkoholia. Maittavan suun kautta otettavan valmisteiden saamiseksi voidaan lisätä makeutusaineita, kuten sellaisia, joita edellä kuvattiin, ja makuaineita.
 20 Näiden koostumusten säilyvyyttä parantamaan voidaan lisätä antioksidanttia kuten askorbiinihappoa.

Dispergoituissa jauheissa ja rakeissa, jotka sopivat vesipitoisten suspensioiden valmistukseen lisäämällä
 25 vettä, aktiivinen aineosa on seoksena dispergointi- tai kostutusaineen ja yhden tai useamman säilöntäaineen kanssa. Sopivia dispergointi- tai kostutusaineita ovat edellä esimerkkeinä mainitut. Valmisteet voivat myös sisältää makeutus-, maku- ja väriaineita.

Keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset voivat olla myös öljy/vedessä-emulsioina. Öljyfaasina voi
 30 olla kasviöljy, esimerkiksi oliiviöljy tai maapähkinäöljy, tai mineraaliöljy, esimerkiksi parafiiniöljy, tai näiden seos. Sopivia emulgointiaineita voivat olla luonnossa esiintyvät kumit, esimerkiksi akaasiakumi tai traganttiku-
 35

mi, luonnossa esiintyvät fosfatidit, esimerkiksi soi-
 lesitiini, ja rasvahapoista ja heksitolianhydrideistä joh-
 detut esterit tai osittaisesterit, esimerkiksi sorbi-
 taanimono-oleaatti, ja mainittujen osittaisesterien ja
 5 etyleenioksidin väliset kondensaatiotuotteet, esimerkiksi
 polyoksietyleenisorbitaanimono-oleaatti. Emulsiot voivat
 myös sisältää makeutus- ja makuaineita.

Siirapit ja eliksiirit voidaan formuloida makeutus-
 aineiden kanssa, esimerkiksi glyserolin, propyleeniglyko-
 10 lin, sorbitolin tai sakkaroosin kanssa. Tällaiset koostu-
 mukset voivat sisältää myös ärsytystä lieventävää ainetta,
 säilöntäainetta ja maku- ja väriaineita.

Farmaseuttiset koostumukset voivat olla steriilien
 injektoitavien vesi- tai öljysuspensioiden muodossa. Täl-
 15 lainen suspensio voidaan valmistaa alalla tunnetulla ta-
 valla käyttäen sellaisia sopivia dispergointi- tai kostu-
 tusaineita ja suspendointiaineita, joita edellä mainit-
 tiin. Steriili injektoitava valmiste voi myös olla sterii-
 li injektoitava liuos tai suspensio myrkyttömässä parente-
 20 raalisesti hyväksyttävässä laimentimessa tai liuottimessa,
 esimerkiksi 1,3-butaanidioliliuos. Käytettäväksi hyväksyt-
 täviin kuljettimiin ja liuottimiin kuuluvat vesi, Ringerin
 liuos ja isotoninen natriumkloridiliuos. Lisäksi steriile-
 jä haihtumattomia öljyjä käytetään tavallisesti liuottimi-
 25 na tai suspendointiaineina. Tähän tarkoitukseen voidaan
 käyttää mitä tahansa neutraalia haihtumatonta öljyä mukaan
 lukien synteettiset mono- ja diglyseridit. Lisäksi rasva-
 happoja kuten öljyhappoa saatetaan käyttää injektoitavien
 tuotteiden valmistuksessa.

30 Kaavan (I) mukaisia yhdisteitä voidaan antaa lääk-
 keksi myös peräpuikkojen muodossa lääkkeen annostamiseksi
 peräsuolen kautta. Nämä koostumukset voidaan valmistaa
 sekoittamalla lääkeaine sellaisen sopivan, ärsyttämättömän
 täyteaineen kanssa, joka on kiinteä tavallisissa lämpöti-
 35 loissa, mutta nestemäinen peräsuolen lämpötilassa ja joka

siten sulaa peräsuolella vapauttaen lääkeaineen. Tällaisia materiaaleja ovat kaakaovoit ja polyetyleeniglykolit.

Paikalliseen käyttöön sopivat kaavan (I) mukaisia yhdisteitä sisältävät voiteet, salvat, liuokset tai suspensiot jne. Tällainen paikallinen käyttö käsittää myös suuvesien ja kurlausvesien käytön.

Edellä esitettyjen tautitilojen käsittelyyn käyttökelpoiset annostasot ovat suuruusluokkaa noin 0,05 - noin 140 mg/ruumiinpaino-kg päivässä (noin 2,5 - noin 7 g potilasta kohti päivässä). Esimerkiksi tulehdusta voidaan tehokkaasti hoitaa annostamalla noin 0,01 - noin 50 mg yhdistettä ruumin kilogrammaa kohti päivässä (noin 0,5 - noin 3,5 g potilasta kohti päivässä).

Aktiivisen aineen määrä, joka yhdistetään kantaja-aineiden kanssa yhden annosyksikön muodostamiseksi, voi vaihdella riippuen kulloinkin käsiteltävästä kohteesta ja käytetystä annostustavasta. Esimerkiksi ihmisille suun kautta annostettavaksi tarkoitettu koostumus voi sisältää aktiivista ainetta noin 5 - noin 95 % koko koostumuksen painosta. Annosyksikkömuodot sisältävät yleensä noin 1 - noin 500 mg aktiivista ainetta.

On kuitenkin ymmärrettävä, että tietylle potilaalle annettu erityinen annostaso vaihtelee riippuen monista tekijöistä, joita ovat esimerkiksi käytetyn yhdisteen aktiivisuus, potilaan ikä, paino, yleiskunto, sukupuoli, lääkkeen annostusaika ja annostustapa, lääkkeen erittyminen, lääkeyhdistelmä ja kulloinkin hoidetun sairauden vakavuus.

Seuraavat esimerkit 1 - 23, jotka eivät rajoita keksinnön suojapiiriä, valaisevat kaavan (I) mukaisten yhdisteiden valmistusta käyttäen materiaaleja, joihin sisältyy seuraavia välituotteita. Esimerkit A - D valaisevat koejärjestelyjä.

Esimerkeissä käytetään seuraavia lyhenteitä:

DCC = disykloheksyylikarbodi-imidi

RT = huoneenlämpötila

EDC = 1-(3-dimetyyliaminopropyyli)-3-etyylikarbodi-imidi-hydrokloridi

THF = tetrahydrofuraani

TNFa = kasvaimen nekroositekijä a

PMA = forboli-13-myristaatti-12-asetaatti

ELISA = entsyymi-kytketty immunosorbenttianalyysi

Välituote 1

L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

DCC:tä (3,02 g) lisättiin 0 °C:ssa L-fenyylialaniini-N-bentsyylikarbamaatin (4,00 g) ja N-hydroksisukkinimidin (1,69 g) liuokseen vedettömässä THF:ssä (35 ml). Seosta sekoitettiin 0 °C:ssa 16 tuntia, sitten suodatettiin käyttäen celiteä. Suodokseen lisättiin vesipitoista metyyliamiinia (40 % vedessä, 5 ml), ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 24 tuntia. Reaktioseos konsentroitiin vakuumissa ja raakatuote (6,01) liuotettiin etanoliin (250 ml). Etanoliliuokseen lisättiin pommissa 10-%:isen Pd/C-katalysaattorin vesisuspensio (noin 2 ml). Seosta sekoitettiin vetykaasussa 724 kPa:ssa (105 psi) 18 tuntia. Liuos suodatettiin celiten avulla, ja suodos haihdutettiin vakuumissa. Jäännös jaettiin 1 N kloorivetyhappoon (110 ml) ja dikloorimetaaniin (50 ml) liukeneviin osiin. Kerrokset erotettiin ja vesikerros uutettiin dikloorimeetaanilla (50 ml). Vesikerros tehtiin emäksiseksi 3 N natriumhydroksidiliuoksella pH-arvoon noin 14 ja uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 50 ml). Viimeksi saadut uutteet yhdistettiin, kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin otsikon yhdiste värittömänä viskoosisena öljynä, joka suurvakuumissa muuttui kiinteäksi (2,24 g).

TLC R_f 0,15 (5 % $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Samalla tavalla valmistettiin:

Välituote 2**L-tryptofaani-N-metyyliamidi**

L-tryptofaani-N-bentsyylikarbamaatista (50 g) vä-
rittömänä öljynä (14,3 g).

5 TLC R_f 0,30 (5 % MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 3**N-[N-(karbobentsyylioksi)-L-leusyyli]-L-fenyy-
lialaniinimetyyliamidi**

Välituotetta 1 (1,33 g), L-leusiini-N-bentsyylikar-
bamaattia (1,98 g), N-hydroksibentsotriatsolia (1,21 g) ja
10 EDC:tä (1,57 g) sekoitettiin yhdessä vedettömässä THF:ssä
(30 ml) 0 °C:ssa 24 tuntia. Seokseen lisättiin vettä (10
ml) ja dikloorimetaania (10 ml) ja orgaaninen liuotin
poistettiin vakuuissa, vesifaasi jaettiin 1 N kloorivety-
15 hapopoon (10 ml) ja etyyliasetaattiin (20 ml) liukeneviin
osiin. Orgaaninen kerros erotettiin, pestiin kyllästetyllä
NaHCO₃-liuoksella (8 %, 20 ml) ja kyllästetyllä NaCl-liuok-
sella (20 ml), kuivattiin (Na₂SO₄), suodatettiin ja haihdu-
tettiin, jolloin saatiin läpikuultamaton geeli. Se liuo-
20 tettiin dikloorimetaaniin, liuos haihdutettiin vakuuissa,
jolloin saatiin otsikon yhdiste värittömänä kiinteänä ai-
neena (2,78 g).

TLC R_f 0,60 (EtOAc).

Samalla tavalla valmistettiin:

25 Välituote 4**N-[N-(karbobentsyylioksi)-L-leusyyli]-L-trypto-
faanimetyyliamidi**

välituotteesta 2 (11,4 g) valkeana kiinteänä tuot-
teena (20 g).

30 TLC R_f 0,46 (5 % MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 5**N-[N-(karbobentsyylioksi)-L-treonyyli]-L-fenyy-
lialaniinimetyyliamidi**

L-treoniini-N-bentsyylikarbamaatista (4,3 g) värit-
35 tömänä öljynä (7,7 g).

TLC R_f 0,31 (5 % MeOH-CH₂Cl₂).

Välituote 6**N-(L-leusyyli)-L-fenyylialaniinimetyyliamidi**

Välituote 3 (2,78 g) liuotettiin etanoliin (140 ml) ja liuokseen lisättiin 10-%:ista Pd/C-katalyysaattoria (0,5 g) (suspensionona noin 3 ml:ssa vettä). Suspensiota sekoitettiin vetykaasussa 16 tuntia. Seos suodatettiin käyttäen celiteä ja pestiin dikloorimetaanilla (20 ml). Haihduttamalla suodos saatiin väritön puolikiinteä aine, joka liuotettiin 1 N kloorivetyhappoon (100 ml) ja liuos uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 50 ml), tehtiin sitten emäksiseksi 3 N natriumhydroksidiliuoksella ja uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 50 ml). Viimeksi saadut uutteet yhdistettiin, kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin otsikon yhdiste värittömänä kiinteänä aineena (1,66 g).

TLC R_f 0,13 (5 % MeOH- CH_2Cl_2).

Välituote 7 N-(L-leusyyli)-L-tryptofaanimetyyliamidi

Välituotteen 4 (2 g) liuosta sykloheksenissä (50 ml) ja etanolissa (50 ml) käsiteltiin 10-%:isella Pd/C-katalyysaattorilla (0,2 g). Seosta sekoitettiin palautusjäähdytyslämpötilassa 2 tuntia. Seos suodatettiin käyttäen celiteä, liuotin poistettiin vakuuissa ja jäännös puhdistettiin pylväskromatografiolla (SiO_2 , 10 % MeOH- CH_2Cl_2), jolloin saatiin hygroskooppinen väritön kiinteä aine (1,05 g).

TLC R_f 0,38 (10 % MeOH- CH_2Cl_2).

Samalla tavalla valmistettiin:

Välituote 8**N-(L-treonyyli)-L-fenyylialaniinimetyyliamidi**

välituotteesta 5 (6,6 g) valkeana kiinteänä aineena (3,31 g).

TLC R_f 0,05 (5 % MeOH- CH_2Cl_2).

Välituote 9**Asetyylimerkaptotikkahappo**

Etanoliin (20 ml) lisättiin natriumia (460 mg) ja sitten liuokseen lisättiin tiolietikkahappoa (1,50 ml). 5 minuutin kuluttua lisättiin bromietikkahappoa (2,78 g) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 18 tuntia. Reaktioseos laimennettiin dikloorimetaanilla (60 ml) ja suodatettiin (celite). Suodos haihdutettiin vaaleankeltaiseksi öljyksi. Raakatuote liuotettiin dikloorimetaaniin (10 ml), 10 liuos suodatettiin ja suodos haihdutettiin, jolloin saatiin otsikon yhdiste vaaleankeltaisena öljynä (2,84 g).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; CDCl_3 ; Ref TMS) 2,41 (s, 3H) ja 3,75 (s, 2H).

Välituote 10**(RS)-2-bromipentaanihappo**

D,L-norvaliinin (10 g) ja kaliumbromidin (35,5 g) liuokseen vesipitoisessa rikkihapossa (1,25 M, 130 ml) lisättiin 0 °C:ssa tunnin aikana annoksittain kiinteää natriumnitriittiä (8,8 g). Sitten liuoksen annettiin läm- 20 metä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin 2 tuntia. Seos uutettiin dikloorimetaanilla (2 x 100 ml), yhdistetyt uutteen kuivattiin (MgSO_4) ja haihdutettiin vakuuissa, jolloin saatiin otsikon yhdiste (11,53 g) värittömänä öljynä.

25 TLC R_f 0,60 (EtOAc).

Samalla tavalla valmistettiin:

Välituote 11**(RS)-2-bromi-3-metyyli-3-butanihappo**

D,L-valiininista (10 g) värittömänä öljynä (11,48 g). 30 TLC R_f 0,54 (EtOAc).

Välituote 12**(RS)-2-bromi-2-fenyylitikkahappo**

D,L-fenyyliglysiinistä (10 g) vaaleankeltaisena öljynä (7,24 g).

35 TLC R_f 0,58 (EtOAc).

Välituote 13**(RS)-2-bromi-3-fenyylipropaanihappo**

D,L-fenyylialaniinista (5 g) vaaleankeltaisena öljynä (6,72 g).

5 TLC R_f 0,58 (EtOAc).

Välituote 14**(RS)-2-bromi-4-fenyylibutaanihappo**

D,L-homofenyylialaniinista (970 mg) valkeana kiinteänä aineena (1,0 g).

10 TLC R_f 0,13 (EtOAc).

Välituote 15**(RS)-2-(asetyyliitio)pentaanihappo**

Välituotteen 10 (3,0 g) liuosta etanolissa (50 ml) käsiteltiin kaliumtioliasetaatilla (2,1 g) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuos haihdutettiin vakuuissa ja jäännös jaettiin veteen (30 ml) ja dikloorimetaaniin (30 ml) liukeneviin osiin. Orgaaninen kerros pestiin kyllästetyllä NaCl-liuoksella (30 ml), kuivatettiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin vakuuissa, jolloin saatiin

15

20

otsikon yhdiste (2,23 g) keltaisena öljynä.

TLC R_f 0,55 (EtOAc).

Samalla tavalla valmistettiin:

Välituote 16**(RS)-2-(asetyyliitio)propaanihappo**

25 (RS)-2-bromipropaanihaposta (1,63 g) keltaisena öljynä (1,38 g).

TLC R_f 0,4 (5 % EtOH- $CHCl_3$).

Välituote 17**(RS)-2-(asetyyliitio)-3-metyylibutaanihappo**

30 Välituotteesta 11 (5 g) vaaleankeltaisena öljynä (4,1 g).

TLC R_f 0,5 (EtOAc).

Välituote 18**(RS)-2-(asetyyilitio)-2-fenyylietikkahappo**

Välituotteesta 12 (3,0 g) keltaisena öljynä
(1,64 g).

5 TLC R_f 0,5 (EtOAc).

Välituote 19**(RS)-2-(asetyyilitio)-3-fenyylipropaanihappo**

Välituotteesta 13 (2,0 g) keltaisena öljynä
(1,41 g).

10 TLC R_f 0,80 (EtOAc).

Välituote 20**(RS)-2-(asetyyilitio)-4-fenyylibutaanihappo**

Välituotteesta 14 (860 mg) ruskeana öljynä (340
mg).

15 TLC R_f 0,35 (EtOAc).

Esimerkki 1

**N-[N-(asetyylimerkapttoasetyyli)-L-leusyyli]-L-fe-
nyylialaniini-N-metyyliamidi**

20 Välituote 6 (113 mg) ja välituote 9 (52 mg) liuo-
tettiin vedettömään THF:ään (10 ml), liuokseen lisättiin
N-hydroksibentsotriatolia (63 mg) ja sen jälkeen EDC:tä
(82 mg) ja liuosta sekoitettiin 0 °C:ssa 16 tuntia. Reak-
tioseos konsentroitiin vakuumissa ja jäännös jaettiin 1 N
25 kloorivetyhappoon (20 ml) ja etyyliasetattiin (20 ml)
liukeneviin osiin. Kerrokset erotettiin ja orgaaninen faa-
si uutettiin kyllästetyllä NaHCO_3 -liuoksella (2 x 20 ml) ja
kyllästetyllä NaCl -liuoksella (20 ml), kuivattiin (MgSO_4)
ja haihdutettiin, jolloin saatiin väritön kiinteä raaka-
30 tuote (146 mg). Puhdistamalla flashpylväskromatogarafialla
(8 x 1,5 cm, eluenttina EtOAc, pakkaus CH_2Cl_2 :n kanssa)
saatiin otsikon yhdiste värittömänä kiinteänä aineena
(110 mg).

TLC R_f 0,35 (EtOAc).

35 $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; CDCl_3 ; Ref TMS): 0,90 (m, 6H, 1,3 -
1,8 (m, 3H), 2,4 (s, 3H), 2,7 (d, 3H), 2,9 - 3,3 (m, 2H),

3,5 (s, 2H), 4,2 (m, 1H), 4,6 (m, 1H), 6,1 (m, 1H), 6,45 (br. d, 1H), 6,6 (br. d, 1H), 7,1 - 7,4 (m, 5H).

Samalla tavalla valmistettiin:

Esimerkki 2

5 (RS)-2-(asetyyilitio)pentanoyyli-L-leusyyli-L-fenyyli-
lialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 15 (300 mg) ja välituotteesta 6 (500 mg) valkeana kiinteänä aineena (540 mg).

TLC R_f 0,63 (5 % MeOH-CH₂Cl₂)

10 C₂₃H₃₅N₃O₄S [449,6]; [MH⁺] = 450; [MNa⁺] = 472.

Esimerkki 3

(RS)-2-(asetyyilitio)propanoyyli-L-leusyyli-L-fenyyli-
lialaniini-N-metyyliamidi

15 Välituotteesta 16 (180 mg) ja välituotteesta 6 (355 mg) valkeana kiinteänä aineena (314 mg).

TLC R_f 0,33 (EtOAc)

C₂₁H₃₁N₃O₄S [421,6]; [MH⁺] = 422.

Esimerkki 4

20 (RS)-2-(asetyyilitio)-3-metyyllibutanoyyli-L-leusyyli-
li-L-fenyyli-
lialaniini-N-metyyliamidi

Välituotteesta 17 (330 mg) ja välituotteesta 6 (553 mg) valkeana kiinteänä aineena (570 mg) kiteytyksen jälkeen dietyylieetteristä.

TLC R_f 0,36, 0,40 (diastereomeerit) (EtOAc)

25 C₂₃H₃₅N₃O₄S [449,6]; [MH⁺] = 450; [MNa⁺] = 47,2.

Esimerkki 5

(RS)-2-(asetyyilitio)-2-fenyyliasetyyli-L-leusyyli-
L-fenyyli-
lialaniini-N-metyyliamidi

30 Välituotteesta 18 (360 mg) ja välituotteesta 6 (500 mg) valkeana kiinteänä aineena (600 mg).

TLC R_f 0,37 (5 % MeOH-CH₂Cl₂)

C₂₆H₃₃N₃O₄S [483,6]; [MH⁺] = 484; [MNa⁺] = 496.

Esimerkki 6

(RS)-2-(asetyyliitio)-3-fenyylipropanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Välituotteesta 19 (420 mg) ja välituotteesta 6 (553 mg) valkeana kiinteänä aineena (410 mg) kiteytyksen jälkeen dietyylieetteristä.

TLC R_f 0,36, 0,43 (diastereomeerit) (EtOAc)

$C_{27}H_{35}N_3O_4S$ [497,7]; $[MH^+] = 498$; $[MNa^+] = 520$.

Esimerkki 7

10 **(RS)-2-(asetyyliitio)-4-fenyylibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi**

Välituotteesta 20 (350 mg) ja välituotteesta 6 (500 mg) valkeana kiinteänä aineena (640 mg).

TLC R_f 0,39 (5 % MeOH- CH_2Cl_2)

15 $C_{28}H_{37}N_3O_4S$ [511,7]; $[MH^+] = 512$; $[MNa^+] = 534$.

Esimerkki 8

N-[N-(asetyylimerkaptoasetyyli)-L-treonyyli]-L-fenyylialaniinimetyyliamidi

20 Välituotteesta 9 (0,48 g) ja välituotteesta 8 (1,0 g) valkeana kiinteänä aineena (0,83 g).

TLC R_f 0,35 (7 % MeOH- CH_2Cl_2)

1H -NMR (200 MHz; $CDCl_3$ + CD_3OD : Ref TMS): 1,1 (d, 3H), 2,4 (s, 3H), 2,7 (d, 3H), 3,1 (m, 2H), 3,6 (d, 2H), 4,2 (m, 2H), 4,6 (m, 1H), 7,2 (m, 5H).

25 **Esimerkki 9**

N-[N-(asetyylimerkaptoasetyyli)-L-leusyyli]-L-tryptofaanimetyyliamidi

Välituotteesta 9 (220 mg) ja välituotteesta 7 (500 mg) valkeana kiinteänä aineena (590 mg).

30 TLC R_f 0,22 (EtOAc)

$C_{22}H_{30}N_4O_4S$ [446,6]; $[MH^+] = 447$.

Esimerkki 10**N-[N-(merkaptosetyyli)-L-leusyyli]-L-fenyylialaniinimetyyliamidi**

Esimerkin 1 yhdistettä (16 mg) sekoitettiin kyllästetyn ammoniumhydroksidiliuoksen (200 ml) ja metanolin (400 ml) kanssa typpikehässä huoneenlämpötilassa 2 tuntia. Liuos tehtiin happameksi 2 N kloorivetyhapolla ja seos uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 40 ml). Yhdistetyt orgaaniset fraktiot kuivattiin (Na_2SO_4), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin väritön kiinteä raakatuote (14,2 mg). Puhdistamalla flashpylväskromatogarafiolla (1,5 x 10 cm, eluenttina EtOAc, pakkaus CH_2Cl_2 :n kanssa) saatiin otsikon yhdiste värittömänä kiinteänä aineena (6 mg).

15 TLC R_f 0,23 (EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; CDCl_3 ; Ref TMS): 0,90 (d, 3H), 0,93 (d, 3H), 1,48 - 1,71 (m, 3H), 1,86 (t, 1H), 2,74 (d, 3H), 3,02 - 3,17 (m, 4H), 4,40 (m, 1H), 4,62 (q, 1H), 6,03 (br m, 1H), 6,82 (br d, 1H), 6,99 (br d, 1H) ja 7,12 - 7,37 (m, 5H).

Samalla tavalla valmistettiin:

Esimerkki 11**(RS)-3-merkaptopentanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi**

25 Esimerkin 2 yhdisteestä (200 mg) valkeana kiinteänä aineena (180 mg).

TLC R_f 0,37 (5 % MeOH- CH_2Cl_2)

$\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ [407,6]; $[\text{MH}^+] = 408$; $[\text{MNa}^+] = 430$.

Esimerkki 12**(RS)-2-merkaptosetanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi**

30 Esimerkin 4 yhdisteestä (200 mg) valkeana kiinteänä aineena (190 mg).

TLC R_f 0,41 (5 % MeOH- CH_2Cl_2)

35 $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ [407,6]; $[\text{MH}^+] = 408$; $[\text{MNa}^+] = 430$.

Esimerkki 13

(RS)-2-merkaptto-2-fenyyliasetyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

5 Esimerkin 5 yhdisteestä (200 mg) valkeana kiinteänä aineena (173 mg).

TLC R_f 0,28 (5 % MeOH-CH₂Cl₂)

C₂₄H₃₁N₃O₃S [441,6]; [MH⁺] = 442; [MNa⁺] = 464.

Esimerkki 14

10 **(RS)-2-merkaptto-3-fenyylipropanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi**

Esimerkin 6 yhdisteestä (202 mg) valkeana kiinteänä aineena (185 mg).

TLC R_f 0,28 (5 % MeOH-CH₂Cl₂)

C₂₅H₃₃N₃O₃S [455,6]; [MH⁺] = 456.

15 **Esimerkki 15**

(RS)-2-merkaptto-4-fenyylibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi

Esimerkin 7 yhdisteestä (150 mg) valkeana kiinteänä aineena (138 mg).

20 TLC R_f 0,20 (5 % MeOH-CH₂Cl₂)

C₂₆H₃₅N₃O₃S [469,6]; [MH⁺] = 470; [MNa⁺] = 492.

Esimerkki 16

N-[N-(merkapttoasetyyli)-L-leusyyli]-L-tryptofaani-metyyliamidi

25 Esimerkin 9 yhdisteestä (120 mg) valkeana kiinteänä aineena (100 mg).

TLC R_f 0,12 (5 % MeOH-CH₂Cl₂)

C₂₀H₂₈N₃O₃S [390,6]; [MH⁺] = 391.

Esimerkki 17

30 **N-[N-(merkapttoasetyyli)-L-treonyyli]-L-fenyylialaniinimetyyliamidi**

Esimerkin 8 yhdisteestä (0,3 g) valkeana kiinteänä aineena (0,09 g).

TLC R_f 0,09 (5 % MeOH-CH₂Cl₂)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz.DMSO) 1,0 (d, 3H), 2,5 (d, 3H), 2,8 (m, 3H), 3,0 (d.d, 1H), 3,2 (m, 2H), 3,9 (m, 1H), 4,2 (d.d, 1H), 4,4 (m, 1H), 5,0 (d, 1H), 7,2 (m, 5H), 7,8 (m, 1H), 8,0 (m, 2H).

5 **Esimerkki 18**

(RS)-2-merkaptopropanoyyli-L-leusyyli]-N-metyyli-amidi

Natriummetoksidin (10 mg) liuokseen metanolissa (1,5 ml) lisättiin esimerkin 3 yhdistettä (56 mg, 0,133 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa tunnin ajan. Liuotin haihdutettiin vakuuissa ja jäännös jaettiin dikloorimetaaniin (15 ml) ja 2 M kloorivetyhappoon (10 ml) liukeneviin osiin. Vesikerros uutettiin uudelleen dikloorimetaanilla (10 ml) ja yhdistetyt uutteen kuivattiin (Na₂SO₄) ja haihdutettiin vakuuissa, jolloin saatiin valkeaa kiinteää aine. Puhdistamalla pylväskromatografialla (SiO₂, 3 % MeOH-CH₂Cl₂) saatiin otsikon yhdiste (13 mg) valkeana kiinteänä aineena.

20 C₁₉H₂₉N₃O₃S [379,5]; MS [MH⁺] = 380.
TLC R_f 0,32 (5 % MeOH-CH₂Cl₂).

Esimerkit 19 - 23

Lisäksi analogisesti edellä kuvattujen menetelmien kanssa voidaan valmistaa viisi kaavan (I) mukaista yhdistettä, joissa R² = R⁴ = R⁸ = H, R⁵ = CH₃, R⁶ =bentsyyli, R⁷ = CH₃CO, n = 0 ja:

25 R¹ = CH₂SCH₃ (esim. 19);
R¹ = CH₂SOCH₃ (esim. 20);
R¹ = CH₂SO₂CH₃ (esim. 21);
R¹ = CH₂OH (esim. 22);
30 R¹ = CH₂CH₂OH (esim. 23).

Esimerkki A

Kollagenaasi-inhibitioaktiivisuus

Yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden kyky toimia kollagenaasin inhibiittoreina määritettiin menetelmällä, jonka ovat kehittäneet Cawston ja Barrett (Anal.

Biochem. 99, 340 - 345, 1979); siinä testattavan inhibiittorin 1 mM liuosta tai sen laimennuksia inkuboitiin 37 °C:ssa 16 tuntia kollageenin ja kollagenaasin kanssa (puskurina 50 mM tris-puskuri, pH 7,6, joka sisälsi 5 mM CaCl_2 , 0,05 % Brij 35, 60 mM NaCl ja 0,02 % NaN_3). Kollageeninina oli ^3H - tai ^{14}C -kollageeni, joka oli valmistettu Cawstonin ja Murphyn (Methods in Enzymology 80, 711, 1981) menetelmällä. Radioaktiivisen merkkiaineen valinta ei vaikuttanut kollagenaasin kykyyn hajottaa kollageenisubstraattia. Näytteet lingottiin hajoamattoman kollageenin saostamiseksi, ja radioaktiivisesta päällä olevasta nesteestä otettiin alikvootti, josta tuikelaskurilla saatua arvoa pidetään hydrolyysin mittana. Kollagenaasiaktiivisuutta inhibiittorin läsnä ollessa konsentraationa 1 mM tai sen laimennuksena verrattiin inhibiittoria sisältämättömän kontrollin aktiivisuuteen ja tulokset ilmoitettiin inhibiittorin konsentraationa, joka pystyi 50-%:isesti inhiboimaan kollagenaasia (IC_{50}).

Esimerkki B

20 Stromelysiini-inhibitioaktiivisuus

Yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden kyky toimia stromelysiinin inhibiittoreina määritettiin menetelmällä, jonka ovat kehittäneet Cawston et al. (Biochem. J. 195, 159 - 165, 1981); siinä testattavan inhibiittorin 1 mM liuosta tai sen laimennuksia inkuboitiin 37 °C:ssa 16 tuntia stromelysiinin ja ^{14}C -asetyloidun kaseiinin kanssa (puskurina 50 mM tris, pH 7,6, joka sisälsi 5 mM CaCl_2 , 0,05 % Brij 35 ja 0,02 % NaN_3). Kaseiini oli ^{14}C -asetyloitu Cawstonin et al. (ks. edellä) menetelmällä. Stromelysiiniaktiivisuutta inhibiittorin läsnä ollessa konsentraationa 1 mM tai sen laimennuksena verrattiin inhibiittoria sisältämättömän kontrollin aktiivisuuteen ja tulokset ilmoitettiin inhibiittorin konsentraationa, joka pystyi 50-%:isesti inhiboimaan stromelysiiniä (IC_{50}).

Esimerkki C**Gelatinaasi-inhibitioaktiivisuus**

Yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden kyky toimia gelatinaasin inhibiittoreina määritettiin menetelmällä, jonka ovat kehittäneet Harris ja Krane (Biochem. Biophys. Acta 258, 566 - 576, 1972); siinä testattavan inhibiittorin 1 mM liuosta tai sen laimennuksia inkuboitiin 37 °C:ssa 16 tuntia gelatinaasin ja kuumentamalla denaturoidun ³H- tai ¹⁴C-asetyloidun kollageenin kanssa (puskurina 50 mM tris, pH 7,6, joka sisälsi 5 mM CaCl₂, 0,05 % Brij 35 ja 0,02 % NaN₃). ³H- tai ¹⁴C-gelatiini valmistettiin Cawstonin ja Murphyn (ks. edellä) menetelmällä. Hajoamaton gelatiini saostettiin lisäämällä trikloorietikkahappoa ja lingottiin. Gelatinaasiaktiivisuutta inhibiittorin läsnä ollessa konsentraationa 1 mM tai sen laimennuksena verrattiin inhibiittoria sisältämättömän kontrollin aktiivisuuteen ja tulokset ilmoitettiin inhibiittorin konsentraationa, joka pystyi 50-%:isesti inhiboimaan gelatinaasia (IC₅₀).

20

Esimerkki D**TNFA:n tuottamisen inhibointi**

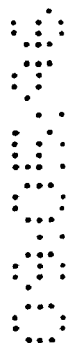
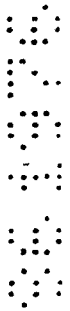
Yleisen kaavan (I) mukaisten yhdisteiden kyky toimia TNFA:n tuottamisen inhibiittoreina määritettiin seuraavalla menetelmällä. Testattavan inhibiittorin 1 mM liuosta tai sen laimennuksia inkuboitiin 37 °C:ssa 5 % CO₂:a sisältävässä ilmakehässä suspension kanssa, joka sisälsi RPMi 1640 -väliaineessa solutiheytenä 2 x 10⁶/ml U937-soluja (ihmisen histiosyytti-imusolukasvainsoluja) ja stimulointiin käytettiin PMA:ta loppukonsentraationa 50 nM. 18 tunnin kuluttua päällä olevasta nesteestä määritettiin TNFA-tasot käyttäen kaupallisesti saatavaa ELISA-testipakkausta (R & D Systems). Aktiivisuutta inhibiittorin läsnä ollessa konsentraationa 1 mM tai sen laimennuksena verrattiin inhibiittoria sisältämättömän kontrollin aktiivisuuteen ja tulokset ilmoitettiin inhibiittorin konsen-

35

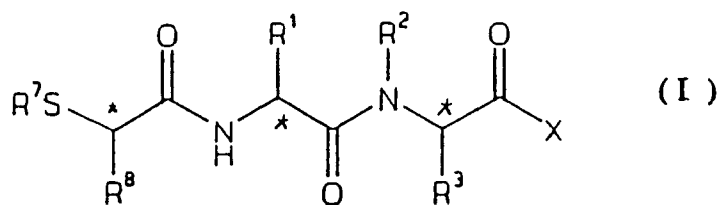
traationa, joka pystyi 50-%:isesti inhiboimaan TNF:n tuottamista.

Keksinnön mukaisilla yhdisteillä on aktiivisuutta mitattuna jollakin tai kaikilla esimerkkien A - D menetel-

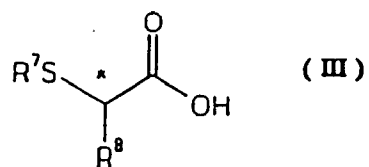
5 millä.



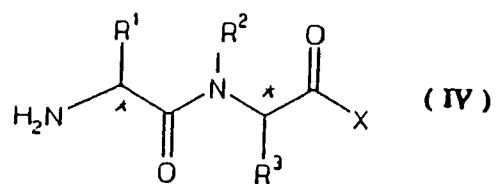
5



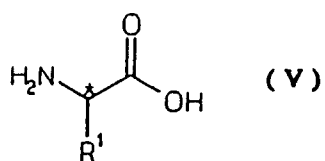
10



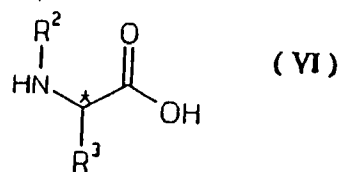
+



15

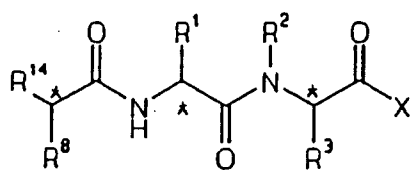


+



20

25

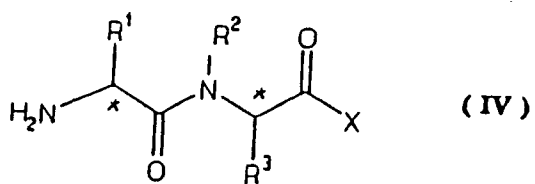


+

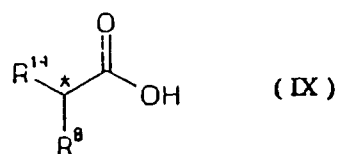


30

35



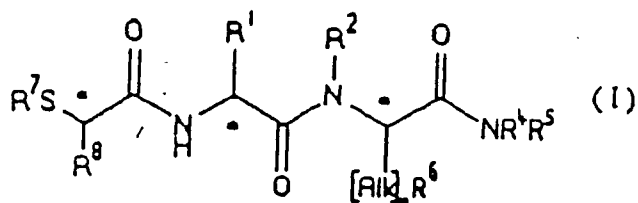
+



Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, jonka kaava on I

5



10 jossa

R^1 on C_{2-6} -alkyyli, C_{2-6} -alkenyyl, aryyli, (C_{1-6} -alkyyli)aryyli tai C_{1-6} -alkyyli- AR^9 , jossa A on O, NR^9 tai $\text{S}(\text{O})_m$, jossa $m = 0 - 2$ ja kumpikin R^9 on H, C_{1-4} -alkyyli, aryyli tai (C_{1-4} -alkyyli)aryyli;

15 R^2 on H tai C_{1-6} -alkyyli;

joko R^4 on H tai C_{1-6} -alkyyli, jossa on mahdollisesti substituenttina amino (NH_2), aryyliamino, suojattu amino, aryyli, di(C_{1-6} -alkyyli)amino, mono(C_{1-6} -alkyyli)amino, CO_2H , suojattu karboksyyli, karbamoyyli, mono(C_{1-6} -alkyyli)karbamoyyli, di(C_{1-6} -alkyyli)karbamoyyli ja R^5 on H tai C_{1-6} -alkyyli, tai NR^4R^5 on pyrrolidino, piperidino tai morfolino;

20 R^6 on mahdollisesti substituoitu C_{3-6} -sykloalkyyli, C_{3-6} -sykloalkenyyl, C_{1-6} -alkyyli, bentsyyli, (C_{1-6} -alkoksi)bentsyyli, bentsyylioksibentsyyli tai 3-indolyylimetyyli;

Alk on C_{1-6} -alkyyli tai C_{2-6} -alkenyyl ja $n = 0$ tai 1;

R^7 on H tai R^{10}CO , jossa R^{10} on C_{1-4} -alkyyli, (C_{1-4} -alkyyli)aryyli, C_{3-6} -sykloalkyyli, (C_{3-6} -sykloalkyyli) C_{1-4} -alkyyli, C_{2-6} -alkenyyl, tai (C_{2-6} -alkenyyl)aryyli;

30 R^8 on H, C_{1-4} -alkyyli, (C_{1-4} -alkyyli)aryyli tai aryyli;

aryyli on mahdollisesti substituoitu fenyyli- tai naftyyli-ryhmällä, ja mahdollisia substituentteja ovat halogeeni, CF_3 , C_{1-6} -alkyyli, alkoksi ja fenyyli;

35 tai sen suola, solvaatti tai hydraatti.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, jossa R^1 on alkyyli, alkenyyli, aryyli tai alkyyliaryyli; ja R^7 ja R^8 ovat molemmat H.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste valittuna seuraavista:
- 5 N-[N-(merkaptasetyyli)-L-leusyyli]-L-fenyylialaniinimetyyliamidi,
 N-(asetomerkaptoasyyli)-L-leusyyli]-L-fenyylialaniinimetyyliamidi,
- 10 2-(asetyyliitio)pentanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-(asetyyliitio)propanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-(asetyyliitio)-3-metyylibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
- 15 2-(asetyyliitio)-2-fenyyliasetyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-(asetyyliitio)-3-fenyylipropanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
- 20 2-(asetyyliitio)-4-fenyylibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 N-(asetyylimerkaptasyyli)-L-treonyyli]-L-fenyylialaniini-metyyliamidi,
 N-(asetyylimerkaptasyyli)-L-leusyyli-L-tryptofaanimetyyliamidi,
- 25 2-merkaptopentanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-merkaptopropanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-merkaptolibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-merkaptolibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
- 30 2-merkaptolibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-merkaptolibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-merkaptolibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
 2-merkaptolibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,
- 35 2-merkaptolibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,

2-merkaptto-4-fenyylibutanoyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini-N-metyyliamidi,

N-[N-(merkapttoasetyyli)-L-treonyyli-L-fenyylialaniinimetyyliamidi ja

5 N-[N-(merkapttoasetyyli)-L-leusyyli-L-tryptofaanimetyyliamidi.

4. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen yhdiste yhden enantiomeerin tai diastereomeerin muodossa tai tällaisten isomeerien seoksena.

10 5. Farmaseuttinen koostumus terapeuttiseen käyttöön, t u n n e t t u siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimusten 1 - 4 mukaista yhdistettä ja fysiologisesti hyväksyttävää laimennus- tai kantaja-ainetta.

15 6. Minkä tahansa patenttivaatimusten 1 - 4 mukaisen yhdisteen käyttö lääkkeen valmistukseen käytettäväksi matriksin metalloproteiinaasin tai TNF:n aktiivisuuteen liittyvän tautitilan estämiseen tai käsittelymiseen.

20 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että tautitila on tulehdus, kuume, sydänverisuoni-oireet, verenvuoto, koagulaatio ja akuutti faasivaste, näivetys ja anoreksia, akuutit infektiot, sokkitilat, siirteen hylkimisreaktiot, autoimmuunisairaudet, malaria, uusintaperfuusiovaurio, aivokalvontulehdus, psoriaasi, kudoksen hajoaminen, hampaanympäryskudostulehdus
25 tai ientulehdus.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että tautitila on kasvain, kasvaimen kasvu, angiogeneesi tai sekundaaristen metastaasi-invaasio.

30 9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että tautitila on nivelreuma, luu-nivel-tulehdus tai keskushermoston pesäkekovettumatauti.