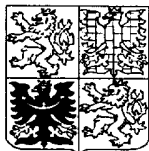


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286 106

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1994 - 2849**

(22) Přihlášeno: **18.05.1993**

(30) Právo přednosti: **20.05.1992 US 1992/886080**

(40) Zveřejněno: **15.03.1995**
(Věstník č. 3/1995)

(47) Uděleno: **16.11.1999**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US93/04680**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 93/23383**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 C 229/08

C 07 C 227/04

A 61 K 31/195

(73) Majitel patentu:

Northwestern University, Evanston,
IL, US;

(72) Původce vynálezu:

Silverman Richard B., Morton Grove, IL, US;
Andruszkiewicz Ryszard, Sopot, PL;
Yuen Po-Wai, Ann Arbor, MI, US;
Sobieray Denis Martin, Holland, MI, US;
Franklin Lloyd Charles, Hamilton, MI, US;
Schwindt Mark Alan, Holland, MI, US;

(74) Zástupce:

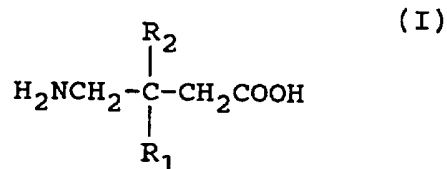
Čermák Karel JUDr., Národní 32, Praha 1,
110 00;

(54) Název vynálezu:

**Deriváty gamma-aminomáselné kyseliny,
způsoby a meziprodukty pro jejich výrobu,
jejich použití a farmaceutické prostředky**

(57) Anotace:

Deriváty gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I, kde R₁ představuje přímou nebo rozvětvenou alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylskupinu nebo cykloalkylskupinu se 3 až 6 atomy uhlíku a R₂ představuje atom vodíku nebo methylskupinu, přičemž když R₂ představuje atom vodíku, R₁ je odlišný od methylskupiny a jejich jednotlivé enantiomery a farmaceuticky vhodné soli. Způsoby a meziprodukty pro jejich výrobu, jejich použití pro výrobu léčiva pro léčení záchvatů, například záchvatů, které jsou důsledkem epilepsie, cerebrální ischemické choroby, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby nebo spastického stavu; úzkostných stavů; stavů deprese; a psychotických poruch. Farmaceutické prostředky na bázi těchto sloučenin.



CZ 286106 B6

Deriváty gamma-aminomáselné kyseliny, způsoby a meziprodukty pro jejich výrobu, jejich použití a farmaceutické prostředky

5 Oblast techniky

Vynález se týká derivátů gamma-aminomáselné kyseliny (GABA), způsobů a meziproduktů pro jejich výrobu, jejich použití pro výrobu léčiva a farmaceutických prostředků na jejich bázi. Tyto analogy jsou užitečné jako protizáchvatová činidla při léčbě poruch centrálního nervového systému, jako je epilepsie, Huntingtonova choroba, cerebrální ischemie, Parkinsonova choroba, tardivní dyskineze a spasticita. Také je možné, že by těchto látek bylo možno použít jako antidepresiv, anxiolytických a antipsychotických činidel.

15 Dosavadní stav techniky

Kyselina gamma-aminomáselná (GABA) a kyselina glutamová jsou dva hlavní neurotransmitery, které se podílejí na regulaci aktivity neuronů v mozku. GABA je hlavním inhibičním neurotransmiterem, zatímco L-glutamová kyselina je excitačním transmiterem (Roberts, E., et al., „GABA in Nervous System Function“, Raven Press: New York 1976; McGeer, E. G., et al., „Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System“, Hertz, L., Kvamme, E., McGeer, E. G., Shousbal, A., eds., Liss: New York 1983, 3 až 17). Nerovnováha v koncentraci těchto neurotransmiterů může vést ke konvulsivním stavům. V důsledku toho je z klinického hlediska výhodné mít schopnost regulovat konvulsivní stavy prostřednictvím regulace metabolismu tohoto neurotransmiteru. Když se koncentrace GABA v mozku sníží pod prahovou hodnotou, dojde ke vzniku konvulsí (Karlsson, A., et al., Biochem. Pharmacol. 1974, 23: 3053 a 3061). Když se hladina GABA v mozku v průběhu konvulsí zvýší, záchvat skončí (Hayashi, T. J., Physiol. (Londýn) 1959, 145: 570 až 578). Pod označením „záchvat“, jako se ho používá v tomto popisu, se rozumí nadměrná nesynchronizovaná neuronální aktivita, která narušuje normální funkci neuronů.

Při některých záchvatech doprovází sníženou hladinu GABA v mozku rovněž snížená úroveň aktivity L-glutamová kyselina dekarboxylasy (GAD) (Mc Geer, P. O., et al., v GABA in Nervous System Function; Roberts, E., Chase, T. N., Tower, D. B., eds., Raven Press: New York 1976: 487 až 495; Butterworth, J., et al., Neurochem. 1983; 41: 440 až 447; Spokes, E. G., Adv. Exp. Med. Biol. 1978; 123: 461 až 473; Wu, J. Y., et al., Neurochem. Res. 1979; 4: 575 až 586; a Iversen, L. L., et al., Psychiat. Res. 1974; 255 až 256). Často se koncentrace GAD a GABA mění paralelně, poněvadž snížená koncentrace GAD má za následek nižší produkci GABA.

S ohledem na důležitost GABA, jakožto inhibičního neurotransmiteru, a její účinek na konvulsivní stavy a jiné motorické dysfunkce, byly pro zvýšení koncentrace GABA v mozku provedeny různé pokusy. Tak například nejzřejmějším pokusem je podávání GABA. Když se GABA injekčně podá do mozku zvířete trpícího konvulsemi, konvulse skončí (Purpura D. P. et al., Neurochem. 1959, 3: 238 až 268). Pokud se však GABA podává systemicky, nemá žádný antikvulsivní účinek, poněvadž za normálních podmínek GABA nemůže překročit krevní bariéru v mozku (Meldrum, B. S., et al., Epilepsy, Harris, P., Mawdsley, C., eds., Churchill, Livingstone: Edinburg 1974: 55). S ohledem na toto omezení byly vyvinuty tři alternativní přístupy, kterých lze použít pro zvýšení hladiny GABA.

Nejčastější přístup spočívá ve vyvinutí sloučeniny, která je schopna překročit krevní bariéru v mozku a potom inaktivovat GABA aminotransferasu. Tento účinek spočívá v blokování degradace GABA a projevuje se zvýšením koncentrace GABA. Je známa řada inaktivátorů

GABA transferasy s různým mechanismem působení (Silverman, R. B., Mechanism-Based Enzyme Inactivation: Chemistry and Enzymology, sv. I a II. CRC: Boca Raton 1988).

Další přístup spočívá ve zvyšování koncentrace GABA v mozku tím, že se GABA lipofilizuje konverzí na hydrofobní GABA-amidy (Kaplan, J. P., et al., G. J. Med. Chem., 1980, 23: 702 až 704, Carvajal G., et al., Biochem. Pharmacol. 1964, 13: 1059 až 1069; Imine: Kaplan, J. P., Ibid); nebo GABA-estery (Shashoua, V. E., et al., J. Med. Chem. 1984, 27: 659 až 664; a patentová přihláška PCT WO85/00520, publikovaná 14. února 1985), aby GABA mohla překročit krevní bariéru v mozku. Když takto derivatizovaná GABA vstoupí do mozku, vyžaduje pro odštěpení nosičové skupiny a uvolnění GABA přítomnost amidas nebo esteras.

Ještě další přístup spočívá ve zvýšení (25) hladiny GABA v mozku tím, že se vytvoří aktivátor GAD. Několik sloučenin bylo popsáno jako aktivátory GAD. Bylo publikováno, že antikonvulsivní činidlo, maleinimid, zvyšuje aktivitu GAD o 11 %, a díky tomu dochází ke zvýšení koncentrace GABA v substantia nigra o 38 % (Janssens de Varegeke, P., et al., Biochem. Pharmacol. 1983; 32: 2752 až 2755). Bylo též oznámeno, že antikonvulsivní léčivo, valproát sodný, aktivuje GAD a zvyšuje hladinu GABA (Loscher, W., Biochem. Pharmacol. 1982; 31: 837 až 842; Phillips, N. I., et al., Biochem. Pharmacol. 1982; 31: 2257 až 2261).

Sloučeniny podle vynálezu aktivují GAD in vitro a vykazují ochranný účinek proti záchvatům in vivo, který je závislý na podané dávce.

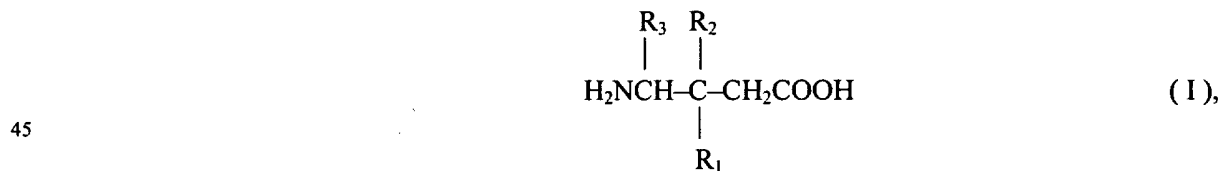
Sloučeniny podle vynálezu se také vážou k nově zjištěnému vazebnému místu, u něhož byla zjištěna schopnost vázat tritiový gabapentin. Gabapentin je účinný při léčbě nebo prevenci parciálních záchvatů u pacientů, kteří nereagují na jiná antikonvulsivní činidla. Chadwick, D., Gabapentin, str. 211 až 222, v Recent Advances in Epilepsy, sv. 5, Pedley, T. A., Meldrum, B.S., (eds.) Churchill Livingstone, New York (1991).

Nové vazebné místo značené tritiovým GABA-pentinem bylo popsáno v membránových frakcích krysí mozkové tkáně a při autoradiografických studiích řezů krysího mozku, Hill, D., ibid. Tohoto vazebného místa bylo použito pro hodnocení sloučenin podle vynálezu.

Nové sloučeniny podle vynálezu mají strukturu odpovídající obecnému vzorci I, který je uveden dále. Sloučenina obecného vzorce I, kde R_1 představuje methylskupinu a R_2 a R_3 představuje vždy atom vodíku, je známá z japonského patentu č. 49-40460.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I



kde

R_1 představuje přímou nebo rozvětvenou alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylskupinu nebo cykloalkylskupinu se 3 až 6 atomy uhlíku;

R_2 představuje atom vodíku nebo methylskupinu; a přičemž když R_2 představuje atom vodíku, R_1 je odlišný od methylskupiny

a jejich jednotlivé enantiomery a farmaceuticky vhodné soli.

5

Předmětem vynálezu je dále způsob výroby chirálních derivátů gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I, který je popsán dále.

10

Dále jsou předmětem vynálezu také určité dále popsané meziprodukty pro výrobu derivátů gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I.

15

Předmětem vynálezu jsou rovněž výše definované deriváty gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I pro použití jako léčiva pro léčení záchvatů, například záchvatů, které jsou důsledkem epilepsie, cerebrální ischemické choroby, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby nebo spastického stavu; úzkostných stavů; stavů deprese; a psychotických poruch a farmaceutické prostředky obsahující tyto sloučeniny spolu s farmaceuticky vhodným nosičem.

20

Konečně je předmětem vynálezu také použití výše definovaných derivátů gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I, jejich jednotlivých enantiomerů a farmaceuticky vhodných solí pro výrobu léčiva pro léčení záchvatů, například záchvatů, které jsou důsledkem epilepsie, cerebrální ischemické choroby, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby nebo spastického stavu; úzkostných stavů; stavů deprese; a psychotických poruch.

25

Následuje podrobnější popis tohoto vynálezu.

30

Jak již bylo uvedeno výše, vynález se týká série derivátů 3-alkyl-4-aminomáselné kyseliny, které jsou užitečné jako antikonvulsiva. Jako ilustrativní příklady alkylových zbytků představovaných symboly R_1 a R_{11} v obecném vzorci I a II, je možno uvést methylskupinu, ethylskupinu, propylskupinu, isopropylskupinu, n-butylyskupinu, isobutylyskupinu, sek.butylyskupinu, terc.butylyskupinu, isopentylskupinu a neopentylskupinu, jakož i jiné alkylové skupiny. Jako příklady cykloalkylskupin představovaných symboly R_1 a R_{11} v obecném vzorci I a II je možno uvést cyklopropylskupinu, cyklobutylyskupinu, cyklopentylskupinu a cyklohexylskupinu. V tomto popisu je dále ukázáno, že analogy podle vynálezu zabraňují vzniku záchvatů, aniž by měly vedlejší účinek projevující se ataxií. Tento vedlejší účinek má několik léčiv používaných při léčbě záchvatů.

35

V přednostním provedení představuje ve sloučeninách obecného vzorce I R_3 atom vodíku, R_2 atom vodíku a R_1 isobutylyskupinu.

40

Přednostní sloučeninou je tedy 4-amino-3-(2-methylpropyl)butanová kyselina. Zjistilo se, že tato sloučenina je při zkoušení in vivo neočekávaně účinnější, než jiné analogy syntetizované způsobem podle vynálezu. Překvapující přitom je, že, jak ukazují dále uvedená data, tato přednostní sloučenina je nejméně aktivní ze všech analogů zkoušených při aktivaci GAD in vitro. V důsledku toho nebylo možno očekávat, že tato přednostní sloučenina bude mít tak vysokou účinnost in vivo.

45

Největší přednost se ze sloučenin podle vynálezu dává (S)-(+)- a (R)-(-)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanové kyselině, přičemž vůbec největší přednost se dává (S)-(+)-enantiomeru. (S)-(+)-enantiomer je nejúčinnější sloučenina spadající do rozsahu tohoto vynálezu při vytěsňování tritiovaného gabapentinu a jak (S)-(+)-, tak (R)-(-)-enantiomer je výrazně stereoselektivní, jak při vytěsňování tritiovaného gabapentinu, tak při antikonvulsivní účinnosti in vivo.

50

Sloučeniny podle vynálezu mohou tvořit farmaceuticky vhodné soli s organickými a anorganickými kyselinami nebo bázemi. Adiční soli bazických sloučenin podle vynálezu s kyselinami se připravují tak, že se volná báze rozpustí ve vodném nebo vodně-alkoholickém rozpouštědle nebo jiném vhodném rozpouštědle obsahujícím příslušnou kyselinu a sůl se izoluje odpařením vzniklého roztoku. Jako příklady farmaceuticky vhodných solí je možno uvést hydrochloridy, hydrobromidy, hydrosulfáty atd. a soli sodné, draselné a hořečnaté atd.

Při výrobě 3-alkyl-4-aminobutanových kyselin z esterů 2-alkanových kyselin se vychází z obchodně dostupných aldehydů a monomethylmalonátu, které se podrobí Knoevenagelově reakci (Kim, Y. C. et al., J. Med. Chem. 1965: 8509) s výjimkou ethyl-4,4-dimethyl-2-pentenoátu.

Konkrétně je možno popsat obecně použitelný způsob výroby všech 3-alkylglutamových kyselin takto: 10 g 3-alkyl-5,5-diethoxykarbonyl-2-pyrrolidinonu se refluxuje ve 150 ml 49% dýmavé kyseliny bromovodíkové po dobu 4 hodin. Po této době se obsah reakční nádoby převede do odpařovačku a těkavé složky se odstraní za sníženého tlaku za použití horkovodní lázně. Průmyslový zbytek se rozpustí ve 25 ml destilované vody a voda se odpaří v odpařovačku. Tento postup se ještě jednou opakuje. Zbytek se rozpustí ve 20 ml vody a pH vzniklého roztoku se koncentrovaným roztokem amoniaku nastaví na 3,2. V tomto okamžiku délka řetězce jednotlivých 3-alkylglutamových kyselin ovlivňuje jejich rozpustnost, takže sloučeniny z delším řetězcem se z roztoku snadno vysrážejí. Vysrážení alkylglutamových kyselin s kratšími alkylovými substituenty (jako například methylskupinou, ethylskupinou nebo propylskupinou) se může vyvolat ochlazením ledovou lázní nebo zředěním vodného roztoku 100 ml absolutního ethanolu. Srážení z vodně-alkoholické směsi je ukončeno po 48 hodinách. Je třeba dát pozor na to, aby se ethanol přidával pomalu, a tak se zabránilo vysrážení amorfní pevné látky, která není charakteristická pro požadované 3-alkylglutamové kyseliny. Vzorky aminokyselin se přečistí pro analýzu překrystalováním z vodně-ethanolické směsi. Všechny získané látky tají za rozkladu. Teploty tání za rozkladu 3-alkylglutamových kyselin odpovídají teplotám tání odpovídajících pyroglutamových kyselin.

Ethyl-4,4-dimethyl-2-pentenoát se připraví reakcí 2,2-dimethylpropanolu a ethyllithioacetátu, po níž se provede dehydratace β -hydroxyesteru fosforylchloridem a pyridinem.

Michaelovou adicí nitromethanu na α,β -nenasycené sloučeniny, která je zprostředkována přítomností 1,1,3,3-tetramethylguanidinu nebo 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU) se v dobrém výtěžku získají 4-nitroestery. Konkrétně se přitom postupuje tak, že se směs nitromethanu (5 mol), α,β -nenasyceného esteru (1 mol) a tetramethylguanidinu (0,2 mol) míchá 2 až 4 dny při teplotě místnosti. (V případě methylakrylátu se ester musí přidat při teplotě pod 300.) Postup reakce se sleduje infračervenou spektroskopií (podle mizení pásu C=C) nebo plynovou chromatografií. Reakční směs se promyje zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a extrahuje etherem. Organická extrakt se vysuší, rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku a zbytek se předestiluje za tlaku 267 Pa. Přestože se alifatické nitrosloučeniny obvykle redukují buď vysokotlakou katalytickou hydrogenací, tj. hydrogenací přenosem, která je katalyzována kovy, nebo nově zavedenými hydrogenolytickými postupy za použití mravenčanu amonného nebo natriumborhydridu za přítomnosti palladiových katalyzátorů, původci tohoto vynálezu zjistili, že estery 4-nitrokarboxylových kyselin je možno téměř kvantitativně redukovat na odpovídající estery 4-aminokarboxylových kyselin hydrogenací za použití 10% palladia na uhlíku, jako katalyzátoru, v kyselině octové při teplotě místnosti a za atmosférického tlaku. Vyrobené aminoestery se podrobí kyselé hydrolýze a přitom se v dobrém výtěžku získají sloučeniny podle vynálezu. Tento postup umožňuje přístup k různým 3-alkyl-4-aminobutanovým kyselinám, jejichž příklady jsou uvedeny v tabulce 1 a 2 a je proto výhodnější ve srovnání s až dosud používanými postupy.

Následují příklady konkrétnějších způsobů výroby sloučenin podle vynálezu, při nichž se popřípadě používá postupů, které byly podrobně popsány výše. Pokud výchozí látka není obchodně dostupný, je možno syntetickou sekvencí zahájit za použití odpovídajícího alkoholu, který se oxiduje na aldehyd způsobem popsaným v Corey, E. J., et al., Tetrahedron Lett. 1975: 2647 až 2650.

Chirální sloučeniny obecného vzorce I a II se připravují způsobem, který je znázorněn ve schématu I. Přestože se schéma I vztahuje k chirální syntéze specifické sloučeniny, (S)-(+)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanové kyseliny, odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že tohoto způsobu syntézy je možno použít pro jakékoliv diastereomerní sloučeniny obecného vzorce I a II. Ve schématu I Ph představuje fenylyskupinu, Bn představuje benzylskupinu, THF znamená tetrahydrofuran, LDA znamená lithiumpdiisopropylamid, BH_3Sme_2 znamená komplex boranu s dimethylsulfidem, TsCl znamená tosylchlorid a DMSO znamená dimethylsulfoxid.

Podrobný syntetický postup je uveden dále v příkladu 1. Klíčový literární úvod, který se vztahuje k této metodologii, je uveden v Evansově publikaci, J. Am. Chem. Soc. 1982; 104: 1737 až 1739. Enolát kovu se může připravit za použití lithiumpamidové nebo natriumpamidové báze a potom se alkyluje za vzniku substituovaného derivátu karboxylové kyseliny. Tento postup je cenný pro enantioselektivní syntézu těchto α -substituovaných derivátů karboxylových kyselin. Ve výše citované základní práci popisuje Evans přípravu derivátů kyseliny propionové za použití série jednoduchých alkylačních činidel. Změnami stereochemie chirálního synthonu (oxazolidinonu) dosahuje Evans vysoké stereoselektivity.

Evans použil této chirální pomocné látky i při jiných syntetických studiích, ale žádná z nich se nevztahuje ke 4-amino-3-(2-methylpropyl)butanové kyselině, obsahující β -substituovanou-gama-aminokyselinu. Evansův postup je zaměřen na α -substituované a nikoliv β -substituované deriváty a nebylo ho použito pro přípravu neobvyklé aminokyseliny tohoto typu. N-acyloxazolidinonů bylo použito pro přípravu chlortitaniumenolátů. Tyto enoláty byly dále podrobeny reakci s Michaelovými adukty, jako aduktem akrylonitrilu (J. Org. Chem. 1991; 56: 5750–2). Těchto látek bylo použito při syntéze rutamycinové třídy antibiotik (J. Org. Chem. 1990; 55: 6260 až 6268) a při stereoselektivních aldolových kondenzacích (Org. Synth. 1990; 68: 83 až 91). Oxazolidinonovou cestou byly připravovány chirální α -aminokyseliny. Při této reakční sekvenci se dibutylborenolát bromuje a potom podrobí vystěšňovací reakci s azidem (Tetrahedron Lett. 1987; 28: 1123 až 1126). Také byly publikovány jiné syntetické postupy vedoucí k β -hydroxy- α -aminokyselinám za použití této chirální pomocné látky, prostřednictvím aldolové kondenzace (Tetrahedron Lett., 1987; 28: 39 až 42; J. Am. Chem. Soc., 1987; 109: 7151 až 7157). Pro zavedení chiralit při Diels-Alderově reakci bylo také použito α,β -nenasycených N-acyloxazolidinonů (J. Am. Chem. Soc., 1988; 110: 1238 až 1256). V žádném z výše uvedených příkladů ani v jiných příkladech nalezených v literatuře nebylo této metodologie použito pro přípravu β -substituovaných karboxylových kyselin nebo 3-substituovaných analogů GABA.

Při jiném provedení tohoto vynálezu se chirální sloučeniny obecného vzorce I a II mohou připravovat způsobem, který se podobá syntéze znázorněné ve schématu I. Při tomto provedení se však stupeň 8 ve schématu I nahradí alternativním dvoustupňovým postupem, který je popsán dále, v příkladu 2. Místo toho, že by se azid (8) redukoval na aminokyselinu (9), jak je to uvedeno ve schématu I, může se azid (8) o sobě známým způsobem hydrolyzovat na intermediární azid (8a) a teprve tento intermediární azid (8a) se podrobí redukci na aminokyselinu (9), jak je to popsáno ve schématu Ia.

Postup, při němž se azid (8) nejprve redukuje na intermediární azid (8a) a teprve potom se provede redukce, má tyto dvě hlavní výhody: předně je možno intermediární azid (8a) čistit extrakcí do vodné báze. Po okyselení vodného extraktu se může intermediární azid (8a)

extrahovat do organické fáze a izolovat. To umožňuje čištění intermediárního azidu (8a), které nevyžaduje chromatografii. Čištění azidu (8) je třeba provádět chromatograficky, což je nákladné a ve velkém měřítku často nepraktické.

- 5 Druhou výhodou je, že intermediární azid (8a) je možno redukovat na aminokyselinu (9) bez toho, že by bylo nutno přidávat kyselinu. Redukce azidu (8) vyžaduje pro získání aminokyseliny (9) přídavek kyseliny, například kyseliny chlorovodíkové. Přítomnost kyseliny však naneštěstí podporuje cyklizaci aminokyseliny (9) za vzniku laktamu. Intermediární azid (8a) je možno
10 redukovat za téměř neutrálních podmínek na aminokyselinu (9), což má za následek minimalizaci problémů spojených s tvorbou laktamu.

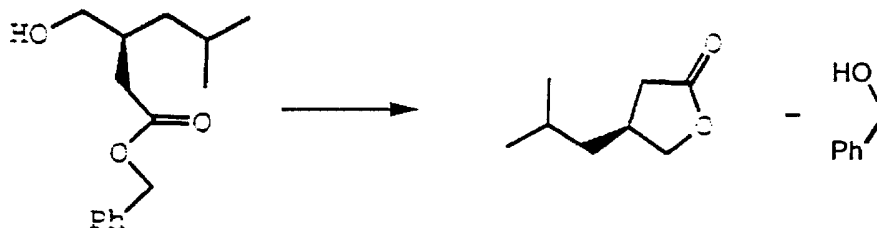
- Při jiném přednostním provedení tohoto vynálezu se chirální sloučeniny obecného vzorce I a II mohou připravovat způsobem, který je znázorněn ve schématu II. Přestože je ve schématu II znázorněna chirální syntéza specifické sloučeniny, tj. (S)-(+)-4-amino-3-(2-methylpropyl)-
15 butanové kyseliny, odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že je této metody syntézy možno použít pro jakoukoliv diastereomerní sloučeninu obecného vzorce I a II.

Ve schématu II Ph představuje fenylyskupinu a Ts představuje tosylskupinu.

- 20 Podrobně je tento syntetický postup popsán dále v příkladu 3. Tento postup se podobá způsobu syntézy, který je znázorněn ve schématu I, používá se však při něm místo benzylesteru terc.butylesteru. Požadovaná aminokyselina (9) ve schématu I a (109) ve schématu II je stejná.

- Použití terc.butylesteru místo benzylesteru při syntéze aminokyseliny (9) nebo (109) má několik
25 výhod. První výhodou se týká hydrolyzy chirální pomocné látky ve stupni 4 schématu I. Během hydrolyzy chirální pomocné látky dochází často v určitém rozsahu k hydrolyze benzylesteru. Hydrolyza terc.butylesteru (viz schéma II) nebyla zaznamenána.

- Další výhodou se vztahuje k použití alkoholu (106) ve schématu II místo alkoholu (6) ve
30 schématu I. Problémem benzylester-alkoholu je jeho sklon k laktonizaci, znázorněné dále. Přestože je možno laktonizaci benzylester-alkoholu zabránit za určitých podmínek, je použití terc.butylester-alkoholu výhodnější, poněvadž tato látka má podstatně nižší sklon k laktonizaci.



- 35 Ještě další výhodou, která již byla prodiskutována v souvislosti se syntetickým postupem znázorněným ve schématu Ia, je, že syntetický postup za použití terc.butylesteru vede k minimální cyklizaci výsledného produktu, tj. aminokyseliny, na laktam. Místo toho, že by se azid (108) redukoval na aminokyselinu (109), což vyžaduje přítomnost kyseliny, která způsobuje
40 cyklizaci aminokyseliny (109) na laktam, může se azid (108) nejprve hydrolyzovat na intermediární azid (108a). Tento intermediární azid (108a) se potom může redukovat za neutrálních podmínek na aminokyselinu (109) a při tomto postupu se problémy s tvorbou laktamu sníží na minimum.

- 45 Postupy uvedenými výše se také může vyrobit několik nových meziproduktů. Některé z těchto meziproduktů, které jsou znázorněny ve schématech I, Ia a II, zahrnují racemické formy nebo R- nebo S-enantiomerní formy následujících sloučenin:

- 4-methyl-5-fenyl-2-oxazolidinon,
 fenylmethylester 4-methyl-(2-methylpropyl)-2-dioxo-5-fenyl-3-oxazolidinbutanové kyseliny,
 4-methylpentanoylchlorid,
- 5 4-methyl-3-(4-methyl-1-oxopentyl)-5-fenyl-2-oxazolidinon,
 4-(fenylmethyl)ester 2-(2-methylpropyl)butandiové kyseliny,
 fenylmethylester 3-(azidomethyl)-5-methylhexanové kyseliny,
 fenylmethylester 3-(hydroxymethyl)-5-methylhexanové kyseliny,
 fenylmethylester 5-methyl-3-[[[(4-methylfenyl)sulfonyl]oxy]methyl]hexanové kyseliny,
- 10 3-(azidomethyl)-5-methylhexanová kyselina,
 4-(1,1-dimethylethyl)ester 2-(2-methylpropyl)-1,4-butandiové kyseliny,
 1,1-dimethylethylester 3-(azidomethyl)-5-methylhexanové kyseliny,
 1,1-dimethylethylester 3-(hydroxymethyl)-5-methylhexanové kyseliny,
 1,1-dimethylethylester 5-methyl-3-[[[(4-methylfenyl)sulfonyl]oxy]methyl]hexanové kyseliny,
- 15 a
 1,1-dimethylethylester 4-methyl-(2-methylpropyl)-2-dioxo-5-fenyl-3-oxazolidinbutanové kyseliny.

Sloučenin vyrobených výše uvedenými syntetickými postupy je možno používat v podobě farmaceutických přípravků, které se hodí jako antidepresiva, anxiolytické přípravky, antipsychotické přípravky, protizáchvatové přípravky, antidyskinetické přípravky nebo antisymptomatické přípravky v případě Huntingtonovy nebo Parkinsonovy choroby. Tyto farmaceutické přípravky obsahují účinné množství alespoň jedné z výše uvedených sloučenin, spolu s farmaceuticky vhodným nosičem. Předmětem vynálezu je tedy také farmaceutický přípravek

25 pro potlačování epileptických záchvatů, léčbu cerebrální ischemie, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby a spasticity, přičemž pravděpodobná je i možnost použití tohoto farmaceutického přípravku jako antidepresiva, anxiolytického nebo antipsychotického přípravku. Možnost použití přípravku podle vynálezu k posledně uvedeným účelům je očekávána na základě funkční podobnosti s jinými známými sloučeninami, které tyto farmakologické účinky vykazují.

30 Při léčbě výše uvedených chorob nebo poruch savců, včetně lidí, se farmaceutické přípravky podle vynálezu podávají v jednotkové dávkovací formě tak, aby bylo pacientům podáno účinné množství sloučeniny obecného vzorce I nebo II.

Sloučeniny podle vynálezu je možno zpracovávat na celou řadu dávkovacích forem vhodných pro podávání pacientům. Tak například je možno účinné látky zapracovat do inertních farmaceuticky vhodných nosičů, které mohou být buď pevné, nebo kapalné. Pevné přípravky zahrnují prášky, tablety, dispergovatelné granuláty, kapsle, oplatky a čípky. V souladu s praxí, která je v tomto oboru zavedena, je možno sloučeniny podle vynálezu zpracovávat i na jiné pevné nebo tekuté přípravky. Množství účinné sloučeniny v jednotkové dávce přípravku se může

40 měnit nebo přizpůsobovat v rozmezí od 1 do asi 300 mg/kg za den, vztaheno na pacienta s průměrnou hmotností 70 kg. Přednost se dává denní dávce v rozmezí od asi 1 do asi 50 mg/kg. Dávkování je však možno měnit v závislosti na požadavcích pacienta, závažnosti léčené choroby a konkrétně použité sloučenině. Stanovení vhodného dávkování v každé konkrétní situaci je v rozsahu zkušeností odborníka v tomto oboru.

45 Ilustrativní příklady sloučenin podle tohoto vynálezu byly zkoušeny na schopnost aktivace GAD in vitro a na protizáchvatový účinek in vivo bez doprovodného vedlejšího účinku, tj. ataxie.

Aktivace GAD in vitro

Zkoušky byly prováděny v 10 ml lahvičkách uzavřených sérovým uzávěrem, do něhož je vložena
 5 centrální jímka (Kontes, katalogové číslo 882320–000). Do centrální jímky bylo předloženo
 200 μ l čerstvě připraveného 8% roztoku hydroxidu draselného. V oddělených nádobkách byly
 při teplotě 37 °C protřepány roztoky L–glutamové kyseliny v 50mM pufru na bázi fosforečnanu
 draselného o pH 7,2 s různou koncentrací (0,5, 0,25, 0,166, 0,125 a 0,10mM) a obsahem [14 C]L–
 10 glutamátu (10 μ Ci/mmol), spolu s purifikovanou L–glutamová kyselina dekarboxylasou
 (18,75 μ g; specifická aktivita 10,85 μ mol/min mg), přičemž celkový objem směsi byl 2,00 ml. Po
 60 minutách třepání byly enzymové reakce přerušeny přidavkem 200 μ l 6M kyseliny sírové
 k obsahu každé z lahviček. Potom byly lahvičky dále třepány 60 minut při 37 °C. Centrální jímky
 byly potom vyjmuty a umístěny do scintilačních lahviček obsahujících 10 ml scintilační kapaliny
 pro měření radioaktivity. Stejně pokusy byly potom zopakovány pouze s tím rozdílem, že byly
 15 přítomny aktivátory v různé koncentraci (2,5, 1,0, 0,5, 0,25, 0,1 a 0,05mM). Z grafu závislosti
 1/cpm proti 1/[glutamát] byly potom stanoveny hodnoty V_{max} při různých koncentracích
 aktivátorů. Zjištěná data byla potom vyjádřena v %, jako (poměr V_{max} za přítomnosti aktivátoru
 k V_{max} za nepřítomnosti aktivátoru) $\times$ 100. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny v tabulce I.
 Zkoušky ukazují, že došlo k podstatné aktivaci za použití různých zkoušených sloučenin,
 20 přičemž stupeň aktivace se lišil. Zkoušení byl také podroben známý aktivátor valproát sodný a
 gabapentin.

Dále byly provedeny zkoušky in vivo, za účelem prověření schopnosti nových sloučenin zabránit
 záchvatu. Bylo použito prahového maximálního elektrického šoku, což je modelová zkouška na
 25 zvířatech pro generalizované záchvaty, která se podobá zkoušce popsané v Pirredda, S. G., et al.,
 Pharmacol. and Exptl. Therap. 1985; 232(3): 741 až 745. Metody použité při této zkoušce jsou
 popsány dále.

Samcům myši CF–1 (o hmotnosti 22 až 30 g) se nechá volný přístup k potravě a vodě v průběhu
 30 zkoušení. Pro zkoušení se vytvoří skupiny po 5 myších, kterým se podá zkoušená sloučenina
 v intravenosní dávce 30, 100 a 300 mg/kg, přičemž zkoušení se provádí 0,5, 2,0 a 4,0 hodiny po
 podání sloučeniny. Léčiva jsou rozpuštěna buď v 0,9% roztoku chloridu sodného nebo
 suspendována v 0,2% roztoku methylcelulózy. Zvířatům se uděluje šok korneální elektrodou (viz
 dále) a sledují se tonické záchvaty extensoru zadní končetiny. Nepřítomnost extenze zadní
 35 končetiny se považuje za důkaz antikonvulsivního účinku.

Zařízení pro udělování elektrického šoku uděluje šok o frekvenci 60 Hz (sinusoidní vlna)
 s proudovou amplitudou 14 mA (pík–pík) o délce 0,2 sekundy. Intenzita proudu 14 mA, které
 bylo použito při tomto postupu, vyvolala tonické záchvaty extensoru přibližně u 95 %
 40 neošetřených myší, přičemž se však jedná o hodnotu, která je jen nepatrně vyšší, než je prahová
 hodnota pro tonickou extenzi.

Přehled počtu zvířat chráněných před záchvaty při zkoušení 120 minut po podání každé
 sloučeniny je uveden v tabulce 2 pro každou zkoušenou sloučeninu (charakterizovanou v levém
 45 sloupci) a pro měnící se úroveň dávky, uvedenou ve druhém sloupci této tabulky.

Díky zajímavému jevu, který je spojen s (R,S)–isobutyl–GABA (sloučenina vykazující podstatně
 vyšší účinnost bez ataxie), byly prováděny zkoušky na myších s prahovým maximálním
 elektrickým šokem, přičemž doba zkoušení byla měněna v rozmezí od 1 do 8 hodin při
 50 intravenosní dávce 10 mg/kg. Výsledky těchto zkoušek jsou uvedeny v tabulce 3 a ukazují, že
 maximální ochrany se dosahuje po 2 hodinách.

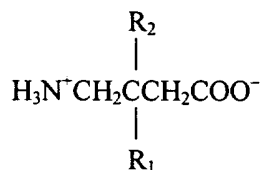
Na základě těchto výsledků byla sestrojena křivka závislosti odpovědi na dávce pro čas zkoušení 2 hodiny po intravenosní dávce myším 10 mg/kg. Výsledky této zkoušky jsou uvedeny v tabulce 4, přičemž vypočtená hodnota ED₅₀ je 2,0 mg/kg.

- 5 Třetí farmakologická zkouška byla prováděna způsobem popsaným v Krall, R. L., et al., Epilepsia, 1978; 10: 409. Při této zkoušce byla léčiva zkoušena při atenuaci prahových klonických záchvatů u myši vyvolaných subkutánním podáním pentylentetrazolu (85 mg/kg), což je obecně akceptovaný model absentujících záchvatů. Výsledky této třetí zkoušky při intravenosním nebo orálním podávání sloučenin jsou uvedeny v tabulce 5. Zkouška byla
10 prováděna při 3 úrovních dávkování a bylo při ní zjištěno, že se dosahuje účinné ochrany při dávce 30 mg/kg a 100 mg/kg, aniž by došlo k ataxii.

- Výše uvedený poznatek je velmi významný, poněvadž sloučenina vykazující nižší schopnost aktivovat GAD in vitro, byla přibližně 10 x účinnější než ostatní zkoušené sloučeniny. Ještě
15 méně očekávatelný je fakt, že toto zvýšení účinnosti není spojeno s ataxickými vedlejšími účinky.

Tabulka I

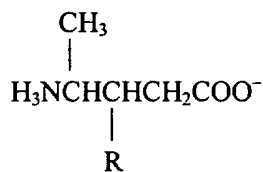
Aktivace GAD analogy GABA při různé koncentraci (%)



R ₁ ,R ₂	2,5 mM	1,0 mM	0,5 mM	0,25 mM	0,1 mM	0,05 mM
(R,S)-CH ₃ ,H	239	168	142	128	118	107
(R)-CH ₃ H	327	202	185	135	128	109
(S)-CH ₃ H	170	118	—	103	—	—
CH ₃ , CH ₃	174	125	—	109	—	—
(R,S)-C ₂ H ₅ ,H	172	128	—	108	—	—
(R,S)-n-C ₃ H ₇ ,H	156	112	—	105	—	—
(R,S)-i-C ₃ H ₇ ,H	140	108	—	104	—	—
(R,S)-n-C ₄ H ₉ ,H	178	117	—	105	—	—
(R,S)-i-C ₄ H ₉ ,H	143	113	—	109	—	—
(R,S)-s-C ₄ H ₉ ,H	169	119	—	105	—	—
(R,S)-t-C ₄ H ₉ ,H	295	174	147	121	117	108
(R,S)-neo-C ₅ H ₁₁ ,H	279	181	—	130	—	—
(R,S)-i-C ₅ H ₁₁ ,H	142	118	—	109	—	—
(R,S)-C ₆ H ₁₁ ,H	125	100	—	100	—	—
(R,S)-C ₆ H ₅ ,H	218	129	—	110	—	—

Tabulka I (pokračování)

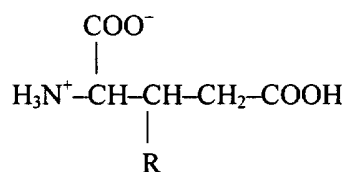
5



R	2,5 mM	1,0 mM	0,5 mM	0,25 mM	0,1 mM	0,05 mM
H(R,S)	140	111	—	104	—	—
H(R)	173	125	—	108	—	—
H(S)	100	100	—	100	—	—
CH ₃	142	121	—	109	—	—
C ₆ H ₅	207	151	—	112	—	—
valproát sodný	207	138	124	119	115	105
GABAPENTIN	178	145	—	105	—	—

10 Aktivace GAD analogy glutamátu vyjádřená v %

15



R	2,5 mM	1,0 mM	0,25 mM
CH ₃	212	144	113
C ₂ H ₅	170	128	113
n-C ₃ H ₇	153	125	108
i-C ₃ H ₇	144	114	105
n-C ₄ H ₉	133	117	105
i-C ₄ H ₉	129	112	106
C ₆ H ₅	172	135	112
valproát sodný	207	138	119

20 Tabulka 2

Prevence tonických záchvatů extensoru u myši po intravenosním podání 3-substituovaných derivátů GABA

R	Dávka (mg/kg)	Doba po dávce (min)	Účinek Počet chráněn./ počet zkoušen.	Ataxie Počet atax./ počet zkouš.
(R,S)-CH ₃	10	120	0/5	0/5
	30	120	4/5	0/5
	100	120	3/5	0/5
CH ₃	1	120	1/10	0/10
	3	120	2/10	0/10

25

Tabulka 2 - pokračování

R	Dávka	Doba po	Účinek	Ataxie
	(mg/kg)	dávce (min)	Počet chráněn./ počet zkoušen.	Počet atax./ počet zkouš.
CH ₃	10	120	4/10	0/10
	30	120	3/10	0/10
	100	120	3/10(5/10)	1/10
	10	120	1/10	1/10
	30	120	2/10	0/10
	100	120	5/10	0/10
t-C ₄ H ₉	10	120	2/10	0/10
	30	120	2/10	0/10
	100	120	5/10	0/10
C ₂ H ₅	3	120	1/5	0/5
	10	120	1/5	0/5
	30	120	2/5	0/5
	100	120	5/5	0/5
(CH ₃) ₂	30	120	4/5	0/5
	100	120	4/5	0/5
n-C ₄ H ₉	10	120	1/10	0/10
	30	120	3/10	0/10
	100	120	4/10	0/10
s-C ₄ H ₉	3	120	2/10	0/10
	10	120	3/10	0/10
	30	120	2/10	0/10
i-C ₄ H ₉	0,3	120	1/10	0/10
	0,8	120	3/10	0/10
	2,0	120	5/10	0/10
	5,5	120	7/10	0/10
	14,4	120	9/10	0/10
	3	120	2/10	0/10
n-C ₃ H ₇	10	120	2/10	3/10
	100	120	3/10	0/10
i-C ₃ H ₇	10	120	5/10	1/10
	30	120	5/10	0/10
	100	120	6/10	0/10
C ₆ H ₅	100	120	0/10	0/10
neo-C ₅ H ₁₁	10	120	2/10	0/10
	30	120	4/10	0/10
	100	120	4/10	0/10

- 5 – Korneální elektrický šok o vysoké intenzitě je tvořen proudem 50 mA se sinusoidním průběhem od základní hodnoty k maximu při trvání 0,2 sekundy. Všechna ostatní data se vztahují k elektrickému šoku o nízké intenzitě 17 mA, sinusoidní průběh od základní nulové hodnoty k maximu, délka 0,2 sekundy.

Tabulka 3

Prahový maximální elektrický šok za přítomnosti isobutyl-GABA

Čas zkoušení (h)	Počet chráněných
1	2/10
2	8/10
4	4/10
8	2/10

5

Tabulka 4

Prahový maximální elektrický šok za přítomnosti isobutyl-GABA

Dávka (mg/kg)	Počet chráněných
0,3	1/10
0,8	3/10
2,0	5/10
5,5	7/10
14,4	9/10

10

Tabulka 5

15 Data vztahující se k maximálnímu elektrickému šoku

R	Dávka (mg/kg)	Doba po dávce (min)	Účinek počet chráněných/počet zkoušených zvířat	Ataxie počet ataktických/počet zkoušených zvířat
i-C ₄ H ₉	10	120	1/5	0/5
i-C ₄ H ₉	30	120	4/5	0/5
i-C ₄ H ₉	100	120	4/5	0/5

20 Jak již bylo uvedeno výše, S-(+)-enantiomer 4-amino-3-(2-methylpropyl)butanové kyseliny (3-isobutyl GABA nebo IBG), který je strukturně podobný známému antikonvulsivnímu činidlu, gabapentinu, účinně vytěsňuje tritiovaný gabapentin z nového místa s vysokou afinitou v membránových frakcích krysího mozku. Také S-(+)-enantiomer 3-isobutyl GABA je schopen inhibovat v podstatě všechny záchvaty vyvolané maximálním elektrickým šokem u myši a krys.

25 R-(-)-enantiomer 3-isobutyl GABA je mnohem méně účinný při inhibici záchvatů vyvolaných maximálním elektrickým šokem a při vytěsňování tritiovaného gabapentinu z nového vazebného místa s vysokou afinitou. V tabulce 6 jsou uvedena srovnávací data při těchto zkouškách pro gabapentin, racemickou 3-isobutyl GABA [(±)-IBG], S-(+)-3-isobutyl GABA [(S)-IBG] a R-(-)-3-isobutyl GABA [(R)-IBG].

Tabulka 6

Zkušební systém	3-Isobutyl GABA (ED ₅₀)			
	Gabapentin	(±)-IBG	(S)-IBG	(R)-IBG
Vazba gabapentinu k receptoru (IC ₅₀)	0,14 µM	0,10 µM	0,044 µM	0,86 µM
i.v., myš, elektrický šok o nízké intenzitě	4,3 mg/Kg	4,8 mg/Kg	4,0 mg/Kg	>100 mg/Kg
i.v., myš, elektrický šok o maximální intenzitě	75 mg/Kg	10 mg/Kg	18 mg/Kg	>100 mg/Kg
p.o., myš, elektrický šok o maximální intenzitě	200 mg/Kg	47 mg/Kg	12 mg/Kg	
i.v., myš, ataxie	>100 mg/Kg (IP)	>100 mg/Kg	>300 mg/Kg	>100 mg/Kg

5 Antikonvulsivní účinnost (všech sloučenin) dosahuje maximální hodnoty 2,0 hodiny po podání dávky a z hlavní části odezní po 8 hodinách od podání dávky.

10 Data uvedená v tabulce 6 byla získána následujícím způsobem. Pro zkoušky antikonvulsivní účinnosti bylo použito samců myši kmene CF-1 (20 až 25 g) a samic krysy Sprague-Dawley (75 až 115 g) (od firmy Charles River Laboratories). Před zkoušením mají myši volný přístup k potravě a vodě. Maximální elektrický šok se zvířatům udělí korneálními elektrodami za použití konvenčních postupů (Krall, výše uvedená citace z roku 1975), pouze s tím rozdílem, že elektrický šok o nízké intenzitě je tvořen proudem 17 mA a nikoliv běžně používaným proudem o intenzitě 50 mA (od 0 k maximu). Myším se podá zkoušená látka a zjišťuje se její schopnost

15 prevence při aplikaci elektrického proudu do rohovek prostřednictvím dvou kovových elektrod zakrytých gázou nasycenou 0,9% roztokem chloridu sodného. Stimulace elektrickým šokem se provádí pomocí zařízení poskytujícího konstantní proud (90 Hz, sinusoidní průběh, 0,2 sekundy). Maximální elektrický šok u krys má intenzitu proudu 120 mA. Ataxie u myši se sleduje postupem „s obráceným sítem“. Při tomto postupu se myši jednotlivě umístí na čtverec z drátěného pletiva o délce strany 10,2 cm, které se potom obrátí (Coughenour, výše uvedená

20 citace z roku 1978). Za ataxickou se považuje každá myš, která odpadne od pletiva v průběhu 60 sekundové zkušební periody. Hodnoty ED₅₀ se stanoví analýzou probit výsledků naměřených v alespoň pěti skupinách s různou dávkou, z nichž každá zahrnuje 10 myši nebo 8 krys.

25 Všechna použitá léčiva jsou volně rozpustná ve vodném prostředí. Pro studie in vivo se používá roztoků léčiva v 0,9% roztoku chloridu sodného a tyto roztoky se podávají v objemu 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti. Intravenózní podávání se provádí injekcí bolu do retroorbitálního sinu myši. Orální podávání se provádí intragastrickou sondou.

30 Pro studie vazby byly připraveny částečně purifikované synaptické plasmové membrány z krysího neokortexu za použití hustotního gradientu sacharosy. Cerebrální kortex 10 krys se odřízne od zbytku mozku a jeden hmotnostní díl kortexu se homogenizuje v 10 objemových dílech ledově chladného 0,32M roztoku sacharosy v 5mM tris-acetátovém pufru o pH 7,4 za použití skleněného homogenizátoru s teflonovým tloučkem (10 až 15 úderů při otáčkách 200 min⁻¹). Homogenát se 10 minut odstředí při 100 x g a supernatant se oddělí a uloží na led.

35 Peleta (P1) se rehomogenizuje ve 20 ml tris-sacharosy a homogenát se znovu odstředí. Spojené supernatanty se 20 minut odstředí při 21 500 x g. Peleta (P2) se resuspenduje v 1,2M tris-

sacharose a 15 ml vzniklé směsi se vloží do zkumavky ultracentrifugy. Tato směs se převrství 10 ml 0,9M roztoku sacharosu a potom ještě poslední vrstvou 5mM tris-acetátu o pH 8,0. Odstředování se provádí 90 minut při 100 000 x g. Synaptické plasmové membrány umístěné na rozhraní 0,9/1,2M roztoku sacharosu se shromáždí, resuspendují v 50 ml 5mM tris-acetátu o pH 7,4 a odstředí při 48 000 x g. Výsledná peleta se resuspenduje v 50 ml tris-acetátu o pH 7,4 a suspenze se rozdělí na alikvotní díly, které se až do doby použití uchovávají ve zmrazeném stavu. Zkušební tkáň (0,1 až 0,3 mg proteinu) se inkubuje s 20mM [³H]-gabapentinem v 10mM pufru HEPES (pH 7,4, 20 °C, za nepřítomnosti sodíku), za přítomnosti různých koncentrací zkoušené sloučeniny po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Potom se směs za sníženého tlaku přefiltruje přes filtr GBF. Filtr se 3 x promyje 5 ml ledově chladného 100mM roztoku chloridu sodného a stanoví se počet rozpadů za minutu v látce vázané k filtru pomocí kapalinové scintilace. Nespecifická vazba je definována jako vazba pozorovaná za přítomnosti 100mM gabapentinu.

Díky účinnosti, která je demonstrována výše uvedenými zkouškami, jsou sloučeniny podle vynálezu a zvláště pak 4-amino-3-(2-methylpropyl)butanová kyselina (isobutyl GABA) cenné jako farmakologicky účinné látky, zejména pro léčbu záchvatů u savců, včetně lidí.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

25 Příklad 1

(S)-(+)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanová kyselina (jednotlivé stupně se vztahují ke schématu 1)

30 Stupeň 1

K roztoku 4-methylvalerové kyseliny (50,0 g, 0,43 mol) ve 100 ml bezvodého chloroformu se přidá thionylchlorid (60 ml, 0,82 mol). Reakční směs se 2 hodiny vaří pod zpětným chladičem a potom se ochladí na teplotu místnosti. Nadbytek chloroformu a thionylchloridu se oddestiluje. Olejovitý zbytek se podrobí frakční destilaci. Získá se 45,3 g (78 %) chloridu kyseliny (2) o teplotě varu 143 až 144 °C.

Chlorid kyseliny (2) se také může připravit alternativním postupem, při němž se nepoužívá chloroformu, což je výhodné z toho důvodu, že se vyloučí problémy s odstraňováním odpadů a expozicí obsluhy chloroformu. Při tomto alternativním postupu se také minimalizuje tvorba anhydridu 4-methylvalerové kyseliny.

K roztoku thionylchloridu (98,5 kg, 828 mol) a N,N-dimethylformamidu (2 kg, 27 mol) se přidá 4-methylvalerová kyselina (74 kg, 637 mol), přičemž reakční teplota se udržuje v rozmezí od 25 do 30 °C. Přidá se hexanová směs (30 litrů) a roztok se 1 hodinu a 15 minut udržuje při teplotě v rozmezí od 30 do 35 °C. Potom se roztok znovu zahřívá 1 hodinu a 10 minut na 70 až 75 °C. Potom se roztok destiluje za atmosférického tlaku tak dlouho, dokud teplota roztoku nedosáhne 95 °C. Směs se ochladí, přidá se k ní hexanová směs (30 litrů) a provede se nová destilace za atmosférického tlaku až do teploty roztoku 97 °C. Zbývající olej se předestiluje, a tak se získá 79 kg (92 %) chloridu kyseliny (2) o teplotě varu 77 °C za tlaku 8 až 8,7 kPa.

Stupeň 2

K roztoku (4R,5S)-(+)-4-methyl-5-fenyl-2-oxazolidinonu (5,27 g, 29,74 mmol) v 70 ml bezvodého tetrahydrofuranu se při -78°C po atmosférou argonu pomalu přidá 1,6M roztok n-butyllithia (19 ml, 30,40 mmol) v hexanové směsi. Směs se 15 minut míchá při -78°C a potom se k ní přidá chlorid kyseliny (4,5 g, 33,43 mmol), kterým se reakční směs rozloží. Vzniklá reakční směs se 10 minut míchá při -78°C a potom 30 minut při 0°C . Dále se k ní přidá nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného (50 ml) a směs se 30 minut míchá při 0°C . Organická vrstva se oddělí a vodná vrstva se extrahuje ethylacetátem (3 x). Organické extrakty se spojí a vysuší bezvodým síranem hořečnatým. Potom se vysušený spojený extrakt přefiltruje a zkoncentruje na bezbarvý olej. Tento olej se chromatografuje na silikagelu za použití 8% ethylacetátu v hexanové směsi, jako elučního činidla. Získá se 7,56 g (82 %) acyloxazolidinonu (3) ve formě bílé pevné látky.

- 15 Analýza pro $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$:
 vypočteno C, 69,79; H, 7,69; N, 5,09
 nalezeno C, 69,56; H, 7,63; N, 5,06 %.

20 Acyloxazolidinon (3) se také může připravit alternativním postupem, který se provádí při teplotě v rozmezí od -5 do 0°C . Práce při této teplotě je výhodnější než práce při -78°C , která je obtížná a nákladná ve výrobním měřítku. Při tomto alternativním postupu se také z reakční směsi získá produkt ve formě krystalické pevné látky a nikoliv ve formě oleje, který je nutno chromatografovat.

25 K roztoku 4-methyl-5-fenyl-2-oxazolidinonu (64 g, 0,36 mol) v bezvodém tetrahydrofuranu (270 g) se při -5°C přidá 15% roztok n-butyllithia v hexanu (160 g, 0,37 mol) při teplotě v rozmezí od -5 do 0°C . Ke vzniklé směsi se přidá při teplotě v rozmezí od -10 do 0°C chlorid kyseliny (2) (48,6 g, 0,36 mol). Reakční směs se rozloží roztokem hydrogenuhličitanu sodného (4 g) ve vodě (90 ml). Ke směsi se přidá ethylacetát (200 g) a oddělí se vrstvy. Organická vrstva se extrahuje vodou (2 x 50 ml) a vodné fáze se reextrahuje ethylacetátem (100 g). Organické extrakty se spojí a odstraní se z nich destilací asi 150 ml rozpouštědla. Pokračuje se v destilaci za atmosférického tlaku a potom se ke směsi přidává heptan (2 x 200 g), až teplota par dosáhne hodnoty 95°C . Roztok se ochladí na 5°C , produkt se odfiltruje, promyje chladným heptanem a vysuší. Získá se 79 g (80 %) acyloxazolidinonu (3).

35

Stupeň 3

40 K roztoku diisopropylaminu (4,8 ml, 34,25 mmol) ve 30 ml bezvodého tetrahydrofuranu se při 0°C pod argonovou atmosférou pomalu přidává 1,6M roztok n-butyllithia (21 ml, 33,60 mmol) v hexanové směsi. Roztok se 30 minut míchá při 0°C a potom se ochladí na -78°C . Dále se ke směsi přidá roztok acyloxazolidinonu (3) (7,56 g, 27,46 mmol) ve 30 ml bezvodého tetrahydrofuranu a světle žlutý roztok, který vznikne, se 30 minut míchá při -78°C . Potom se přidá benzyl- α -bromacetát a vzniklý roztok se 2 hodiny míchá při -25°C . Reakční směs se rozloží přidávkem zpola nasyceného roztoku chloridu amonného a dvakrát se extrahuje ethylacetátem. Spojené organické vrstvy se vysuší bezvodým síranem hořečnatým a přefiltrují. Filtrát se zkoncentruje, a tak se získá bezbarvý olej. Tento olej se chromatografuje na silikagelu za použití 8% ethylacetátu v hexanové směsi jako elučního činidla. Získá se 6,16 g (53 %) acyloxazolidinonu (4) ve formě bílé pevné látky.

- 50 Analýza pro $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_5$:
 vypočteno C, 70,90; H, 6,90; N, 3,31
 nalezeno C, 70,47; H, 6,87; N, 3,45 %.

Acyloxazolidinon (4) je také možno připravit alternativním postupem, který je výhodný v tom, že se reakce může provádět při vyšší teplotě (–35 až –25 °C) a nikoliv při teplotě –78 °C. Tento alternativní postup je méně nákladný a vyloučí se při něm obtížná chromatografická separace.

- 5 Acyloxazolidinon (3) (85 kg, 308 mol) se rozpustí v bezvodém tetrahydrofuranu (201 kg) a roztok se ochladí na –30 °C. K tomuto roztoku se přidá lithiumpdiisopropylamid (340 mol) ve směsi methyl–terc.butyletheru a hexanu, přičemž reakční teplota se udržuje v rozmezí od –35 do –25 °C. Potom se přidá benzylbromacetát (85 kg, 371 mol), přičemž reakční teplota se udržuje v rozmezí od –35 do –25 °C. Dále se ke směsi přidá voda (60 kg) a methyl–terc.butylether
10 (93 kg) a směs se nechá ohřát na 18 °C. Oddělí se vrstvy a organická vrstva se extrahuje roztokem chloridu sodného (7 kg) ve vodě (40 litrů). Oddělí se vrstvy a organická vrstva se destilací zkoncentruje na 200 litrů. Ke zbytku se přidá isopropylalkohol (200 ml) a vzniklý roztok se znovu zkoncentruje destilací na 200 litrů. Přidá se isopropylalkohol (425 litrů) a voda (160 litrů) a směs se zahřeje na 50 °C. Vzniklý roztok se ochladí na 18 °C. Vyloučený produkt se
15 odfiltruje, promyje směsí isopropylalkoholu a vody a vysuší za sníženého tlaku. Získá se 58,7 kg (výtěžek 49 %) acyloxazolidinonu (4) ve formě pevné látky.

Stupeň 4

- 20 K předchlazenému (0 °C) roztoku acyloxazolidinonu (4) (24,3 g, 57,38 mmol) v 600 ml tetrahydrofuranu se v průběhu 20 minut přidá 30% roztok peroxidu vodíku (23,7 ml) ve 320 ml 0,2M roztoku hydroxidu lithného za použití kapací nálevky. Reakční směs se 4 hodiny míchá při 0 °C a potom se k ní pomalu přidá roztok metahydrogensířičitanu sodného (62,2 g, 0,33 mol) ve 320 ml vody, aby se reakční směs rozložila. Směs se 20 minut míchá při 0 °C a potom se
25 nadbytek tetrahydrofuranu odstraní v rotačním odpařováku. Vodný zbytek se extrahuje ethylacetátem (3 x 350 ml). Spojené organické extrakty se vysuší bezvodým síranem hořečnatým a potom přefiltrují. Filtrát se zkoncentruje a olejovitý zbytek se chromatografuje na silikagelu za použití 40% ethylacetátu v hexanu jako elučního činidla. Získá se 13,34 g (88 %) kyseliny (5) ve formě čirého oleje. Potom se sloupec eluuje 50% ethylacetátem v hexanu, aby se získala
30 oxazolidinonová chirální pomocná látka.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) kyseliny (5): δ 9,80 (br s, 1H), 7,36 (m, 5H), 5,24 (úzký ABq, 2H, J_{AB} = 11,4 Hz), 2,80 (m, 1H), 2,63 (ABX, 2H, J_{AB} = 16,75 Hz, J_{AB} = 9,13 Hz, J_{BX} = 5,16 Hz, U_{AB} = 73,20 Hz), 1,66 (m, 2H), 1,33 (m, 1H), 0,93 (d, 3H, J = 7,32 Hz), 0,91 (d, 3H, J = 6,45 Hz).

- 35 Při alternativním postupu se po zkoncentrování reakční směsi na olejovitý zbytek přidá hexan nebo heptan, aby se vysrážela oxazolidinonová chirální pomocná látka. Odfiltrováním se oddělí chirální pomocná látka s 80% výtěžkem. Hexanový nebo heptanový filtrát obsahující kyselinu (5) se potom extrahuje buď vodným roztokem ethanolu, nebo teplou vodou, aby se odstranil
40 zbytek chirální pomocné látky. Tento alternativní postup umožňuje vyhnout se nákladnému a obtížnému chromatografickému oddělování chirální pomocné látky od kyseliny (5).

Stupeň 5

- 45 K roztoku kyseliny (5) (13,34 g, 50,47 mmol) ve 460 ml bezvodého tetrahydrofuranu se při 0 °C pod argonovou atmosférou pomalu přidá komplex boranu s dimethylsulfidem (10M, 11,2 ml, 112,0 mmol). Reakční směs se 30 minut míchá při 0 °C a potom 4 hodiny při teplotě místnosti. Potom se reakční směs ochladí na 0 °C a pomalu se k ní přidá 250 ml methanolu. Směs se 30 minut míchá při 0 °C a nadbytek rozpouštědla se odstraní za sníženého tlaku. Zbývající olej se
50 chromatografuje na silikagelu za použití 15% ethylacetátu v hexanové směsi, jako elučního činidla. Získá se 10,59 g (84 %) alkoholu (6) ve formě bezbarvého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,37 (m, 5H), 5,14 (s, 2H), 3,57 (ABX, 2H, J_{AB}=10,99 Hz, J_{AX}=4,34 Hz, J_{BX}=6,85 Hz, ν_{AB}=51,71 Hz), 2,42 (ABX, 2H, J_{AB}=15,26 Hz, J_{AX}=7,60 Hz, J_{BX}=5,56 Hz, ν_{AB}=18,81 Hz), 2,15 (m, 1H), 1,87 (br s, 1H), 1,63 (m, 1H), 0,93 (m, 2H), 0,88 (d, 3H, J=6,15 Hz), 0,87 (d, 3H, J=6,45 Hz).

5

Stupeň 6

K roztoku alkoholu (6) (10,22 g, 40,82 mmol) v 50 ml bezvodého pyridinu se při 0 °C přidá tosylchlorid (8,60 g, 45,11 mmol). Reakční směs se 15 minut míchá při 0 °C a potom se nechá stát přes noc v lednici při 4 °C. Reakční směs se zředí 160 ml ethylacetátu a 100 ml vody. Potom se směs ochladí na 0 °C v lázni z ledu a vody a pomalu se k ní přidá koncentrovaná kyselina chlorovodíková, aby se zneutralizoval nadbytek pyridinu (až do pH 2). Organická vrstva se oddělí a vodná vrstva se extrahuje ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené organické vrstvy se vysuší bezvodým síranem hořečnatým a přefiltrují. Filtrát se zkoncentruje a vzniklý světle žlutý olej se chromatografuje na silikagelu za použití 10% ethylacetátu v hexanové směsi, jako elučního činidla. Získá se 14,44 g (87 %) tosylátu (7) ve formě bezbarvého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,77 (d, 2H, J=8,27 Hz), 7,34 (m, 7H), 5,07 (s, 2H), 4,00 (ABX, 2H, J_{AB}=9,77 Hz, J_{AX}=4,07 Hz, J_{BX}=5,69 Hz, ν_{AB}=27,58 Hz), 2,44 (s, 1H), 2,44–2,20 (m, 3H), 1,46 (m, 1H), 1,28–1,02 (m, 2H), 0,81 (d, 6H, J=6,58 Hz).

Tosylát (7) se také může připravit z kyseliny (5) alternativním postupem. Tento postup je výhodnější než předešlý postup, poněvadž se při něm minimalizuje množství β-isobutylgamma-laktonu, vznikajícího jako vedlejší produkt při výše uvedené reakci.

25

Roztok kyseliny (S) (22,3 kg, 84,4 mol) v methyl-terc.butyletheru (198 kg) se ochladí na –6 °C. Ke vzniklému roztoku se přidá komplex boranu s methylsulfidem (15,6 kg, 177 mol), přičemž teplota reakční směsi se udržuje na 20 °C a míchá po dobu 2 hodin. Dále se směs ochladí na 0 °C, přidá se k ní methanol (24 litrů) a reakční teplota se udržuje na 5 °C nebo na hodnotě nižší. Potom se přidá voda (132 litrů) při teplotě 15 °C nebo nižší. Oddělí se fáze a vodná fáze se extrahuje methyl-terc.butyletherem (27 kg). Organické fáze se spojí a extrahují vodou (72 litrů). Roztok se zkoncentruje na olejovitý zbytek destilací a ke zbytku se přidá ethylacetát (23 kg). Vzniklý roztok se znovu zkoncentruje destilací na olej, a tak se získá alkohol (6). Přidá se pyridin (53 kg). Roztok se ochladí na 1 °C a přidá se k němu p-toluensulfonylchlorid (23 kg, 121 mol), přičemž reakční teplota se udržuje na hodnotě v rozmezí od –5 do 5 °C. Směs se 8 hodin míchá při 2 °C a potom se zahřeje na 20 °C. Přidá se voda (12 litrů), přičemž teplota reakční směsi se udržuje na 23 °C nebo na hodnotě nižší. Směs se ochladí na 1 °C a přidá se k ní vodná kyselina chlorovodíková (52 kg koncentrované kyseliny v 63 litrech vody). Dále se přidá methyl-terc.butylether (296 kg) a směs se zahřeje na 18 °C. Oddělí se fáze a vodná fáze se extrahuje methyl-terc.butyletherem (74 kg). Organické fáze se spojí a extrahují vodnou kyselinou chlorovodíkovou (0,6 kg koncentrované kyseliny chlorovodíkové ve 20 litrech vody), vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2,7 kg hydrogenuhličitanu sodného v 50 litrech vody) a vodou (30 litrů). Organický roztok se zkoncentruje destilací na olejovitý zbytek. K tomuto zbytku se přidá methyl-terc.butylether (19 kg) a směs se znovu zkoncentruje na olejovitý zbytek. Výsledný produkt se rozpustí v methyl-terc.butyletheru (37,9 kg) a uchovává se v podobě roztoku. Hmotnostní obsah tosylátu (7) obsaženého v methyl-terc.butyletherovém roztoku je 30,1 kg (výtěžek 88 %).

Stupeň 7

50

Směs tosylátu (7) (14,44 g, 35,70 mmol) a natriumazidu (5,50 g, 84,59 mmol) ve 180 ml bezvodého dimethylsulfoxidu se přes noc zahřívá na 65 °C. Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti a přidá se k ní 900 ml vody. Vzniklá směs se extrahuje (4 x) celkem 2 litry hexanové

směsi. Spojené organické extrakty se vysuší bezvodým síranem hořečnatým a přefiltrují. Filtrát se zkoncentruje a zbývající olej se chromatografuje na silikagelu za použití 8% ethylacetátu v hexanové směsi, jako elučního činidla. Získá se 8,55 g (87 %) azidu (8), v podobě bezbarvého oleje.

5

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,37 (m, 5H), 5,14 (s, 2H), 3,33 (ABX, 2H, $J_{\text{AB}}=12,27$ Hz, $J_{\text{AX}}=4,95$ Hz, $J_{\text{BX}}=6,10$ Hz, $\nu_{\text{AB}}=22,87$ Hz), 2,39 (m, 2H), 2,19 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 1,20 (m, 2H), 0,88 (d, 6H, $J=6,44$ Hz).

10 Stupeň 8

K roztoku azidu (8) (8,55 g, 31,05 mmol) v 500 ml tetrahydrofuranu se přidá 62 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a 1 g 10% palladia na uhlíku, jako katalyzátoru. Směs se třepe přes noc při teplotě místnosti v Parrově zařízení. Katalyzátor se odfiltruje přes vrstvu celitu. 15 Filtrát se zkoncentruje a ke zbytku se přidá 50 ml 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové. Vodný roztok se promyje etherem (3 x 50 ml). Vodná vrstva se shromáždí a potom chromatografuje na sloupci Dowex 50Wx8 ve vodíkovém cyklu, přičemž eluce se provádí 0,5N vodným roztokem hydroxidu amonného. Frakce obsahující aminokyselinu (minhydrin–pozitivní frakce) se spojí a lyofilizují. Získá se 3,2 g (65 %) aminokyseliny (9) ve formě bílé pevné látky o 20 teplotě tání 175 až 176 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = 10,520^\circ$ (1,06, voda).

Příklad 2

25 (S)–(+)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanová kyselina

Tato sloučenina se připraví stejným způsobem, jaký je popsán v příkladu 1, pouze s tím rozdílem, že se aminokyselina (9) připraví z azidu (8) dvoustupňovým postupem, při němž se používá intermediárního azidu (8a), který se teprve podrobí redukci (jednostupňový redukční 30 postup, označený jako stupeň 8, je popsán výše). Syntetický postup uvedený v příkladu 2 je znázorněn ve schématu Ia.

Stupeň 1: Příprava intermediárního azidu (8a)

35 Azid (8) (10,7 g, 0,040 mol) v ethanolu (100 ml) a vodě (20 ml) se smíchá s 50% vodným roztokem hydroxidu sodného (9,8 g). Směs se 45 minut míchá při teplotě 30 °C. Hmotnost směsi se oddestilováním ethanolu za sníženého tlaku sníží na 30 g kapalného zbytku, přidá se voda (100 ml) a směs se extrahuje methyl–terc.butyletherem (4 x 100 ml). Methyl–terc.butyletherové 40 extrakty se extrahují 1M roztokem hydroxidu sodného a vodné fáze se spojí a okyselí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 1,6. Vodná směs se extrahuje methyl–terc.butyletherem (2 x 100 ml) a organické extrakty se spojí a zkoncentrují za sníženého tlaku. Výsledný olej se rozpustí v heptanu (50 ml) a roztok se extrahuje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlčitanu sodného (2 x 40 ml). Vodné extrakty se extrahují heptanem (50 ml), spojí se a okyselí na pH 1,6 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vodná směs se extrahuje 45 heptanem (2 x 50 ml). Heptanové extrakty se extrahují vodou (40 ml), spojí a zkoncentrují za sníženého tlaku. Získá se 5,4 g (75 %) intermediárního azidu (8a) ve formě oleje.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 10,8 (br s, 1H), 3,36 (m, 2H), 2,38 (m, 2H), 2,18 (m, 1H), 1,64 (m, 1H), 1,25 (m, 2H), 0,91 (d, 6H, $J=6,56$ Hz).

Stupeň 2: Syntéza aminokyseliny (9) z intermediárního azidu (8a)

Intermediární azid (8a) (12,7 g, 68,6 mol) se rozpustí v methyl-terc.butyletheru (80 kg). Směs se katalyticky hydrogenuje za přítomnosti 5% palladia na uhlíku (2,0 kg, 50% produktu zvlhčeného vodou) za tlaku vodíku 337 až 338 kPa, až do spotřebování intermediárního azidu (8a). Směs se přefiltruje a pevná látka se promyje methyl-terc.butyletherem (30 kg). Pevná látka se rozpustí v horkém roztoku isopropylalkoholu (75 kg) ve vodě (60 kg) a vzniklý roztok se přefiltruje. Roztok ve směsi isopropylalkoholu a vody se ochladí na $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a produkt se odfiltruje a promyje chladným isopropylalkoholem (16 kg). Pevná látka se vysuší za sníženého tlaku, a tak se získá 6,4 kg (59 %) aminokyseliny (9).

Tato redukce se může provádět v různých rozpouštědlech. Úspěšně byla tato redukce provedena v heptanu, směsi ethanolu a vody, isopropylalkoholu, směsi isopropylalkoholu a vody, směsi methanolu a vody, směsi tetrahydrofuranu a vody a v methyl-terc.butyletheru.

Příklad 3

(S)-(+)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanová kyselina

Reakční stupně uváděné v tomto příkladu se vztahují ke schématu II. Všechny reakce se provádějí pod atmosférou dusíku.

Stupeň 1

K roztoku 4-methylvalerové kyseliny (50,0 g, 0,43 mol) ve 100 ml bezvodého chloroformu se přidá thionylchlorid (60 ml, 0,82 mol). Reakční směs se 2 hodiny vaří pod zpětným chladičem a potom se ochladí na teplotu místnosti. Nadbytek chloroformu a thionylchloridu se oddestiluje. Olejovitý zbytek se podrobí frakční destilaci. Získá se 45,3 g (78 %) chloridu kyseliny (102) o teplotě varu 143 až 144 $^{\circ}\text{C}$.

Chlorid kyseliny (102) se také může připravit alternativním postupem, při němž se nepoužívá chloroformu, což je výhodné z toho důvodu, že se vyloučí problémy s odstraňováním odpadů a expozicí obsluhy chloroformu. Při tomto alternativním postupu se také minimalizuje tvorba anhydridu 4-methylvalerové kyseliny.

K roztoku thionylchloridu (98,5 kg, 828 mol) a N,N-dimethylformamidu (2 kg, 27 mol) se přidá 4-methylvalerová kyselina (74 kg, 637 mol), přičemž reakční teplota se udržuje v rozmezí od 25 do 30 $^{\circ}\text{C}$. Přidá se hexanová směs (30 litrů) a roztok se 1 hodinu a 15 minut udržuje při teplotě v rozmezí od 30 do 35 $^{\circ}\text{C}$. Potom se roztok znovu zahřívá 1 hodinu a 10 minut na 70 až 75 $^{\circ}\text{C}$. Potom se roztok destiluje za atmosférického tlaku tak dlouho, dokud teplota roztoku nedosáhne 95 $^{\circ}\text{C}$. Směs se ochladí, přidá se k ní hexanová směs (30 litrů) a provede se nová destilace za atmosférického tlaku až do teploty roztoku 97 $^{\circ}\text{C}$. Zbývající olej se předestiluje, a tak se získá 79 kg (92 %) chloridu kyseliny (102) o teplotě varu 77 $^{\circ}\text{C}$ za tlaku 8 až 8,7 kPa.

Stupeň 2

K roztoku (4R,5S)-(+)-4-methyl-5-fenyl-2-oxazolidinonu (5,27 g, 29,74 mmol) v 70 ml bezvodého tetrahydrofuranu se při $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pod atmosférou argonu pomalu přidá 1,6M roztok n-butyllithia (19 ml, 30,40 mmol) v hexanové směsi. Směs se 15 minut míchá při $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a potom se k ní přidá chlorid kyseliny (4,5 g, 33,43 mmol), kterým se reakční směs rozloží. Vzniklá reakční směs se 10 minut míchá při $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a potom 30 minut při 0 $^{\circ}\text{C}$. Dále se k ní přidá nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného (50 ml) a směs se 30 minut míchá při 0 $^{\circ}\text{C}$. Organická vrstva se oddělí a vodná vrstva se extrahuje ethylacetátem (3 x). Organické extrakty

se spojí a vysuší bezvodým síranem hořečnatým. Potom se vysušený spojený extrakt přefiltruje a zkoncentruje na bezbarvý olej. Tento olej se chromatografuje na silikagelu za použití 8% ethylacetátu v hexanové směsi, jako elučního činidla. Získá se 7,56 g (82 %) acyloxazolidinonu (103) ve formě bílé pevné látky.

5

Analýza pro $C_{16}H_{21}NO_3$:

vypočteno C, 69,79; H, 7,69; N, 5,09

nalezeno C, 69,56; H, 7,63; N, 5,06 %.

- 10 Acyloxazolidinon (103) se také může připravit alternativním postupem, který se provádí při teplotě v rozmezí od -5 do 0 °C. Práce při této teplotě je výhodnější než práce při -78 °C, která je obtížná a nákladná ve výrobním měřítku. Při tomto alternativním postupu se také z reakční směsi získá produkt ve formě krystalické pevné látky a nikoliv ve formě oleje, který je nutno chromatografovat.

15

- K roztoku 4-methyl-5-fenyl-2-oxazolidinonu (64 g, 0,36 mol) v bezvodém tetrahydrofuranu (270 g) se při -5 °C přidá 15% roztok *n*-butyllithia v hexanu (160 g, 0,37 mol) při teplotě v rozmezí od -5 do 0 °C. Ke vzniklé směsi se přidá při teplotě v rozmezí od -10 do 0 °C chlorid kyseliny (102) (48,6 g, 0,36 mol). Reakční směs se rozloží roztokem hydrogenuhličitanu sodného (4 g) ve vodě (90 ml). Ke směsi se přidá ethylacetát (200 g) a oddělí se vrstvy. Organická vrstva se extrahuje vodou (2 x 50 ml) a vodné fáze se reextrahuje ethylacetátem (100 g). Organické extrakty se spojí a odstraní se z nich destilací asi 150 ml rozpouštědla. Pokračuje se v destilaci za atmosférického tlaku a potom se ke směsi přidává heptan (2 x 200), až teplota par dosáhne hodnoty 95 °C. Roztok se ochladí na 5 °C, produkt se odfiltruje, promyje chladným heptanem a
- 25 vysuší. Získá se 79 g (80 %) acyloxazolidinonu (103).

Stupeň 3

- K roztoku diisopropylaminu (7,6 g, 0,075 mmol) ve 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu se při
- 30 0 °C pod dusíkovou atmosférou přidá 1,6M roztok *n*-butyllithia (47 ml, 0,075 mol) v hexanové směsi, přičemž teplota se udržuje v rozmezí od -5 do 0 °C. Vzniklý roztok se přidá k roztoku acyloxazolidinonu (103) (18,6 g, 0,068 mol) v tetrahydrofuranu (160 ml) při -55 až -45 °C. Roztok se 30 minut míchá při -55 až -45 °C a potom se přidá k roztoku terc.butylbromacetátu (14,6 g, 0,075 mol) v tetrahydrofuranu při teplotě -55 až -45 °C. Vzniklý roztok se ochladí na
- 35 -65 °C a nechá v průběhu 2 hodin ohřát na 10 °C. Reakční směs se rozloží přidávkem nasyceného vodného roztoku chloridu amonného a extrahuje se ethylacetátem. Organická vrstva se vysuší síranem hořečnatým, přefiltruje a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Zbytek se překrystaluje z heptanové směsi a po odfiltrování a vysušení za sníženého tlaku se získá 18 g (68 %) acyloxazolidinonu (104).

40

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 7,4–7,2 (m, 5H), 5,65 (d, 1H, $J=7,09$ Hz), 4,74 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 2,44 (m, 1H), 1,65–1,45 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 0,93 (m, 6H), 0,89 (d, 3H, $J=7,87$ Hz).

- 45 Alternativně se může pořadí přidávání reakčních činidel obrátit. Může se tedy terc.butylbromacetát přidávat k roztoku obsahujícímu diisopropylamin, *n*-butyllithium a acyloxazolidinon (103). Izolace výsledného produktu se také může provádět destilací a přítomná rozpouštědla (hexan a tetrahydrofuran) se mohou nahradit isopropylalkoholem. Acyloxazolidinon (104) potom vykristaluje z roztoku v isopropylalkoholu. Tuto alternativu ilustruje následující experimentální
- 50 postup.

K roztoku diisopropylaminu (23,1 g, 0,0229 mol) v bezvodém tetrahydrofuranu (30 ml) se při 0 °C pod atmosférou dusíku přidá 2,5M roztok *n*-butyllithia v hexanu (92 ml, 0,229 mol),

přičemž teplota reakční směsi se udržuje v rozmezí od -5 do $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výsledný roztok se přidá k roztoku acyloxazolidinonu (103) (60,0 g, 0,218 mol) v tetrahydrofuranu (400 ml) při teplotě -45 až $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Roztok se míchá při teplotě -45 až $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 34 minut. Potom se k němu přidá terc.butylbromacetát (44,6 g, 0,229 mol) při teplotě v rozmezí od -45 do $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzniklý reakční roztok se nechá v průběhu dvou až tří hodin zahřát na $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakční směs se rozloží přidávkem nasyceného vodného roztoku chloridu amonného. Organická vrstva se oddělí od vodné vrstvy a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a nahradí isopropylalkoholem. Produkt se nechá vykristalovat z isopropylalkoholu a odfiltruje se a vysuší za sníženého tlaku. Získá se 53,8 g (63 %) acyloxazolidinonu (104).

Stupeň 4

K předchazenému ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) roztoku acyloxazolidinonu (104) (60,0 g, 0,15 mol) v 266 g tetrahydrofuranu se v průběhu 35 minut přidá 30% roztok peroxidu vodíku (71 g), 9,4 g monohydrátu hydroxidu lithného (0,22 mol) a voda (120 ml) takovým způsobem, aby se reakční teplota udržovala na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Směs se 2,5 hodiny míchá při 3 až $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a potom se reakční směs rozloží přidávkem roztoku siřičitanu sodného (50 g) a hydrogensířičitanu sodného (27 g) ve vodě (310 ml) při teplotě nižší než $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přidá se heptan (100 ml) a methyl-terc.butylether (100 ml) a oddělí se vrstvy. Vodná vrstva se extrahuje methyl-terc.butyletherem (100 ml) a organické vrstvy se spojí. Rozpouštědlo se oddestiluje a nahradí heptanem a výsledný heptanový roztok (400 ml) se ochladí na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vyloučená pevná látka se odfiltruje a filtrát se extrahuje teplou vodou (2 x 150 ml, 1 x 200 ml a 1 x 300 ml). Roztok se zkoncentruje odpařením a tak se získá 34,5 g (97 %) kyseliny (105) v olejovité formě.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 11,5 (br, s, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,67–2,29 (m, 2H), 1,60 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,32 (m, 2H), 0,92 (m, 6H).

Stupeň 5

Kyselina (105) (72,4 g, 0,314 mol) se rozpustí v tetrahydrofuranu (360 ml) a roztok se ochladí na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ke vzniklému roztoku se přidá 2,0M roztok komplexu boran–dimethylsulfid (178 ml, 0,356 mol) v tetrahydrofuranu při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzniklý roztok se nechá ohřát na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a potom se ochladí na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 2 hodinách a 45 minutách se reakční směs rozloží přidávkem methanolu (300 ml) a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Přidá se další methanol (300 ml) a roztok se zkoncentruje za sníženého tlaku. Získá se 66 g (97 %) alkoholu (106) ve formě oleje.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 3,62 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 2,44 (br s, 1H), 2,36–2,21 (m, 2H), 2,05 (m, 1H), 1,64 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,24–1,04 (m, 2H), 0,91 (m, 6H).

Stupeň 6

Alkohol (107) (51,9 g, 0,24 mol) se rozpustí v pyridinu (130 ml) a vzniklý roztok se ochladí na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. K tomuto roztoku se přidá p-toluensulfonylchlorid (57,2 g, 0,30 mol) a směs se 21 hodin míchá při $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakční směs se rozloží přidávkem vody (95 ml) a 18% vodné kyseliny chlorovodíkové (300 ml) při teplotě pod $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přidá se methyl-terc.butylether (350 ml) a vrstvy se oddělí. Vodná vrstva se extrahuje methyl-terc.butyletherem (350 ml). Organické vrstvy se spojí, promyjí 1% vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové (2 x 100 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (1 x 150 ml) a vodou (1 x 100 ml). Organická roztok se přechistí odbarvovacím uhlím, přefiltruje a odpaří. Získá se 77 g (86 %) tosylátu (107) ve formě oleje.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7,78 (d, 2H, $J=8,25$ Hz), 7,34 (d, 2H, $J=8,25$ Hz), 3,96 (m, 2H), 2,45 (s, 3H), 2,32–2,12 (m, 3H), 1,6–1,4 (m, 1H), 1,40 (s, 9H), 1,2–1,1 (m, 2H), 0,83 (m, 6H).

Stupeň 7

5

Tosylát (107) (65 g, 0,175 mol) se rozpustí v dimethylsulfoxidu (40 ml). Tento dimethylsulfoxidový roztok se spolu s přídatným dimethylsulfoxidem (10 ml) přidá k roztoku natriumazidu (11 g, 0,26 mol) v dimethylsulfoxidu (450 g) při teplotě 63 °C. Směs se 6 hodin míchá při 65 °C a potom se k ní přidá voda (140 ml) a heptan (250 ml) a oddělí se vrstvy. Vodná vrstva se extrahuje heptanem (250 ml) a organické vrstvy se spojí. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku, a tak se získá 42 g (95 %) azidu (108) v olejovité formě.

10

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 3,32 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,63 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,19 (m, 2H), 0,89 (m, 6H).

15

Stupeň 8

Azid (108) (36,3 g, 0,15 mol) se přidá k 88% vodné kyselině mravenčí (365 ml). Směs se 4,5 hodiny míchá při 30 °C. Potom se ke směsi přidá odbarvovací uhlí a směs se přefiltruje a zkoncentruje za sníženého tlaku na olejovitý zbytek. K tomuto zbytku se přidá heptan (250 ml) a směs se předestiluje za sníženého tlaku, přičemž se získá olej. K tomuto oleji se přidá voda (125 ml) a heptan (250 ml) a směs se intenzivně promíchá. Oddělí se vrstvy a vodná vrstva se promyje heptanem (250 ml). Heptanové vrstvy se spojí a zkoncentrují za sníženého tlaku. Získá se 24,6 g (88 %) intermediárního azidu (108a) ve formě oleje.

25

Alternativně se při hydrolýze může místo vodné kyseliny mravenčí použít vodné kyseliny chlorovodíkové.

Stupeň 9

30

Intermediární azid (108a) (12,7 g, 68,6 mol) se rozpustí v methyl-terc.butyletheru (80 kg). Směs se katalyticky hydrogenuje za přítomnosti 5% palladia na uhlíku (2,0 kg, 50% produktu zvlhčeného vodou) za tlaku vodíku 337 až 338 kPa, až do spotřebování intermediárního azidu (108a). Směs se přefiltruje a pevná látka se promyje methyl-terc.butyletherem (30 kg). Pevná látka se rozpustí v horkém roztoku isopropylalkoholu (75 kg) ve vodě (60 kg) a vzniklý roztok se přefiltruje. Roztok ve směsi isopropylalkoholu a vody se ochladí na –3 °C a produkt se odfiltruje a promyje chladným isopropylalkoholem (16 kg). Pevná látka se vysuší za sníženého tlaku, a tak se získá 6,4 kg (59 %) aminokyseliny (109).

35

Tato redukce se může provádět v různých rozpouštědlech. Úspěšně byla tato redukce provedena v heptanu, směsi ethanolu a vody, isopropylalkoholu, směsi isopropylalkoholu a vody, směsi methanolu a vody, směsi tetrahydrofuranu a vody a v methyl-terc.butyletheru.

40

Vynález je možno různým způsobem obměňovat a modifikovat na základě výše uvedeného popisu. Všechny takové modifikace a obměny spadají do rozsahu tohoto vynálezu, pokud jsou kryty připojenými patentovými nároky.

45

Schéma I

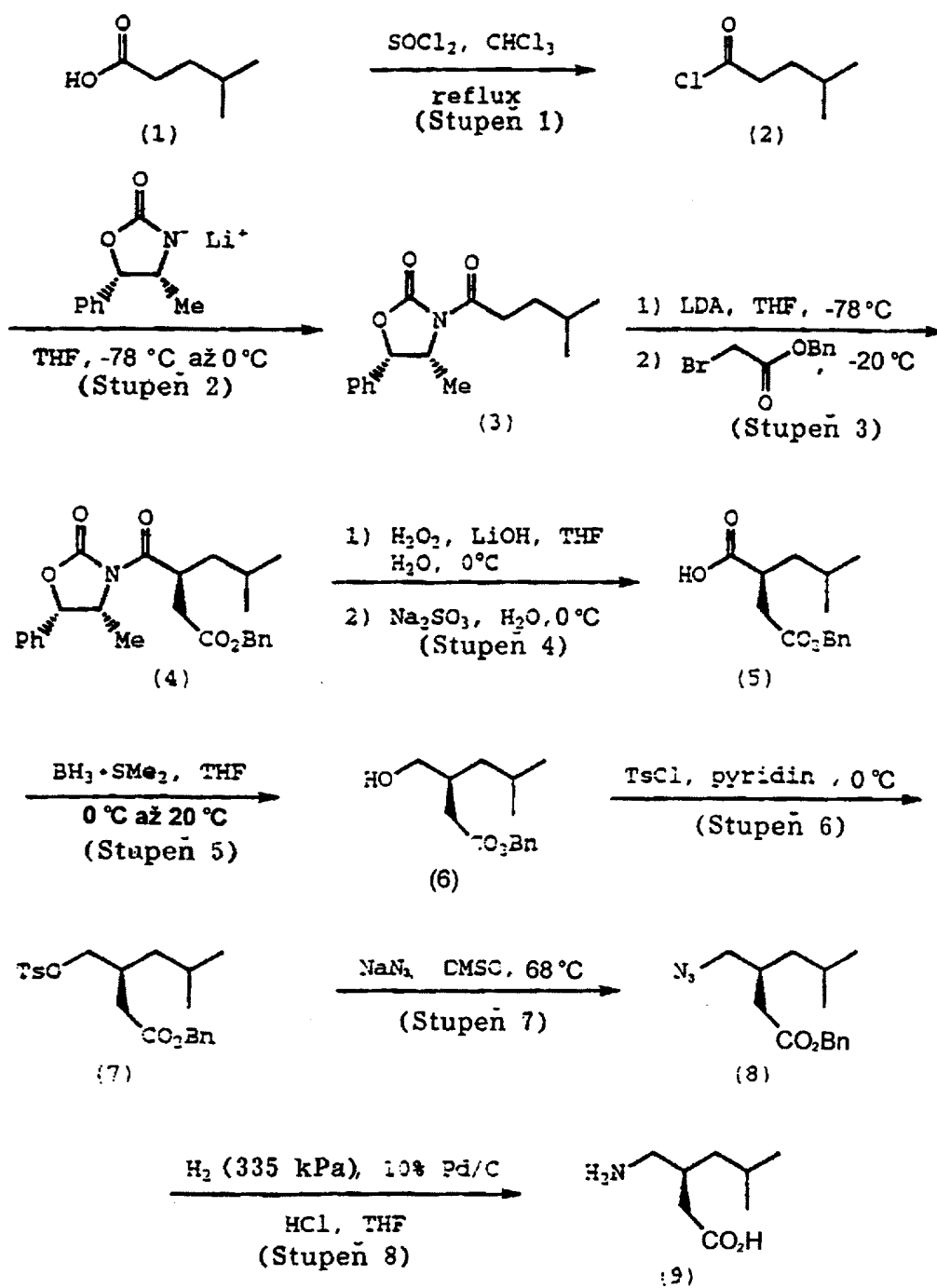


Schéma Ia

5

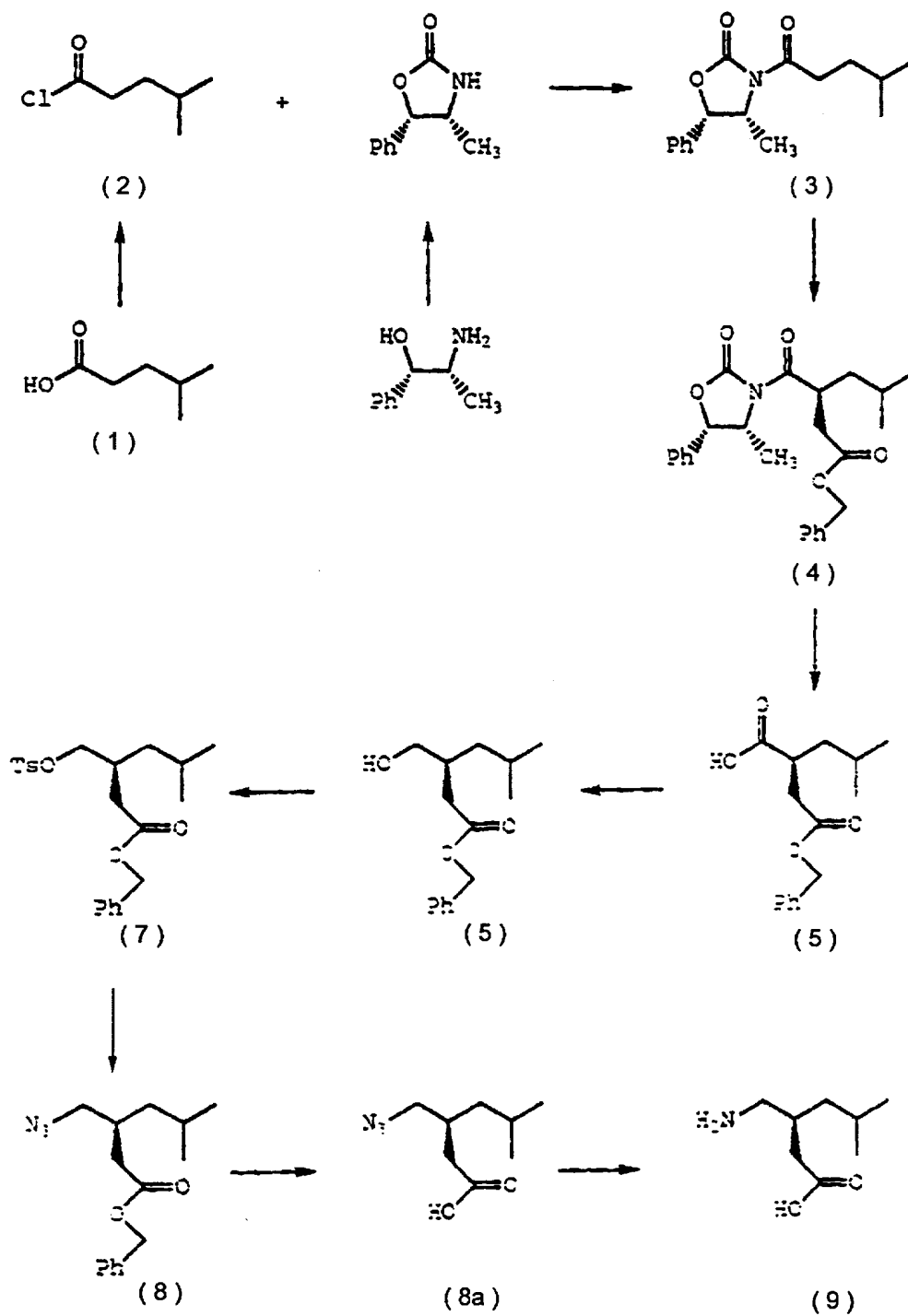
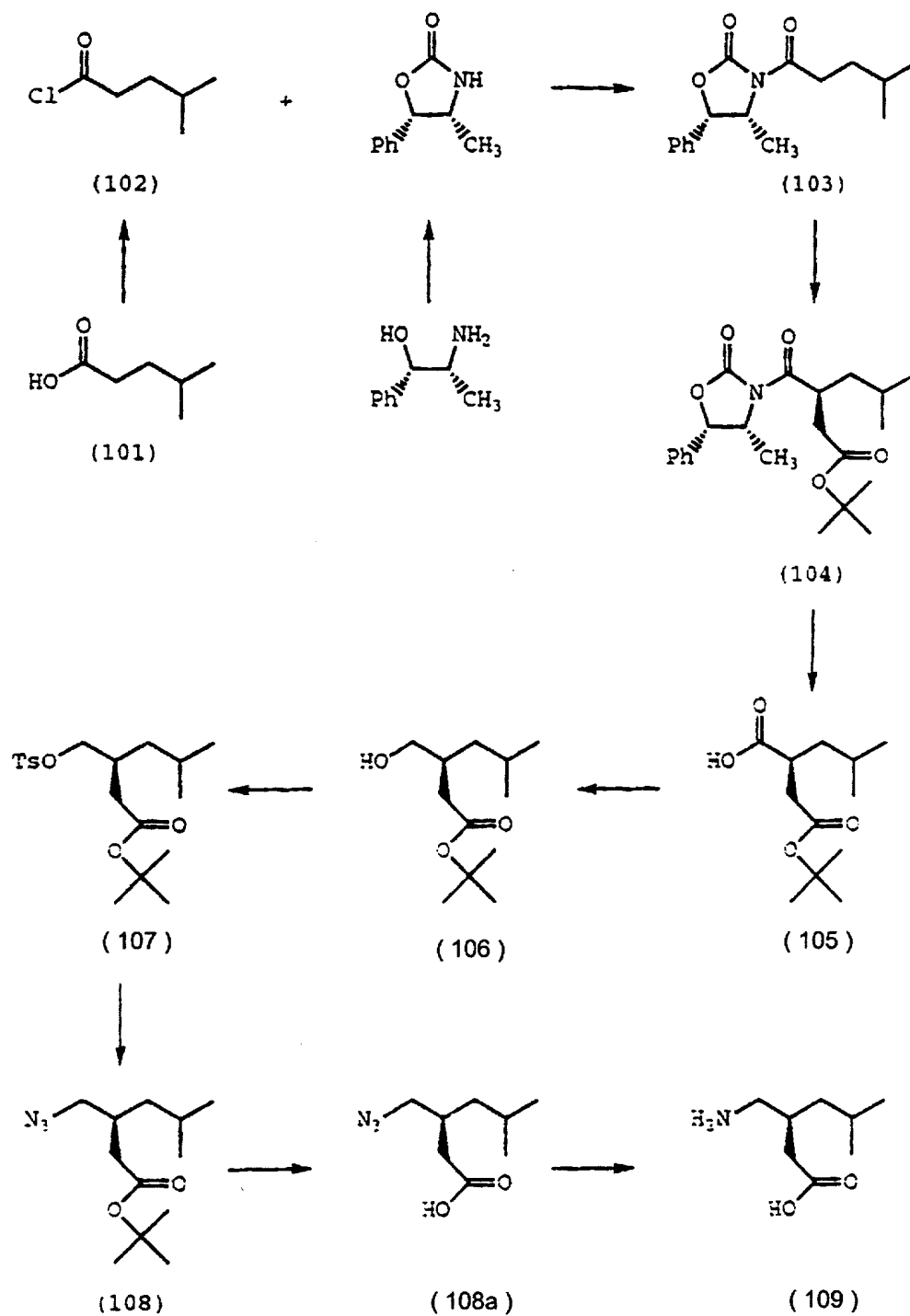


Schéma II

5

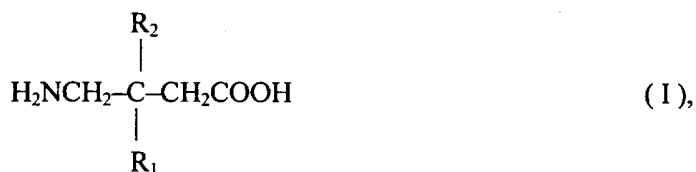


PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Deriváty gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I

10



kde

15

R_1 představuje přímou nebo rozvětvenou alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku, fenylskupinu nebo cykloalkylskupinu se 3 až 6 atomy uhlíku; a

R_2 představuje atom vodíku nebo methylskupinu;

20

příčemž když R_2 představuje atom vodíku, R_1 je odlišný od methylskupiny

a jejich jednotlivé enantiomery a farmaceuticky vhodné soli.

25

2. Deriváty gamma-aminomáselné kyseliny podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R_1 představuje přímou nebo rozvětvenou alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku a R_2 má význam uvedený v nároku 1.

30

3. Deriváty gamma-aminomáselné kyseliny podle nároku 2 obecného vzorce I, kde R_1 představuje přímou nebo rozvětvenou alkylskupinu se 4 atomy uhlíku a R_2 má význam uvedený v nároku 1.

35

4. Derivát gamma-aminomáselné kyseliny podle nároku 3, kterým je 4-amino-3-(2-methylpropyl)butanová kyselina.

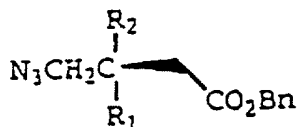
5. Derivát gamma-aminomáselné kyseliny podle nároku 3, kterým je S-(+)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanová kyselina.

40

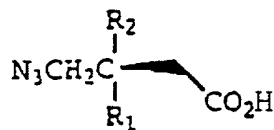
6. Derivát gamma-aminomáselné kyseliny podle nároku 3, kterým je R-(-)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanová kyselina.

7. Způsob výroby chirálních derivátů gamma-aminomáselné kyseliny podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R_1 a R_2 mají význam uvedený v nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se azid obecného vzorce

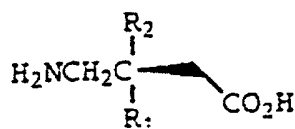
45



hydrolyzuje na intermediární azid obecného vzorce



5 a tento intermediární azid se redukuje na amin obecného vzorce



10 přičemž ve výše uvedených vzorcích mají R_1 a R_2 význam uvedený v nároku 2 a Bn představuje benzylskupinu.

15 8. Způsob podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se azid hydrolyzuje působením hydroxidu sodného.

9. Způsob podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje přidavný stupeň extrakce intermediárního azidu do vodné báze.

20 10. Způsob podle nároku 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje přidavný stupeň okyselení vodného extraktu.

11. Způsob podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se intermediární azid redukuje za téměř neutrálních podmínek na aminokyselinu.

25 12. Způsob výroby chirálních derivátů gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I podle nároku 1, kde

R_1 představuje přímou nebo rozvětvenou alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku a

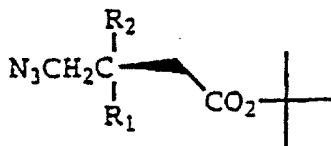
30 R_2 představuje atom vodíku nebo methylskupinu;

přičemž když R_2 představuje atom vodíku, R_1 je odlišný od methylskupiny,

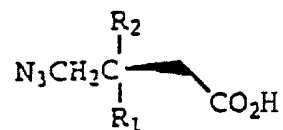
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se

35

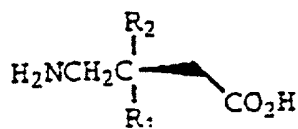
azid obecného vzorce



hydrolyzuje na intermediární azid obecného vzorce



5 a tento intermediární azid se redukuje na amin obecného vzorce



přičemž ve výše uvedených vzorcích mají R_1 a R_2 význam uvedený výše.

10

13. Způsob podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se azid hydrolyzuje působením hydroxidu sodného.

15 14. Způsob podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje přídatný stupeň extrakce intermediárního azidu do vodné báze.

15. Způsob podle nároku 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje přídatný stupeň okyselení vodného extraktu.

20

16. Způsob podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se intermediární azid redukuje za téměř neutrálních podmínek na aminokyselinu.

17. Sloučenina zvolená ze souboru zahrnujícího

25

4-(fenylmethyl)ester 2-(2-methylpropyl)butandiové kyseliny,

fenylmethylester 3-(azidomethyl)-5-methylhexanové kyseliny,

fenylmethylester 3-(hydroxymethyl)-5-methylhexanové kyseliny,

3-(azidomethyl)-5-methylhexanovou kyselinu a

30

1,1-dimethylethylester 3-(azidomethyl)-5-methylhexanové kyseliny,

jako meziprodukt pro výrobu derivátů gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I podle nároku 1.

35

18. Sloučenina podle nároku 17, kterou je (S)-3-(azidomethyl)-5-methylhexanová kyselina, jako meziprodukt pro výrobu derivátů gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I podle nároku 1.

40

19. Sloučenina podle nároku 17, kterou je 1,1-dimethylethylester (S)-3-(azidomethyl)-5-methylhexanové kyseliny, jako meziprodukt pro výrobu derivátů gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I podle nároku 1.

20. Deriváty gamma-aminomáselné kyseliny podle některého z nároků 1 až 6 pro použití jako léčiva pro léčení záchvatů, například záchvatů, které jsou důsledkem epilepsie, cerebrální ischemické choroby, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby nebo spastického stavu; úzkostných stavů; stavů deprese; psychotických poruch.

5

21. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje derivát gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I podle nároku 1, kde jednotlivé symboly mají význam uvedený v nároku 1, spolu s farmaceuticky vhodným nosičem.

10

22. Farmaceutický prostředek podle nároku 21, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako derivát gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I obsahuje sloučeninu, kde R_1 představuje přímou nebo rozvětvenou alkylskupinu s 1 až 6 atomy uhlíku a R_2 představuje atom vodíku nebo methylskupinu; přičemž když R_2 představuje atom vodíku, R_1 je odlišný od methylskupiny.

15

23. Farmaceutický prostředek podle nároku 22, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako derivát gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I obsahuje 4-amino-3-(2-methylpropyl)butanovou kyselinu.

20

24. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako derivát gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I obsahuje S-(+)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanovou kyselinu.

25

25. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako derivát gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I obsahuje R-(-)-4-amino-3-(2-methylpropyl)butanovou kyselinu.

30

26. Použití derivátů gamma-aminomáselné kyseliny obecného vzorce I definovaných v nároku 1, jejich jednotlivých enantiomerů a farmaceuticky vhodných solí pro výrobu léčiva pro léčení záchvatů, například záchvatů, které jsou důsledkem epilepsie, cerebrální ischemické choroby, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby nebo spastického stavu; úzkostných stavů; stavů deprese; psychotických poruch.

35

Konec dokumentu
