



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **170686**

(13) **B**

(51) **Int Cl⁵ C 07 D 417/06**

Styret for det industrielle rettsvern

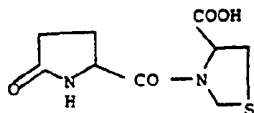
(21) Søknadsnr	880332	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	26.01.88	søknadsnummer	
(24) Løpedag	26.01.88	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilg.	27.07.88	(30) Prioritet	26.01.87, IT, 19165/87
(44) Utlegningsdato	10.08.92		

(71) Patent søker	Poli Industria Chimica SpA, Piazza Agrippa 1, I-20141 Milano, IT
(72) Oppfinner	Stefano Poli M.D., Milano, IT
(74) Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte ved fremstilling av terapeutisk aktive 3-L- pyroglutamyl-L-tiazolidin-4-karboksytsyre**

(56) **Anførte publikasjoner** DE off.skrift nr 2630757.

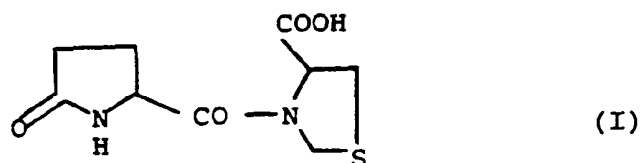
(57) **Sammendrag** Terapeutisk aktiv 3-L-pyroglutamyl-L-tiazolidin-4-karboksytsyre med formel I



samt deres farmasøytisk akseptable salter. Fremstillingen av forbindelsen er beskrevet.

3-L-pyroglutamoyl-tiazolidin-4-karboksylsyre fremstilt utgående fra en aktivert ester av L-pyroglutaminsyre eller fra L-pyroglutamoyl-klorid og L-tiazolidin-4-karboksylsyre utviser interessante immunostimulerende, antitoksiske, antiinflammatoriske, antioksyderende og antialdringsegenskaper.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte ved fremstilling av 3-L-pyroglutamyl-L-tiazolidin-4-karboksylsyre med formel I



dets farmasøytisk akseptable salter med antitoksiske, antioksyderende, immunostimulerende, antiinflammatoriske og antialdringsaktiviteter.

Fremgangsmåten er karakterisert ved at en aktivert ester av L-pyroglutaminsyre eller dens syreklorid omsettes med L-tiazolidin-4-karboksylsyre, og om ønsket omdannes forbindelsene med formel I til deres farmasøytisk akseptable salter på kjent måte.

Eksempler på salter fremstilt i henhold til oppfinnelsen er salter med ikke-toksiske baser og farmasøytisk akseptable baser så som lysin, arginin, alkali- eller jordalkalihydroksyder, trometamin, trietylamin, trietanolamin, piperidin etc. Noen salter kan utvise særlige fordeler så som høyere solubilitet, bedre farmakokinetiske eller organoleptiske egenskaper, høyere stabilitet etc.; alle disse aspekter er i alle tilfeller sekundære i forhold til den fysiologiske virkning av syre I.

Forbindelse I har vist seg å ha fordelaktige farmakologiske egenskaper såsom evnen til å beskytte rottelever fra paracetamol-forgiftning, evnen til å redusere følgene av utsettelse for ioniserende bestråling hos mus og evnen til positivt å influere immunsystemet. I de farmakologiske forsøk beskrevet nedenfor er forbindelse I, også angitt med PGTCA-kode, blitt sammenlignet med pyroglutaminsyre (PGA) og 4-tiazolidinkarboksylysyre (TCA).

Virkningen på paracetamol-forgiftning hos rotte

Wistar hannrotter, som veide 150 ± 10 g ble anvendt. Etter passende stabilisering ble de utsatt for følgende forsøk:

a) Forsøk med enkel i.p. administrering

Dyrene ble oppdelt i 7 grupper som utgjorde 20 dyr hver, i henhold til følgende skjema:

1. gruppe Kontroll
2. gruppe PGTCA 4,1 mikromol/kg i.p.
3. gruppe PGTCA 41 mikromol/kg i.p.
4. gruppe PGTCA 205 mikromol/kg i.p.
5. gruppe PGA 4,1 mikromol/kg + TCA 4,1 mikromol/kg
6. gruppe PGA 41 mikromol/kg + TCA 41 mikromol/kg
7. gruppe PGA 205 mikromol/kg + TCA 205 mikromol/kg.

Dyrene fra alle grupper ble etter 12 timers faste behandlet oralt med paracetamol på dosenivået 5000 mg/kg. De forskjellige farmakologiske behandlinger ble utført samtidig med paracetamol-administreringen. 48 timer etter behandlingen ble antall dødsfall i de forskjellige eksperimentelle grupper nedtegnet. Fra de overlevende dyr som ble avlivet ved halshugging, og fra de døde dyr ble leveren tatt ut, og organet ble utsatt for histopatologisk undersøkelse. Leverlesjonsgraden ble bestemt som følger:

- 0. grad: Normal histologisk eksaminasjon
- 1. grad: Centrolobulær nekrose som strakte seg til mindre enn 25% av lobulen
- 2. grad: Utvidet centrolobulær nekrose, med brodannende lesjoner mellom nærliggende centrolobulære områder
- 3. grad: Massiv nekrose.

For å bestemme lesjonsgraden ble 6 forskjellige seksjoner av hvert organ evaluert.

b) Forsøk med gjentatt i.p. administrering

Det samme behandlingsskjema som beskrevet under punkt a) anvendes.

Dyrene som tilhørte 2.-7. gruppe, ble behandlet daglig i 8 dager. På den åttende behandlingsdag, samtidig med de forutbestemte forskjellige farmakologiske behandlinger, ble alle dyr i de syv grupper (etter 12 timers faste) administrert 5000 mg/kg pr. os paracetamol. Dyrene ble observert i de 48 påfølgende timer; dyrene som tilhørte gruppene 2-7 ble fortsatt behandlet ifølge ovenfornevnte skjema.

48 timer etter paracetamol-administreringen ble de overlevende dyr kontrollert og leverhistopatologiske forsøk ble utført.

Resultatene som er oppført i den følgende tabell I, viser at den akutte behandling med PGTCA, både ved høyere dose (205 mikromol/kg i.p.) og i en middels dose (41 mikromol/kg i.p.) induserer en betraktelig senkning av leverskadene som frembringes i rotter ved en høy dose paracetamol. Blandingen PGA + TCA induserer en betraktelig senkning av leverskade kun ved den høyere dose (205 mikromol/kg i.p. med TCA).

PGTCA reduserer mortalitet ved paracetamol både ved den

høyere dose og den middels store dose mens effekten av blandingen PGA + TCA kun kan merkes ved den høyere dose. Også i forsøket med gjentatt administrering er behandlingen med PGTCa klart overlegen sammenlignet med behandlingen med blandingen PGA + TCA (tabell II).

Virkninger på følgene av utsettelse for ioniseringsbe- stråling

Swiss hannmus som veide 30 ± 5 g ble anvendt oppdelt i 7 grupper på 20 dyr hver i henhold til det samme skjema som ble beskrevet ovenfor. Farmakologiske behandlinger ble utført i 15 dager før bestråling og fortsatt til slutten av forsøket. Kontrolldyrene ble administrert bæreren.

På den femtende dag ble alle dyr bestrålet (Philip Metalix apparat, 180 kV, 15 mA, med Cu 0,5 mm + Al 1 mm filter) med 700 r røntgenstråler.

Alle dyrene ble kontrollert hver dag i 15 dager etter bestrålingen. Beskyttelsesgraden mot bestrålingen ble bestemt i overlevelsesprosent på den 10. og 15. dag. Resultatene av forsøkene er oppført i tabell III og viser at PGTCa har en betraktelig beskyttende aktivitet mot bestråling både ved den høyere og den mellomliggende dose.

Aktiviteten av blandingen PGA + TCA kan kun bemerkes ved den høyere dose.

Virkning på noen immunologiske parametere hos hannrotter

For å etablere en mulig immunostimulerende eller immuno-modulerende aktivitet må det anvendes fysiologiske eller parafysiologiske immunomangelmodeller. En av modellene som har vært mest vanlig brukt for dette formål er aldring. Aldring henger sammen med en senkning av funksjonen av T-hjelpelymfocytter og med en senkning av immunoavhengige responser fra T-lymfocytter: Hypersensitivitet av forsinket type, proliferativ respons til mytogene stoffer, differensiering av T-cytolytiske celler. Mekanismer som medvirker i

slike fenomener, kan utgjøres av en senket produksjon av tymushormoner som henger sammen med tymusinngrep, innduksjon av T-suppressorceller og endret syntese eller bruk av interleukin 2. B-celler synes å være mindre involvert.

Av denne grunn ble virkningen av in vivo-behandling med PGTCA i unge og eldre dyr evaluert under anvendelse av to forsøk som viste lymfocytarcellereaktiviteten.

For dette formål ble det anvendt voksne hannrotter (5-6 måneder gamle) som dyremodeller med normal immunokonkurrerende system og eldre rotter (17-18 måneder) som modell på parafysiologisk immunomangel.

Behandlingen med PGTCA ble utført ved i.p. administrering med dosene 1,10 og 50 mg/kg to ganger daglig i 4 uker.

Immunologiske forsøk som ble anvendt var hypersensitivitet av forsinket type induisert med dinitroklorbenzen (DNCB) og responsen hos T-lymfocytene til concanavalin A (ConA).

DNCB-sensitivisering

Etter 4 uker av forbehandling med PGTCA (eller bærer) ble hvert dyr (5 rotter pr. gruppe) administrert 0,02 ml av DNCB (oppløst i aceton i en konsentrasjon på 200 mg/ml) på ryggens hudområde, på et areal på ca. 1 cm². Den etterfølgende inflammatoriske reaksjon ble kvantifisert ved å måle diameteren på det røde område med en måleanordning fra dag 1 til 7. I løpet av denne periode fikk dyrene fortsatt behandling.

Blastiseringsforsøk med ConA

Etter 4 uker behandling med PGTCA i doser på 1,10 og 50 mg/kg ble dyrene avlivet og milten ble tatt ut under fullstendig sterile betingelser. Lymfocytisolasjon ble oppnådd ved isolimph-gradient. Lymfocytene ble inkubert i mikrokopper i en konsentrasjon på 1×10^6 celler/ml i nærvær av ConA (2,5 ug/ml) i 48 timer. Mytogen aktivitet ble

bestemt ved innlemmelse av ^3H -tymidin i 16 timer.

Fra de erholdte resultater fremgår det hvordan eldre dyr utviste en reduksjon i respons til DNCB, evaluert som inflammasjonsområde. Behandling med PGTCA viste en betraktelig økning i respons kun ved dosen på 50 mg/kg i de unge mens det hos de eldre dyr ble funnet en maksimal forsterkende effekt allerede ved PGTCA dose på 10 mg/kg.

Immunostimulerende aktivitet med PGTCA ble også bekreftet ved blastiseringsforsøket med ConA (tabell IV). Også i dette tilfellet var den resulterende respons mer utpreget i eldre dyr som viste en viss grad av cellulær immunodefisiens.

I mus har det vært anvendt en hypersensitivitetsreaksjon av cytotoksisk type som ble evaluert i forsøket med T-celler som danner rosetter med røde celler fra vær (S.D. Wilson-Immunology, 1971, 21, 233).

Behandlingen ble utført etter i.p. administrering av 50 mg/kg 2 ganger daglig i henhold til det som er oppført i tabell V - A/B.

COBS CD-1 hannmus som veide ca. 25 g ble behandlet med PGTCA i 8 dager.

4 dager etter start på behandlingen ble dyrene immunisert med 5×10^8 røde celler fra vær i 0,2 ml PBS ved i.p. administrering. For å erholde røde celler ble citrert blod fra vær sentrifugert ved 1500 omdreininger pr. minutt i 10 minutter, de presipiterte røde celler ble vasket to ganger ved 1200 omdreininger pr. minutt i 10 minutter i PBS under uttak av det første lag, og deretter suspenderes de i PBS og telles på en Coulter-teller og bringes til en konsentrasjon på $2,5 \times 10^9$ røde celler/ml.

På den 6. dag etter immuniseringen utføres rosettforsøket.

Musene avlives ved cervikal dislokasjon, og milten tas ut.

Milten settes i 1 ml Hank-oppløsning som er isavkjølt, deretter knuses den, homogeniseres og filtreres over gas. Det homogeniserte produkt vaskes to ganger i Hank, sentrifugeres ved 1200 omdreininger pr. minutt i 10 minutter og resuspenderes. Miltcellesuspensjonen $6 \times 10^7/\text{ml}$ + 100 μl av rød cellesuspensjon $3 \times 10^8/\mu\text{l}$ blandes i 0,8 ml Hank og omrøres i 1 minutt. Uttatte prøver inkuberes i 24 timer ved 4°C slik at risting unngås. Etter en slik periode røres de, og antall celler som danner rosetter pr. ml bestemmes i et Bürker-rom.

I forsøket med rosettdannelse viser behandling med PGTCa en betraktelig økning i antall rosetter sammenlignet med kontrollene i sensibiliserte dyr, mens i de ikke-sensibiliserte dyr opptrer ingen betraktelig variasjon.

Med dette lot det seg bekrefte at PGTCa er aktiv på T-lymfocyt-populasjonen mens den ikke øker antall B-lymfocytter, og den viser således en induksjon av spesifikk immunostimulasjon.

TABELL I

	Kontr.	P G T C A			PGA + TCA		
Dose							
(mikromol/kg ip)		4,1	41	205	(4,1+4,1)	(41+41)	(205+205)
n°	20	20	20	20	20	20	20
Mortalitet %	90	85	75	60	90	85	75
Grad av leverlesjon	% fordeling av grader leverlesjon						
0	0	0	0	5	0	0	0
1	0	0	5	15	0	0	10
2	0	10	20	15	0	10	15
3	100	90	75	65	100	90	75

TABELL II

	Kontr.	P	G	T	C	A	PGA	+ TCA
Dose								
(mikromol/kg ip)	4,1	41	205	(4,1+4,1)	(41+41)	(205		
						+205)		
n ^o	20	20	20	20	20	20	20	20
Mortalitet %	90	85	70	50	90	75	65	
Grad av leverlesjon		% fordeling av grader leverlesjon						
0	0	0	0	5	0	0	0	
1	0	0	0	15	0	0	0	
2	0	10	35	25	10	15	30	
3	100	90	65	55	90	85	70	

TABELL III

	Kontr.	P	G	T	C	A	PGA	+ TCA
Dose								
(mikrom/kg ip)	4,1	41	205	(4,1+4,1)	(41+41)	(205		
						+205)		
n ^o	20	20	20	20	20	20	20	20
Mortalitet %								
etter 10 dager	20	20	15	10	20	20	20	
etter 15 dager	55	45	20	15	50	45	35	

TABELL IV

Behandling med	³ H-tymidin	% økning	P
PGTCA	cpm/brønn		
Voksne rotter (5-6 mnd)			
0	32500 ± 1130	--	--
1 mg/kg	31806 ± 970	- 2,1	NS
10 mg/kg	34165 ± 540	+ 5,1	NS
50 mg/kg	35785 ± 240	+ 10,1	<0,01

Gamle rotter (17-18 mnd)

0	23163 ± 841	--	--
1 mg/kg	23553 ± 923	+ 1,6	NS
10 mg/kg	26012 ± 316	+ 12,3	<0,01
50 mg/kg	27540 ± 439	+ 18,9	<0,01

TABELL V

T-celler som danner rosetter med røde celler fra vær

Behandling i 8 dager

Mus sensibilisert med røde celler

Grupper	Mus nr.	Rosetter/10 ⁶ milt celler m ± E.S.	Ant.	Var.%
Kontroller (NaCl 0,9% i.p.)	10	7680 ± 859		
PGT/1A 100 mg/kg to ganger daglig	10	10840* ± 948		+41

Behandling i 8 dager

Mus ikke sensibilisert med røde celler

Grupper	Mus nr.	Rosetter/10 ⁶ milt celler m ± E.S.	Ant.	Var.%
Kontroller (NaCl 0,9% i.p.)	5	900 ± 200		
PGT/1A 100 mg/kg to ganger daglig	5	790 ± 170		-12

* p < 0,05

Forbindelse I viser seg å være aktiv i dosen på 10 mg/kg og enda sterkere i dosen på 50 mg/kg når det gjelder forbedring av de neurocerebrale aktiviteter i gamle rotter. En like fordelaktig innflytelse ble bemerket også i den seksuelle oppførsel hos hannlige rotter med reduksjon av latenser og økning i hyppighet på parringsaktiviteter.

Fra det ovenfornevnte fremgår det klart hvordan forbindelse I kan anvendes med fordel i terapi av en rekke patologiske tilstander når det gjelder behandling av mangel på immunforsvar, sykdommer på autoimmunbasis og aldringsprosesser. Forbindelse I kan også anvendes for å motvirke et overskudd av oksyderende prosesser som kommer av kronisk inflammasjon eller av utsettelse for ioniseringsbestrålingsprosesser.

Foreliggende oppfinnelse dekker fremstillingsmetoden for forbindelsen med formel I som er kjennetegnet ved at en aktivert ester av L-pyroglutaminsyre omsettes med L-tiazolidin-4-karboksylsyre i nærvær av en organisk base som trietylamin, dietylisopropylamin eller høyere trialkylaminer i løsningsmiddel som dimetylformamid, alifatisk dialkylamider eller dimetylsulfoksyd og at det som aktivert ester kan anvendes esteren med pentaklorfenol, 2,4,5-triklorfenol, N-hydroksysuccinimid, eller L-tiazolidin-4-karboksylsyre i alkalisk oppløsning med L-pyroglutamoylklorid. Den kjemiske struktur for produktet er blitt bestemt ved elementanalyse (C,H,N,S) og NMR-spekter og IR-spekter.

Følgende eksempler beskriver oppfinnelsen.

EKSEMPEL 1

60 g (0,158 mol) pentaklorfenyl-L-pyroglutamat, fremstilt som beskrevet i J. Med. Chem. 13, 844 (1970), 20,85 g (0,158 mol) 4-tiazolidinkarboksylsyre og 16 g (0,158 mol) trietylamin i 450 ml dimetylformamid ristes i 24 timer ved romtemperatur. Etter filtrering av uoppløste substanser og

fordamping av løsningsmiddelet under redusert trykk og en temperatur under 15°C oppløses resten i vann, pentaklorfenol ekstraheres med etyleter, den vanndige fase surgjøres med saltsyre, og utfellingen filtreres ved 10°C. Det omkrystalliseres fra vann under erholdelse av et hvitt krystallinsk produkt med smeltepunkt 192-194°C (utbytte 70%).

Analyse av C₉H₁₂N₂O₄S:

	C%	H%	N%	S%
Beregnet	44,25	4,95	11,46	13,12
Funnet	44,35	4,89	11,50	13,16

¹H-NMR (DMSO/TMS int.)

δ			
2,15	(m, 4H)	-CH ₂ -CH ₂ -	
3,25-3,35	(m, 2H)	-S-CH ₂ -CH-	
4,35-4,5	(s, 2H)	-N-CH ₂ -S-	
4,55	(m, 1H)	-NH-CH-	
4,88	(m, 1H)	-CH-COOH	
7,8	(s, 1H)	-NH-	bytte med D ₂ O
13	(br, 1H)	-COOH	

IR (K Br)

ν̄ (cm⁻¹)

3300 (NH)

1710 (CO-NH)

1680-1620 (COOH ; N-C = O)

[α] D²⁵ -150° (c 2 i HCl 5N)

EKSEMPEL 2

Til en rørt oppløsning av 13,3 g (0,1 mol) L-tiazolidin-4-karboxylsyre i 50 ml NaOH 2N tilsettes dråpevis samtidig NaOH 2N og en oppløsning av 14,8 g (0,1 mol) L-pyroglutamoylklorid (U.S.P. 4.278.681) i 25 ml aceton mens temperaturen holdes på 0°C og pH på mellom 7,5 og 8,5. Etter avsluttet tilsetning konsentreres volumet under redusert trykk til halvparten, surgjøres med konsentrert HCl, og krystallene dannet ved henstand ved 0°C filtreres og

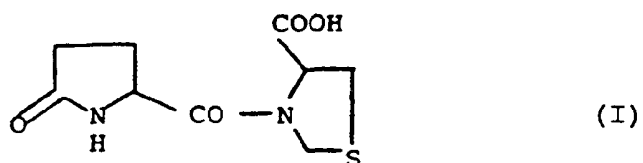
170686

12

omkrystalliseres fra vann, og det erholdes 12 g (49%) av produktet som har de samme egenskaper som produktet fra eksempel 1.

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte ved fremstilling av terapeutisk aktiv
3-L-pyroglutamyl-L-tiazolidin-4-karboksylsyre med formel I



og dens farmasøytisk akseptable salter,
k a r a k t e r i s e r t v e d at en aktivert ester av
L-pyroglutaminsyre eller dens syreklorid omsettes med L-
tiazolidin-4-karboksylsyre, og om ønsket omdannes forbindel-
sene med formel I til deres farmasøytisk akseptable salter
på kjent måte.