

70.066/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

RZ

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Metalloproteináz inhibitorok *karfasi*

*sukcinamida-származék és az a vegyületet
tartalmazó gyógyszer készítmény*

A találmány tárgyát az N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid, valamint gyógyszerészetileg elfogadható sói, hidrátjai és szolvátjai képezik.

A találmány háttere

A WO 95/19956 sz. szabadalmi kérelem (British Biotech Pharmaceuticals Ltd.) a vegyületek egy olyan osztályát írja le és védi, melyek mátrix metalloproteináz (MMP) inhibitorok, valamint a tumor nekrozis faktor (TNF- α) sejtől történő kibocsátásának inhibitorai. Pontosán, a kérelem az (I) általános képletű vegyületekre kér védelmet, ahol

X jelentése -CO₂H vagy -CONHOH csoport;

R₁ jelentése hidrogénatom; 1-6 szénatomos alkil-; 2-6 szénatomos alkenil-; fenil-; szubsztituált fenil-; fenil-(1-6 szénatomos alkil)-; szubsztituált fenil-(1-6 szénatomos alkil)-; heterociklil-; szubsztituált heterociklil-; heterociklil-(1-6 szénatomos alkil)-; szubsztituált heterociklil-(1-6 szénatomos alkil)-csoport; egy BSO_nA- képletű csoport, ahol n értéke 0, 1 vagy 2



és B jelentése hidrogénatom vagy egy 1-6 szénatomos alkil-, fenil-, szubsztituált fenil-, heterociklil-, 1-6 szénatomos acil-, fenacil- vagy szubsztituált fenacil-csoport, és A jelentése 1-6 szénatomos alkil-; amino-; védett amino-; acilamino-; -OH; -SH; 1-6 szénatomos alkoxi-; 1-6 szénatomos alkilamino-; di(1-6 szénatomos alkilamino)-; 1-6 szénatomos alkiltio-; aril-(1-6 szénatomos alkil)-; amino-(1-6 szénatomos alkil)-, hidroxil-(1-6 szénatomos alkil)-, merkaptó-(1-6 szénatomos alkil)- vagy karboxi-(1-6 szénatomos alkil)-csoport, ahol az amino-, hidroxil-, merkaptó- vagy karboxilcsoport tetszőlegesen védett illetve a karboxilcsoport amidált; vagy karbamoil-, mono-(alacsony szénatomszámú alkil)-karbamoil, di-(alacsony szénatomszámú alkil)-karbamoil, di-(alacsony szénatomszámú alkil)-amino- vagy karboxi-(alacsony szénatomszámú alkanoilamino-csoporttal szubsztituált alacsony szénatomszámú alkilcsoport.

R_2 jelentése 1-6 szénatomos alkil-, 2-6 szénatomos alkenil-, 2-6 szénatomos alkinil-, fenil-(1-6 szénatomos alkil)-, heteroaril-(1-6 szénatomos alkil)-, cikloalkil-(1-6 szénatomos alkil)- vagy cikloalkenil-(1-6 szénatomos alkil)-csoport, melyek bármelyike tetszőlegesen egy vagy két szubsztituens tartalmazhat az alábbiak közül: 1-6 szénatomos alkil-, -O-(1-6 szénatomos alkil)-, -S-(1-6 szénatomos alkil)-csoport, cianocsoport (-CN) illetve halogénatom;

R_3 jelentése egy természetes vagy mesterséges α -aminosav jellemző csoportja, mely aminosavban bármely funkciós csoport védve lehet;



R₄ jelentése egy fenil- illetve egy 5- vagy 6-tagú heteroaril-gyűrű, amelyben bármely gyűrű-nitrogénatom oxidált állapotban lehet N-oxidként, mely gyűrű tetszés szerint kondenzálódhat egy benzolgyűrűhöz vagy egy 5-, 6- vagy 7-tagú heterociklusos gyűrűhöz, és amelyben a gyűrűk bármelyike tetszőlegesen az alábbi szubsztituenseket tartalmazhatja:

- (a) egy vagy több szubsztituens, melyeket egy mástól függetlenül a hidroxilcsoport, halogénatom, -CN, -CO₂H, -CO₂-(1-6 szénatomos alkil)-, -(1-6 szénatomos alkil)-CO₂-(1-6 szénatomos alkil)-, -CONH₂, -CONH-(1-6 szénatomos alkil)-, -CON-(1-6 szénatomos alkil)₂-, -CHO, -CH₂OH, 1-4 szénatomos perfluoralkil-, -O-(1-6 szénatomos alkil)-, -S-(1-6 szénatomos alkil)-, -SO-(1-6 szénatomos alkil)-, SO₂-(1-6 szénatomos alkil)-, -NO₂, -NH₂, -NH-(1-6 szénatomos alkil)-, -N-(1-6 szénatomos alkil)₂-, és -NHCO-(1-6 szénatomos alkil)-csoport, vagy
- (b) egy csoport, melyet az 1-6 szénatomos alkil-, 2-6 szénatomos alkenil-, 2-6 szénatomos alkinil-, 3-8 szénatomos cikloalkil-, 4-8 szénatomos cikloalkenil-, fenil-, benzil-, heteroaril- vagy heteroaril-metil-csoport közül választunk, melyek bármelyike tetszőlegesen egy vagy több szubsztituenst tartalmazhat az alábbiak közül: halogénatom, hidroxil-, amino-, karboxil-, 1-4 szénatomos perfluoroalkil-, 1-6 szénatomos alkil-, -O-(1-6 szénatomos alkil)- vagy -S-(1-6 szénatomos alkil)-csoport.

R₅ jelentése hidrogénatom vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport;
vagy e vegyület sója, hidrátja vagy szolvátja.

A találmány rövid leírása

Az N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid a vegyületek egy olyan osztályának tagja, melyet a WO 95/19956 sz. szabadalmi kérelemben általánosan leírnak és levédenek, de se magát az osztályt, sem annak tulajdonságait nem jellemzik közelebbről.

A WO 95/19956 sz. szabadalmi kérelem azt állítja, hogy a közölt vegyületosztályban az aromás vagy heteroaril R₄ szubsztituens általában azal a váratlan és kívánatos hatással rendelkezik, hogy az ismert vegyületekkel összehasonlítva, melyek hasonló szerkezetűek, de eltérő (általában metil) R₄ szubsztituenst tartalmaznak, növekvő aktivitással bír a stromelizinnel szemben, míg a kollagenázzal és a zselatinázzal szemben az aktivitása hasonló. Ezen osztály tagjaként a kiválasztott N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid szintén rendelkezik ezekkel a tulajdonságokkal.

Mindazonáltal, ismert, hogy egyes állatokban és humán betegekben bizonyos MMP inhibitorok mellékhatásaként izom- és csontfájdalom (melyet néha "tendinitis"-nek is neveznek) lép fel az ízületekben, például a vállízületben, ha magas és/vagy hosszantartó dózisban kapják a fenti ve-



gyületeket. Bár úgy sejtik, hogy ez a hatás gyakorlatilag reverzibilis a szerzedésének abbahagyása után, mégis egy nemkívánatos hatás. A fájdalom keletkezésének mechanizmusát még nem értjük, és eddig még nem sikerült összefüggésbe hozni a vegyület fájdalomkiváltó hajlamát a molekula szerkezeti jellegzetességeivel vagy enzimgátló profiljával. Ennek megfelelően, ma még nem lehet előre megjósolni, hogy egy adott MMP inhibitor okoz-e mellékhatást, és ha okoz, milyen súlyosságban, ezért empirikusan kell tesztelni a molekulákat.

Azt találták, hogy a kiválasztott N^1 -[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]- N^4 -hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid igen csökkent hajlandóságot mutat az izom- és csontfájdalomként jelentkező mellékhatás kiváltására. Ebből a szempontból különbözik közeli szerkezeti analógjaitól, például az N^1 -[2,2-dimetil-1S-(piridin-3-ilkarbamoil)-propil]- N^4 -hidroxi-2R-izobutil-3S-hidroxi-szukcinamidtól, mely sokkal nagyobb mértékben váltja ki e mellékhatást.

A WO 95/19956 sz. szabadalmi kérelem azt is állítja, hogy az arilamid MMP inhibitorok közötti osztálya olyan vegyületeket is tartalmaz, melyek szájon keresztül történő bevétel esetén biológiailag hasznosíthatók. Azonban a WO 95/19956 sz. szabadalmi kérelemben szereplő vegyületek közül nem mindegyik hasznosítható megfelelő mértékben biológiailag szájon keresztül történő bevétel esetén, amint azt például a szert szájon keresztül szedő állatok vérében található hatóanyagszinthez rendelhető MMP

inhibitor-aktivitás csúcsszintje vagy az aktivitásszint időbeli változása ("görbe alatti terület") bizonyítja. Azt találták, hogy a jelen találmánynak megfelelően választott vegyület, az N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid szájon át szedve biológiailag hasznosítható emberben és más emlősökben.

Ez a kombináció, mely a szájon át történő szedés melletti biológiai hasznosíthatóságot és a tendinitikus mellékhatások kiváltásának csökkent hajlamát ötvözi, magában foglalja azt, hogy a találmány szerinti vegyület viszonylag széles terápiás hatókörrel rendelkezik olyan betegségek kezelésében, melyek az MMP inhibitorok közepes vagy hosszabb ideig tartó szedését kívánják meg. A vegyület ennek megfelelően javallt például a reumás arthritis, a rákos daganatok, a sclerosis multiplex (MS), a Guillain-Barre szindróma (GBS) és a psoriasis kezelésében.

A találmány részletes leírása

A jelen találmány tárgyát a (II) képletű N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid, valamint gyógyszerészetileg elfogadható sói, hidrátjai és szolvátjai képezik.

A találmány szerinti vegyület három aszimmetriás szénatomot tartalmaz, melyek sztereokémiai konfigurációját a vegyület neve előtt adjuk meg, és a (II) ábrán ábrázoljuk. Mindazonáltal, figyelembe kell vennünk, hogy a találmány a (II) vegyület enantiomereinek keverékét is magában

foglalja, feltéve, hogy a megjelölt enantiomer túlsúlyban van. Az ilyen enantiomer-keverékek előnyösen 90%-ban (tömeg%) vagy annál nagyobb arányban tartalmazzák a megjelölt enantiomert.

A találmány szintén tartalmazza azokat a gyógyszerészeti összetételeket, melyek az N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamidot vagy annak gyógyszerészetileg elfogadható sóját, hidrátját vagy szolvátját egy gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyaggal együtt tartalmazzák. A találmány szerinti előnyös összetételek azok, melyek alkalmasak szájon át történő bevitelre.

A találmány továbbá tartalmazza az N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid vagy annak gyógyszerészetileg elfogadható sója, hidrátja vagy szolvátja felhasználását emlősök, köztük emberek esetén a reumás arthritis, a rákos daganatok, a sclerosis multiplex (MS), a Guillain-Barre szindróma (GBS) és a psoriasis kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállítására.

A találmány szintén tartalmaz egy eljárást a reumás arthritis, a rákos daganatok, a sclerosis multiplex (MS), a Guillain-Barre szindróma (GBS) és a psoriasis kezelésére emlősök, köztük emberek esetén, mely eljárás során az emlősnek az N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid vagy annak gyógyszerészetileg elfogadható sója, hidrátja vagy szolvátja olyan mennyiségét adjuk be, mely

elegendő ezen betegségek tüneti és/vagy patológias megjelenésének csökkentésére.

A találmány szerinti vegyület sói közé tartoznak a fiziológiailag elfogadható savaddíciós sók, például a hidroklorid-, hidrobromid-, szulfát-, metánszulfonát-, p-toluolszulfonát-, foszfát-, acetát-, citrát-, szukcinát-, laktát-, tartarát-, fumarát- és maleát-sók. Sók képezhetők bázisokkal is, például nátrium-, kálium-, magnézium- és kalcium-sók.

A találmány szerinti kiválasztott vegyületet a továbbiakban következő példában leírt módon állíthatjuk elő és bármilyen eljárással alkalmassá tehetjük a bevételre, mely összhangban van farmakokinetikai tulajdonságaival. A szájon át bevehető összetételek lehetnek tabletták, kapszula, por, szemcse, elszopogatható tabletták alakban, folyadék- vagy gélkészítmény, mint orális, topikális vagy steril parenterális oldat vagy szuszpenzió formájában. A szájon át bevehető tabletták és kapszulák lehetnek egységnyi dózist tartalmazó alakban és tartalmazhatnak hagyományos kötőanyagokat, mint tapadást elősegítő anyagok, töltőanyagok, tabletták nedvesítői, szétesést elősegítő anyagok vagy elfogadható nedvesítőszer. A tablettákat a szokásos gyógyszerészeti gyakorlatban jól ismert eljárásokkal vonhatjuk be. Az orális folyadékkészítmények lehetnek például vizes vagy olajos szuszpenziók, oldatok, emulziók, szirupok vagy elixírek, illetve lehetnek por alakban, felhasználás előtt vízzel vagy más alkalmas segédanyaggal történő oldat- illetve szuszpenziókészítés céljára. Az ilyen folyadékkészítmé-

nyek tartalmazhatnak hagyományos adalékokat, mint a szuszpendálószerke, emulgeálószerke, nem-vizes oldószerke (melyek közé tartozhatnak az étkezési olajok), tartósítószerkeket, és ha kívánatos, hagyományos ízesítőanyagokat és színezékeket.

A hatóanyagot parenterálisan is beadhatjuk egy steril közegben. Az alkalmazott oldószertől és koncentrációtól függően a gyógyszer lehet szuszpendálva vagy oldva az oldószereben. Az adjuvánsok, mint a helyi érzéstelenítők, tartósítószerke és pufferoló vegyületek lehetnek oldva az oldószereben.

A találmány szerinti vegyület dózisa bármely adott klinikai javallat és a beadás adott módja esetén klinikai vizsgálatok során határozható meg a megfelelő hatóságok elfogadási szabályainak szokásos gyakorlatának megfelelően. Általánosan, várható, hogy emberek esetén a gyógyszert szájon át adjuk be, 5 és 100 mg közötti dózisegységként, naponta két-három alkalommal.

A következő példa a találmány szerinti vegyület előállítását szemlélteti. A kiindulási anyagokat, a 2R-(2,2-dimetil-5-oxo-[1,3]-dioxolan-4S-il)-4-metil-pentánsavat és az L-terc-leucin-N-(2-piridil)-amidot a WO 95/19961 sz. szabadalmi kérelemben leírtak alapján állítjuk elő.



A példában a következő rövidítéseket használjuk:

DMF	N,N-dimetilformamid
EDC	N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid-hidroklorid
HOBt	1-hidroxi-benzotriazol
NMM	N-metilmorfolin
THF	tetrahidrofurán

PÉLDA

N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-
-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid

A. lépés:

2S-hidroxi-3R-izobutil-borostyánkősav-dimetilészter

2R-(2,2-dimetil-5-oxo-[1,3]-dioxolan-4S-il)-4-metil-pentánsavat (75.0 g, 0.326 mmól) feloldunk metanolban (500 ml) és lehűtjük 0°C-ra, majd a keletkezett oldatot hidrogén-klorid gázzal telítjük. A reakcióelegyet hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni és éjszakán át keverjük. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk és a maradékot feloldjuk diklórmetánban, majd egymás után telített nátrium-hidrogénkarbonáttal és telített sóoldattal mossuk. A szerves fázist vízmentes magnézium-szulfát fölött szárítjuk, leszűrjük, és csökkentett nyomáson szárazra pároljuk, így a címvegyületet kapjuk sárga olaj formájában (53 g, 75%). ¹H-NMR; δ (CDCl₃);



4.10 (1H, d, J = 4.0 Hz), 3.60 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.18 (széles s), 2.78 (1H, m), 1.61-1.40 (2H, m), 1.28 (1H, m), és 0.76-0.73 (6H, m).

B. lépés

2R-izobutil-3S-metoxi-borostyánkősav-dimetilészter

2S-hidroxi-3R-izobutil-borostyánkősav-dimetilésztert (23.9 g, 110 mmól) feloldunk DMF-ban (200 ml) és desztillált jódmétánt (8.2 ml, 132 mmól), majd ezüst(I)-oxidot (27.95 g, 121 mmól) adunk hozzá. A reakcióelegyet 7 napig keverjük szobahőmérsékleten, fénytől elzárva. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk, a maradékot oszlopkromatográfiával tisztítjuk (szilikagél, diklórmétán eluens), így a címvegyületet kapjuk viszkozus sárga olaj alakjában (19.16 g, 75%). ¹H-NMR; δ (CDCl₃); 3.83 (1H, d, J = 7.5 Hz), 3.71 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.30 (3H, s), 2.85 (1H, m), 1.65-1.39 (2H, m), 1.10 (1H, m), és 0.83-0.81 (6H, m).

C. lépés

Dilítium-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinát

Lítium-hidroxidot (1.76 g, 42.0 mmól) hozzáadunk 2R-izobutil-3S-metoxi-borostyánkősav-dimetilészter (4.70 g, 20.0 mmól) metanol (30 ml) és víz (30 ml) elegyében felvett oldatához. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten keverjük két órán át, ekkor az oldószereket csökkentett nyomáson eltávolítjuk, így a címvegyületet kapjuk sárga szilárd anyag formájában



(4.40 g, kvantitatív). $^1\text{H-NMR}$; δ (CD_3OD); 3.52 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 3.27 (3H, s), 2.65 (1H, m), 1.56-1.53 (2H, m), 1.31 (1H, m), és 0.82-0.78 (6H, m).

D. lépés

2R-izobutil-3S-metoxi-borostyánkősav-4-metilészter

Dilítium-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinátot (25.14 g, 116 mmól) feloldunk vízmentes THF-ban (150 ml) és az oldatot 0°C -ra hűtjük. Trifluorecetsav-anhidridet (30 ml) adunk hozzá és az elegyet 0°C -on keverjük további 4 órán át. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk és a maradékot feloldjuk vízmentes metanolban (200 ml) 0°C -on, majd az oldatot éjszakán át keverjük szobahőmérsékleten. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk, így a címvegyületet kapjuk sárga olaj formájában (54.3 g, beleértve 2 ekvivalens lítium-trifluoracetátot is), melyet további tisztítás nélkül használunk fel az E. lépésben. $^1\text{H-NMR}$; δ (CD_3OD); 7.71 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 3.65 (3H, s), 3.24 (3H, s), 2.72 (1H, m), 1.56-1.42 (2H, m), 1.06 (1H, m), és 0.81-0.79 (6H, m).



E. lépés

3R-[2,2-dimetil-1S-(piridilkarbamoil)-propilkarbamoil]-2S-metoxi-5-metil-hexánsav-metilészter

A D. lépés termékét (25.06 g, 53.7 mmól 2R-izobutil-3S-metoxi-borostyánkősav-4-metilészterrel ekvivalens) feloldjuk DMF-ban (200 ml) és az oldatot 0°C-ra hűtjük, míg a HOBt-t (8.70 g, 53.7 mmól) és az EDC-t (12.35 g, 64.4 mmól) hozzáadjuk. Az elegyet keverés közben hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni 2 óra alatt. Az így képződött aktív észter oldatát lehűtjük 0°C-ra, L-terc-leucin-N-(2-piridil)-amidot (11.11 g, 53.7 mmól) adunk hozzá és az elegyet éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk és a maradékot feloldjuk etil-acetátban. Az oldatot egymás után mossuk 1M nátrium-karbonát oldattal és telített sóoldattal, vízmentes magnézium-szulfát fölött szárítjuk, leszűrjük és szárazra pároljuk. A maradékot oszlopkromatográfiával tisztítjuk (szilikagél, 0-5% között változó metanol-gradiens diklórmetánban), így a címvegyületet kapjuk fehér szilárd anyag formájában (13.41 g, 61%). ¹H-NMR; δ (CDCl₃): 9.61 (1H, s), 8.47 (1H, m), 8.24 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.74 (1H, m), 7.07 (1H, m), 6.97 (1H, d, J = 8.9 Hz), 4.64 (1H, d, J = 8.9 Hz), 4.01 (1H, d, J = 7.6 Hz), 3.76 (3H, s), 3.41 (3H, s), 2.75 (1H, m), 1.79 (1H, m), 1.51 (1H, m), 1.11 (1H, m), 1.02 (9H, s), 0.84 (3H, d, J = 6.3 Hz) és 0.82 (3H, d, J = 6.3 Hz).

F. lépés

Lítium-3R-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propilkarbamoil]-2S-metoxi-5-metil-hexanoát

3R-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propilkarbamoil]-2S-metoxi-5-metil-hexánsav-metilésztert (13.4 g, 32.9 mmól) feloldunk THF (265 ml) és víz (65 ml) keverékében, és lítium-hidroxid-monohidrátot (1.396 g, 33.3 mmól) adunk hozzá. Az oldatot két órán át keverjük szobahőmérsékleten, majd csökkentett nyomáson bepároljuk, így egy sárga olajat kapunk, melyet tovább szárítunk toluollal történő azeotrópos elegy képzésével. A terméket (13.4 g, oldószermaradványokat tartalmaz) azonnal felhasználjuk további tisztítás nélkül. ¹H-NMR; δ (CD₃OD, 3.5:1 arányú diasztereomerkeverék): 8.31 (1H, m), 7.99 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.66 (1H, m), 7.00 (1H, m), 4.49 (0.23H, s; kisebb arányban jelen lévő diasztereomer), 4.37 (0.77H, s, nagyobb arányban jelen lévő diasztereomer), 3.52 (0.77H, d, J = 7.6 Hz, nagyobb arányban jelen lévő diasztereomer), 3.21 (0.69H, s; kisebb arányban jelen lévő diasztereomer), 3.20 (2.31H, s, nagyobb arányban jelen lévő diasztereomer), 2.64 (1H, m), 1.53 (2H, széles m), 1.18 (1H, m), 1.01 (9H,s) 0.85 (3H, d, J = 6.4 Hz) és 0.81 (3H, d J = 6.3 Hz).



G. lépés

N⁴-benziloxi-N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-2R-

izobutil-3S-metoxi-szukcinamid

Az F. lépés termékét (13.4 g, kb.33 mmól) feloldjuk vízmentes DMF-ban (250 ml) majd argonatmoszférába helyezük és -10°C-ra hűtjük keverés közben. Etil-kloroformátot (3.47 ml, 36 mmól) adunk hozzá cseppenként, majd NMM-t (1.8 ml, 16.5 mmól). Az elegyet 30 percig keverjük, mielőtt cseppenként hozzáadunk O-benzil-hidroxilamint (6 g, 49 mmól) DMF-ban (10 ml). A reakcióelegyet hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni és éjszakán át keverjük. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk és a maradékot etil-acetát és telített sóoldat között megosztjuk. A szerves fázist 1M nátrium-karbonát oldattal mossuk, magnézium-szulfát fölött szárítjuk, leszűrjük és bepároljuk. A maradékot flash kromatográfiával tisztítjuk (szilikagél, 5% metanol diklórmétánban). A kívánt terméket tartalmazó frakciókat összeöntjük és bepároljuk. A terméket dietil-éterrel elmorzsoljuk, hogy a nyomnyi színes szennyeződést eltávolítsuk. Termelés: 9.44 g (58%, >10:1 arányú diasztereomer-elegy). ¹H-NMR; δ (CDCl₃, a nagyobb arányban jelen lévő diasztereomerre) 10.26 (1H, s), 9.93 (1H, s), 8.32 (1H, m), 8.23 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.63 (1H, m), 7.25 (5H, m), 7.12 (1H, d, J = 9.2 Hz), 7.02 (1H, m), 4.94 (1H, d, J = 10.8 Hz), 4.76 (2H, d, J = 3.8 Hz), 3.88 (1H, d, J = 5.5 Hz), 3.32 (3H, s), 2.91 (1H, m), 1.72 (1H, m), 1.55 (1H, m),

1.35 (1H, m), 1.02 (9H, s), 0.89 (3H, d, J = 6.5 Hz) és 0.85 (3H, d, J = 6.5 Hz).

H. lépés

N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-

izobutil-3S-metoxi-szukcinamid

N⁴-benziloxi-N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamidot feloldunk metanol (75 ml) és etanol (75 ml) keverékében és argonatmoszféra alá helyezünk. 10% palládiumot tartalmazó aktív szenet adunk hozzá és hidrogéngázt buborékolatunk keresztül az oldaton 2 órán át, mely idő alatt TLC-analízissel bizonyítva valamennyi kiindulási anyag elfogy. A rendszert átöblítjük argonnal és a katalizátort szűréssel eltávolítjuk. Az oldószereket csökkentett nyomáson eltávolítjuk, így a címvegyületet kapjuk fehér szilárd anyag formájában (8.8 g, kvantitatív; 12:1 arányú diasztereomer-keverék). Op.: 163-164°C. ¹H-NMR; δ ((CD₃)₂SO): 10.67 (1H, s), 10.13 (1H, s), 8.90 (1H, s), 8.15 (1H, m), 7.89 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.81 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.60 (1H, m), 6.93 (1H, m), 4.53 (0.12H, d, J = 9.4 Hz), 4.43 (0.88H, d, J = 8.8 Hz), 3.74 (0.12H, d, J = 10.0 Hz), 3.32 (0.88H, d, J = 9.8 Hz), 2.98 (0.3H, s), 2.96 (2.64H, s), 2.78 (1H, m), 1.23 (2H, m), 0.84 (10H, s és m), 0.65 (3H, d, J = 6.4 Hz) és 0.56 (3H, d, J = 6.3 Hz). ¹³C-NMR; δ (CD₃OD), 172.6, 170.0, 166.0, 151.5,



147.9, 136.0, 119.5, 113.6, 61.2, 60.6, 56.7, 46.2, 37.0, 34.0, 26.5, 25.2, 23.7 és 21.7. IR: ν_{\max} (KBr): 3255, 2957, 1700, 1645, 1524, 1467, 1435, 1370, 1301, 1213 és 1152 cm^{-1} . Számított elemi összetétel $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 0.2 \text{H}_2\text{O}$ esetén: C 58.40, H 7.92, N 13.61%. Talált értékek: C 58.29, H 7.92, N 13.60%.

A. biológiai példa

A találmány szerinti vegyület hatékonyságát a szövetek közötti kollagenáz inhibitoraként Cawston és Barrett, (Anal. Biochem., **99**, 340-345, 1979) módszerével határozzuk meg, mely szerint a vizsgálni kívánt vegyület 1 mM oldatát, vagy annak hígítását 37°C-on kollagénnel és kollagenázzal (melyet 5 mM CaCl_2 -ot, 0.05% Brij 35-öt és 0.02% NaN_3 -ot tartalmazó 25 mM HEPES, pH 7.5 oldattal pufferolunk) együtt inkubáljuk 16 órán keresztül. A kollagén acetilezett ^{14}C -kollagén, melyet Cawston és Murphy (Methods in Enzymology, **80**, 711, 1981) módszere szerint állítunk elő, melyet itt hivatkozásként említünk. A mintákat lecentrifugáljuk, hogy az emésztetlen kollagén leülepedjen, és a radioaktív felülúszót eltávolítjuk szcintillációs számlálóban történő mérés céljára, mellyel a hidrolízis mértékét határozzuk meg. A tesztvegyület 1 mM koncentrációja illetve annak hígítása jelenlétében mért kollagenáz aktivitást összehasonlítjuk az inhibitor nem tartalmazó kontroll minta aktivitásával és az eredményeket az alábbi-



akban tüntetjük fel a kollagenáz aktivitás 50%-ának gátlását előidéző inhibitor-koncentráció megadásával (IC_{50}).

A találmány szerinti vegyület hatékonyságát a stromelizin-1 inhibitoraként Cawston et al., (Biochem. J., **195**, 159-165, 1981) módszere szerint határozzuk meg, ahol a vizsgálni kívánt vegyület 1 mM oldatát, vagy annak hígítását 37°C-on stromelizinnel és ^{14}C -acetilezett kazeinnel (melyet 5 mM $CaCl_2$ -ot, 0.05% Brij 35-öt és 0.02% NaN_3 -ot tartalmazó 25 mM HEPES, pH 7.5 oldattal pufferolunk) együtt inkubáljuk 16 órán keresztül. A kazein a Cawston et al., (fent idézett munka) eljárása szerint előállított ^{14}C -acetilezett kazein. A tesztvegyület 1 mM koncentrációja illetve annak hígítása jelenlétében mért stromelizin aktivitást összehasonlítjuk az inhibitor nem tartalmazó kontroll minta aktivitásával és az eredményeket az alábbiakban tüntetjük fel a stromelizin aktivitás 50%-ának gátlását előidéző inhibitor-koncentráció megadásával (IC_{50}).

A találmány szerinti vegyület hatékonyságát a 72 kDa zselatináz inhibitoraként a Sellers et al., (Biochem. J., **171**, 493-496, 1979) módszerén alapuló eljárás szerint határozzuk meg. A 72 kDa zselatinázt RPMI-7951 sejtekből nyerjük és zselatin-agaróz kromatográfiával tisztítjuk. Az enzimet aminofenil-higany-acetáttal történő inkubálással aktiváljuk, és körülbelül 0.05 egységnyi mennyiséget 50 μg [^{14}C]-radiojelzett zselatinnal inkubálunk egy megfelelő pufferban 16 órán keresztül 37°C-on. Az inkubációs idő el-



teltével 50 μg borjú szérumalbumint és triklórecetsavat (végkoncentráció 16%) adunk az elegyhez a reakció leállítására és a lebontatlan szubsztrát kicsapására. A reakciócsöveket jégre helyezzük 15 percre, majd 10,000 g fordulatszámmal 15 percig centrifugáljuk, hogy a kicsapódott szubsztrát kiülepedjen. A reakcióelegy felülúszójából 200 μl -t kiveszünk és a radioaktivitását szcintillációs számlálóval megmérjük. Az inhibitorok hatását egy dózis-válasz görbével történő összehasonlítással határozzuk meg. Az IC_{50} értéket (az az inhibitor koncentráció, mely az enzimaktivitás 50%-os csökkenéséhez szükséges) az adatokhoz történő görbeillesztéssel és az enzimaktivitás 50%-ának gátlásához szükséges inhibitor koncentráció kiszámolásával határozzuk meg. Minden IC_{50} meghatározásához az inhibitor legalább 8 koncentrációját vizsgáljuk. Az inhibitorokat DMSO-ban oldjuk fel és hígítjuk.

A találmány szerinti vegyülettel végzett fenti vizsgálatok eredményei a következők:

Enzim	$\text{IC}_{50}(\text{nM})$
kollagenáz	10
72 kDa zselatináz	70
stromelizin	30

B. biológiai példa

A laboratóriumi állatokkal végzett vizsgálatokban a találmány szerinti vegyület beadása után mérjük az állatok vérében a tesztvegyület koncent-

rációjának időbeli változását. A vegyületet gyomorszondán keresztül kezelési csoportonként 6 hím (300 g súlyú) patkánynak adjuk be. A vérmintákat a farokvénából történő vérvétellel nyerjük a beadás után 0.5, 1.0, 2.0, 6.0 és 24 órával. 0.4 ml vért 4.5 ml-es csövekbe helyezünk, melyek 0.1 ml savas citrát-dextrózt (ACD) tartalmaznak véralvadásgátlóként. Az extraháláshoz 3 ml metanolt adunk a csövekhez és a kicsapódott vért centrifugálással ülepitjük (30 perc 3000 fordulat/perc sebességgel). A felülúszó 2 ml-es alikvotját eltávolítjuk és liofilezéssel betöményítjük. Az extraktumot feloldjuk 200 μ l DMSO-ban és egy 10 μ l-es alikvotot felhasználunk a kollagenáz-inhibitor aktivitás meghatározásához. Az extraktumok kollagenáz-inhibitor aktivitását a fenti A. biológiai példában említett kollagenáz-mérés felhasználásával határozzuk meg, az inhibitor (azaz a gyógyszer és bármely aktív metabolitja) koncentrációját standard görbékkel történő összehasonlítással kapjuk meg. Az eredményeket ng/ml-ben kifejezett csúcskoncentrációként, a görbe alatti területként (AUC) ng/ml x óra egységben kifejezve 0.5 és 24 óra között, valamint a görbe alatti területként az IC_{50} -ek száma x óra egységben kifejezve adjuk meg.

Eredmények

Csúcsconc.	AUC (0.5-24 óra)	AUC (0.5-24 óra)
ng/ml	ng/ml x óra	IC ₅₀ -ek száma x óra
212	2966	674

A találmány szerinti vegyületet szájon keresztül történő beadás mellett szintén teszteljük fehér selyemmajmokon és egészséges önkéntes embereken, és jelentős inhibitoraktivitási szinteket találunk ezen alanyok vérében ilyen beadás után.

C. biológiai példa

A találmány szerinti vegyületet két rákos állatmodellen teszteljük és aktívnak találjuk:

B16 egér melanóma modell

Ebben a modellben C57/BL6J egerek bőre alá 10^5 B16 egér melanóma sejtet injektálunk. A tumorokat 18 napig hagyjuk nőni, a tumor tömegét kalibráló mérések és a következő képlet segítségével számítjuk ki: tömeg (mg) - hossz (mm) x szélesség (mm) + 4. Az egerek egy csoportja (n=19) a vizsgálandó vegyületet kapja, melyet a B16 tumorról átellenes oldallágyék bőre alá ültetett miniatűr ozmotikus pumpa juttat a szervezetükbe. A pumpát a tumor injektálása előtti napon ültetjük be és a vegyületet 360 µg/nap adagban juttatjuk az egerekbe. A kontrollcsoport (n=17) a

megfelelő hordozóanyag azonos térfogatát kapja azonos beültetett pumpák segítségével.

A 18. napon a kontroll-tumorok átlagtömege 1145 ± 97 mg (a 15. ábrán látható). A vegyülettel kezelt tumorok átlagtömege 774 ± 50 mg. Ez a csökkenés (32%-os a tesztvegyület esetében) szignifikáns ($p < 0.005$). A vizsgálat végén vett minták mérése azt mutatja, hogy a plazmaszint 26.8 ± 3.2 ng/ml a tesztvegyület esetében.

MDA-435 emlő-karcinóma modell

Ebben a modellben az állatokba MDA-435 sejteket injektálunk (10^5 sejt/egér), a tumorokat négy napig hagyjuk nőni, ekkor az állatokat a tumor tömege szerint három kezelési csoportba osztjuk ($n = 15$ csoportonként). Az 5. napon minipumpákat ültetünk be sebészeti úton, melyek vagy a hordozót, vagy a tesztvegyületet tartalmazzák 15 mg/ml illetve 60 mg/ml koncentrációban (180 illetve 720 $\mu\text{g}/\text{egér}/\text{nap}$ mennyiségben juttatják a vegyületet az állatba). A pumpákat a 19. napon újakra cseréljük és a vizsgálatot a 32. napon fejezzük be. A tumornövekedés dóziszfüggő gátlását figyelhetjük meg, 19%-os gátlással a 180 $\mu\text{g}/\text{egér}/\text{nap}$ dózisonál, és 33%-os gátlással a 720 $\mu\text{g}/\text{egér}/\text{nap}$ dózisonál. A gátlás a magasabb dózisonál statisztikailag szignifikáns ($p < 0.005$). A vizsgálat végén vett minták mérése

azt mutatja, hogy a plazmaszint 99 ± 6 ng/ml és 136 ± 42 ng/ml a tesztvegyület alacsony és magas dózisékat kapó csoport esetében.

D. biológiai példa

A találmány szerinti vegyületnek azon hajlamát teszteljük, hogy okoz-e megfigyelhető, tendinitisre utaló jeleket patkányokban. A találmány szerinti vegyület ("A vegyület") tendinitist okozó hatását patkányokban összehasonlítjuk egy közeli szerkezeti izomer, nevezetesen az N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-3-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-hidroxi-szukcinamid ("B vegyület") hasonló hatásával.

Hím Lewis patkányokat használunk. Minden vizsgálatnál 30 patkányt lemérünk és testsúly szerint csoportokba osztjuk, n=6/csoport. Minden vizsgálatban egy megfelelő hordozót kapó kontrollcsoportot vizsgálunk a kezelt csoportokkal párhuzamosan.

Az A vegyületet a mezilát-só alakjában használjuk beadásra, míg a B vegyületet a szabad bázis alakban adjuk be. Az A vegyület 15 mg/ml-es oldatánál a hordozó 50% DMSO, 37% 0.1 M metánszulfonsav, 13% steril víz; a 30 mg/ml-es oldatánál a hordozó 50% DMSO, 37% 0.2 M metánszulfonsav, 13% steril víz. A B vegyület 15 mg/ml-es oldatánál a hordozó 50% DMSO/víz.

Alzet (márkanév) ozmotikus minipumpákat (2ML2, 14 napos, 5 μ l/óra kapacitással az Alza Corp.-tól, Palo Alto CA 94303) lemérünk üresen és telítve, hogy megbizonyosodjunk a pontos töltési térfogatról. A beültetés előtt a megtöltött pumpákat 37°C-os inkubátorba helyezzük. Valamennyi patkányt halothannal altatjuk el. Amint az állatok elalszanak, a bőrüket a kívánt helyen leborotváltjuk és fertőtlenítjük. Egy hosszanti, kb. 2 cm-es bevágást ejtünk az előkészített bőrön, és egy bőr alatti zsebet alakítunk ki két érszorító segítségével. A minipumpákat behelyezzük úgy, hogy a pumpa kimenete a sebbel átellenes oldalon helyezkedik el. A vágott sebet varratokkal összezárjuk és a seb körüli területet újra fertőtlenítjük. A műtét után közvetlenül valamennyi patkány fájdalomcsillapítót kap (Temgesic-kereskedelmi márka- Reckitt and Colman), 0.1 mg/kg dózisban bőr alá az oldallágyékba. Az altatásból való ébredés után az állatokat visszahelyezzük a ketrecekbe, melyek száraz almot tartalmaznak, hogy biztosítsuk a seb pormentességét a gyógyulásig. A műtétet követő napon valamennyi patkányt visszahelyezzük standard alomra és 3-as csoportokba osztjuk, hogy a tendinitis jeleit pontosabban megfigyelhessük.

A minipumpák beültetését követően a patkányokat lemérjük és figyeljük az esetlegesen fellépő tendinitis jeleit. A tendinitis megjelenését és súlyosságát egy megfigyelésen alapuló pontozásos rendszerrel értékeljük. A patkányokat 16 napon keresztül naponta megfigyeljük. A 2-nél nagyobb



átlagértékeket tartjuk szignifikánsnak. Az alkalmazott pontozási rendszer a következő:

Támaszkodás:		Ha mozgásra készítjük az állatot:	
normális	0	normálisan mozog	0
egy lábon támaszkodik	1	kelletlenül mozog	1
egy lábon sem támaszkodik	2	közepesen kellettlenül mozog	2
		nagyon kellettlenül mozog	3

Testtartás

normális	0
nem használ egy hátsó lábat	1
nem használja egyik hátsó lábát sem	2

Az eredmény azt mutatja, hogy az A vegyületet kapott patkányok (mind a 15 mg/ml, mind a 30 mg/ml dózis esetében, valamint a csak hordozót kapott állatok is) nem mutatnak tendinitisre utaló szignifikáns jeleket, míg azok az állatok, melyek a B vegyületet kapták, a 8 naptól szignifikáns jeleket mutatnak (a 8. napon az átlagérték >2 , amely a 15-16. napon 6-ra emelkedik).

Annak megerősítésére, hogy a fenti vizsgálatban az A és B vegyületet kapó patkányok plazmájában megtalálhatók a minipumpák által közvetített anyagok, a minipumpák beültetését követő 3. és 10 napon vérmin-



tákat veszünk a patkányoktól, melyeket enyhén elaltatunk halothannal a farokvénán keresztül. A vérmintákat (0.5 ml) 3.0 ml metanolt tartalmazó csövekbe helyezzük, hogy a szabad és kötött vegyületeket extraháljuk. Az A illetve B vegyület vérbeli koncentrációját fluorimetrikus eljárással határozzuk meg, a kumarin-peptid szubsztrát, Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ felhasználásával (Mca = (7-metoxikumarin-4-il)-acetyl, Dpa = N-3-(2,4-dinitrofenil)-L-2,3-diaminopropil) (lásd Knight et al., FEBS Lett. 1992, 296, 263-266). A beültetést követő 16. vagy 17. napon a vizsgálat véget ér, ekkor az állatokat halothannal túlaltatjuk és vérmintákat (0.5 ml) veszünk a szívéregből, és az A illetve B vegyület vérbeli koncentrációját meghatározzuk.

E. biológiai példa

A találmány szerinti vegyület hatását vizsgáljuk a GBS egy állatmodelljében.

A kísérleti autoimmun neuritis (EAN) a perifériás idegrendszer egy T-sejt által közvetített, autoimmun zavara. A modell rendelkezik a GBS sok patológiás jellemzőjével, például az ataxia, gyengeség és bénulás tüneteivel. Az EAN-t előidézhethetjük úgy, hogy az állatokba perifériás idegekből származó mielint, vagy a mielin egy fehérjekomponensét, például α Fehérjét injektálunk adjuvánsban. Az EAN sérülés a gerincgyökérben és a perifériás idegekben történik, és a mononukleáris sejtek ér körüli beszűrődése,



az axonok demielinizációja és az idegek vezetőképességének csökkenése jellemzi. A $TNF\alpha$ szerepet játszik a GBS és az EAN patológiájában; a GBS-betegek vérében a $TNF\alpha$ -szintek megemelkednek és az anti- $TNF\alpha$ antitestek csökkentik a betegség súlyosságát az EAN-ben (Hartung HP. *Annals of Neurology* 1993;33:563-567.)

A találmány szerinti vegyületet teszteljük a patkány EAN modellben, melyben a betegség tüneteit perifériás idegek mielinjének adjuvánsban történő injektálásával váltjuk ki.

A vegyületet sebészeti úton beültetett minipumpák segítségével juttatjuk be, 15 vagy 30 mg/ml koncentrációban $5\mu\text{l}/\text{óra}$ sebességgel (lásd a D. biológiai példát), 7 illetve 14 mg/kg/nap dózisban. A vegyülettel végzett kezelés a kísérlet egész időtartama alatt, az 1.-15 napig szignifikánsan, dóziszfüggő módon csökkenti a klinikai tünetek kialakulását. A vegyület akkor is dóziszfüggően csökkenti a klinikai tüneteket az EAN modellben, ha terápiásan a 8.-15 napok között adjuk, 15 illetve 30 mg/ml koncentrációban, $10\mu\text{l}/\text{óra}$ sebességgel, tehát 14 illetve 28 mg/kg/nap dózisban.

F. biológiai példa

A találmány szerinti vegyület aktivitása az MS egy kísérleti modelljében:



Módszer

Az MS Matyszak és Perry által leírt hiperszenzitivitási modellt alkalmazzuk (Matyszak MK and Perry VH. 1995. Demyelination in the central nervous system following a delayed type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guerin. Neuroscience 64:967-977). Hím Lewis patkányokat elaltatunk és 10^5 hővel előlt Calmette-Guerin bacillust (BCG) tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldat $1\mu\text{l}$ -ét injekciózzuk a bal félteke striatumába. Az injektlást egy 27G, $10\mu\text{l}$ kapacitású fecskendővel végezzük, sztereotaxikusan. Az injektlás koordinátái: bregma + 1.2 mm, laterális + 3.0 mm és mélység 4.5 mm. 4 hét elteltével $200\mu\text{l}$, 10^7 hővel előlt BCG organizmust komplett Freund adjuvánsban tartalmazó oldatot injektlunk a hátsó végtag bőrébe. Újabb 15 nap elteltével a patkányok 2750U II típusú torna-peroxidázt (HRP) tartalmazó intravénás injektlót kapnak. 30perccel ezután a patkányokat mélyen elaltatjuk nátrium-pentobarbitonáttal és a szíven keresztül 100 ml, 5000 U/l heparint tartalmazó 0.9% (w/v) NaCl oldatot, majd ezt követően 200 ml, 2% paraformaldehidet és 0.05% glutáraldehidet tartalmazó parformaldehid-lizin-perjodát fixáló oldatot (PLP) áramoltatunk át. Az állatok agyát eltávolítjuk, még egyszer fixáljuk PLP-ben további 4 órán keresztül, és 30%-os szacharózban 4°C -on éjszakán át történő áztatással védjük a fagyasztás káros hatásaitól, mielőtt egy Tissue-Tek O.C.T (miles inc Elkhart USA) készülékben beágyazzuk és folyékony nitrogénben

lefagyasztjuk. Koronális, szabadon lebegő 50 μm -es metszeteket készítünk a HRP Hanker-Yates módszerrel történő lokalizálására (Perry VH et al., 1992). Ez az eljárás egy késleltetett hiperszenzitivitási reakciót vált ki a sztereotaxikus BCG-injekció helyén, melyre jellemző a vér-agy gát lokális lebomlása, melyet a HRP ereken kívüli jelenlétére irányuló festés jelez; a limfociták beszűrődése, melyet a leukocita általános antigén magas molekulásúlyú formájára specifikus OX-22 antitesttel történő festés mutat; a leukociták aktiválása, melyet a II osztályú fő hisztokompatibilitási antigénre specifikus OX-6 antitesttel végzett festés jelez; és a mielin lebomlás, melyre a mielin bázisfehérje elleni antitesttel történő festés utal. Mindezek a jellemzők az MS-ban szenvedő betegek központi idegrendszerében található aktív sérüléseket vagy plakkokat fémjelzik. A limfociták számát úgy becsüljük meg, hogy a legintenzívebben festődött területeken megszámláljuk az OX-22 pozitív sejteket. Az egy látómezőben lévő sejtek számát feljegyezzük és sejt/ mm^2 -ben fejezzük ki. A II osztályú MHC kifejeződésének, a vér-agy gát szivárgásának és a demielinizációnak a területét számítógépes képanalízis segítségével számítjuk ki és mm^2 -ben fejezzük ki.

A találmány szerinti vegyület hatását patkányokon vizsgáljuk, a vegyület 30 mg/kg dózisát naponta kétszer szájon át beadva az állatoknak, a második BCG-injekció után 5 nappal kezdve és a 15. napig folytatva. A találmány szerinti vegyületet 0.01% Tween 80-at tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldatban formulázzuk. A kontrollállatok csak a hordozót kapják.

A találmány szerinti vegyülettel kezelt állatokban a vér-agy gát szivárgásának, a II osztályú MHC kifejeződésének, a demielinizációnak a területét és a T-sejtek számát összehasonlítjuk a csak hordozóval kezelt kontrollállatok megfelelő értékeivel, a Student-féle T-teszt alkalmazásával.

Eredmények

A hordozóval kezelt állatokban a DTH-választ a vér-agy gát lebomlása, a limfociták beszűrődése, a II osztályú MHC kifejeződése és a demielinizáció jellemzi. A találmány szerinti vegyülettel kezelt állatokban jelentős csökkenés tapasztalható a vér-agy gát szivárgásának területe ($p < 0.05$) és a beszűrődő T-sejtek száma ($p < 0.0001$) esetén. A demielinizáció és a II osztályú MHC kifejeződése területének nagyságában is megfigyelhető csökkenés, habár ez statisztikailag nem szignifikáns.

A találmány szerinti vegyület hatása a MS DTH-modelljében:

	<u>Hordozó</u>	<u>Vegyület</u>
vér-agy gát szivárgása	6.325 ± 1.953	2.042 ± 0.487
T-sejt beszűrődés	851.1 ± 66.5	341.2 ± 21.9
III osztályú MHC kifejeződés	1.763 ± 0.370	1.318 ± 0.300
demyelinizáció	0.960 ± 0.329	0.758 ± 0.227

Az értékek középérték ± a középérték standard deviációja alakban vannak megadva.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A (II) képletű N^1 -[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]- N^4 -hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid, vagy annak gyógyszerészetileg elfogadható sója, hidrátja vagy szolvátja.
2. Olyan gyógyszerészeti összetétel, mely az N^1 -[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]- N^4 -hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamidot, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóját, hidrátját vagy szolvátját egy gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyaggal együtt tartalmazza.
3. A 2. igénypont szerinti összetétel, mely alkalmas a szájon keresztül történő beadásra.
4. Az N^1 -[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]- N^4 -hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid, vagy annak gyógyszerészetileg elfogadható sója, hidrátja vagy szolvátja felhasználása gyógyszerészeti összetétel készítésére a reumás arthritis, a rákos megbetegedések, a sclerosis multiplex, a Guillain-Barre szindróma vagy a psoriasis kezelésére emlősökben, beleértve az embert is.

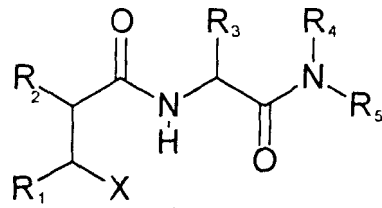
5. Eljárás a reumás arthritis, a rákos megbetegedések, a sclerosis multiplex, a Guillain-Barre szindróma vagy a psoriasis kezelésére emlősökben, beleértve az embert is, melynek során az emlősnek az N¹-[2,2-dimetil-1S-(piridin-2-ilkarbamoil)-propil]-N⁴-hidroxi-2R-izobutil-3S-metoxi-szukcinamid, vagy annak gyógyszerészetileg elfogadható sója, hidrátja vagy szolvátja olyan mennyiségét adjuk be, mely hatásosan csökkenti a betegség tüneti és/vagy patológiás megjelenéseit.

A meghatalmazott

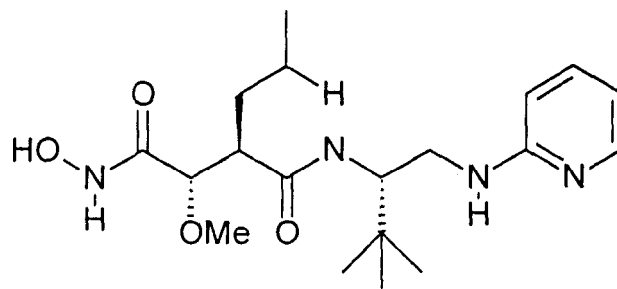
+ 1 lap rajz
Fellérádi úti 13

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az O.B.C. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 13.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-123

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



(I)



(II)