



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **226 241**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 01539**

(22) A bejelentés napja: **1998. 01. 09.**

(40) A közzététel napja: **2000. 11. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyterjesztőben: **2008. 07. 28.**

(51) Int. Cl.: **C07C 323/58** (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C07C 323/59 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 98/00096

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9830537**

(30) Elsőbbségi adatok:

08/783,402 1997. 01. 13. US

(72) Feltalálók:

Hodson, Harold Francis, Beckenham, Kent (GB);

Sawyer, David Alan, Beckenham, Kent (GB);

Beams, Richard Mansfield, Shirley, Surrey (GB);

Drysdale, Martin James, Cambridge,

Cambridgeshire (GB);

Franzman, Karl Witold, London (GB);

Frend, Anthony Joseph, Stevenage,

Hertfordshire (GB);

Knowles, Richard Graham, Stevenage,

Hertfordshire (GB);

Rees, Daryl David, Keston, Kent (GB)

(73) Jogosult:

GLAXO Group Ltd., Greenford, Middlesex (GB)

(74) Képviselő:

dr. Gárdonyi Zoltánné, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

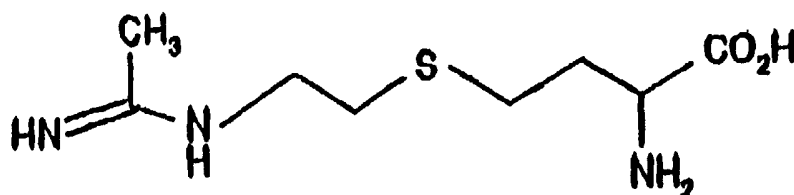
(54)

2-(1-Imino-etil-amino)-etil-homocisztein, eljárás előállítására és az ezt tartalmazó gyógyszerkészítmények

(57) Kivonat

A találmány új (I) képletű amidinoszármazékra, előállítási eljárására, és ezt tartalmazó gyógyszerkészítményekre vonatkozik. A találmány szerinti vegyületek indukálható nitrogén(II)-oxid-szintetázok szelektív inhibi-

toraiként, így különösen gyulladáscsökkentő állapotok, immunrendellenességek, sokkos állapotok, valamint a központi idegrendszer betegségeinek kezelésére alkalmazhatók.



(I)

HU 226 241 B1

A találmány új amidinoszármazéka, továbbá ennek előállítására, a vegyületet tartalmazó gyógyszerkészítményekre vonatkozik. A gyógyszerkészítmények a gyógyászatban, különösen indukálható nitrogén(II)-oxid-szintetázok szelektív inhibitoraiként alkalmazhatók.

A nitrogén(II)-oxid (a továbbiakban NO) az oldható guanilát-cikláz enzim endogén stimulátora, és sokféle biológiai tevékenységben érintett. A túlzott nitrogén(II)-oxid termelésről feltételezik, hogy egy sor kóros állapotban érintett, ideértve a szepikus sokkot és sok gyulladáshoz vezető betegséget. A nitrogén(II)-oxid L-argininből történő biokémiai szintézisét az NO-szintetáz enzim katalizálja. Az NO-szintetáz több inhibitorát is leírták és javasolták már gyógyászati alkalmazásra.

Ezen a területen az utóbbi időben fontos kutatási célként merült fel olyan NO-szintetáz-inhibitorok biztosítása, amelyek szelektivitást mutatnak indukálható NO-szintetázra (iNOS) vagy neuronális NO-szintetázra (nNOS) az endotelális NO-szintetázhoz (eNOS) viszonyítva.

Igy a WO93/13055 számon publikált nemzetközi szabadalmi szabaddalmi bejelentés (A) általános képletű szelektív NO-szintetáz-inhibitorokat, valamint ezek sóit, gyógyászati elfogadható észtereit és amidjait ismerteti, ahol a képletben

R₁ jelentése 1–6 szénatomos egyenes vagy elágazó szénláncú alkilcsoport, 2–6 szénatomos alkenilcsoport, 2–6 szénatomos alkinilcsoport, 3–6 szénatomos cikloalkilcsoport vagy 3–6 szénatomos cikloalkil-1–6 szénatomos alkilcsoport;

Q jelentése 3–6 szénatomos alkilén-, alkenilén- vagy alkinilén-csoport, amely kívánt esetben helyettesítve lehet egy vagy több 1–3 szénatomos alkilcsoporttal; $-(CH_2)_pX(CH_2)_q$ vagy $-(CH_2)_rA(CH_2)_s$ általános képletű csoport, ahol

p értéke 2 vagy 3,

q értéke 1 vagy 2,

r értéke 0, 1 vagy 2,

s értéke 0, 1 vagy 2,

X jelentése S(O)_x-csoport, ahol x értéke 0, 1 vagy 2, oxigénatom vagy NR² általános képletű csoport, ahol R² jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport;

A jelentése 3–6 tagú karbociklusos vagy heterociklusos gyűrű, amely kívánt esetben helyettesítve lehet egy vagy több megfelelő szubsztituenssel, például halogénatommal vagy 1–6 szénatomos alkil-, 1–6 szénatomos alkoxi-, hidroxil-, nitro-, ciano-, trifluor-(1–6 szénatomos alkil)-, amino-, 1–6 szénatomos alkil-amino- vagy di(1–6 szénatomos alkil)-amino-csoporttal.

Kísérleteink során olyan vegyületet találtunk, amelyek a WO93/13055 számú dokumentum igényelt oldalmi körébe esnek, és szelektív iNOS inhibitorok. Ezek jelentős előnyöket mutatnak, így többek között hosszú félélettartamot, valamint *in vivo* orális adagoláskor jó biológiai hozzáférhetőséget.

A találmány tehát (I) képletű vegyületekre, ennek sóira, szolvátjaira és fiziológiásan elfogadható származékaira vonatkozik.

Az (I) képlet az aminosavcsoportban egy aszimmetriacentrumot tartalmaz, és bár az arginin természetes L vagy (S) konfigurációja az előnyös, szándékunk szerint az (I) képlet magában foglalja mind az (S), mind az (R)-enantiomereket vagy lényegében tiszta formában, vagy ezek bármely arányú keverékét.

Igy – alternatív megfogalmazásban – a találmány az alábbi vegyületekre vonatkozik:

(R/S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-DL-homocisztein;

(S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein; és

(R)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-D-homocisztein, továbbá ezek sói, szolvátjai és fiziológiásan elfogadható származékai.

A találmány szerinti megoldás egyik előnyös megvalósítási módja (S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homociszteinre vagy ennek valamely sójára, szolvátjára vagy fiziológiásan elfogadható származékára vonatkozik. A találmány szerinti megoldás egy különösen előnyös megvalósítási módja (S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homociszteinre vagy valamely sójára vonatkozik.

Az (I) képletű vegyület gyógyászati alkalmazható sói és szolvátjai az olyan sók és szolvátok, amelyekben az ellenion vagy a társult oldószer gyógyászati elfogadható. Azok a sók és szolvátok azonban, amelyeknek gyógyászati nem elfogadható ellenionjaik vagy társult oldószereik vannak, szintén a találmány oldalmi körébe tartoznak, például köztitermékként való felhasználáshoz más (I) képletű vegyület és gyógyászati elfogadható sói, szolvátjai és fiziológiásan elfogadható származékai előállításában.

A „fiziológiásan elfogadható származék” kifejezés egy (I) képletű vegyület olyan származékát jelenti, amely azonos fiziológiai funkcióval bír, mint a szabad (I) képletű vegyület, például azzá átalakulva a testben. A találmány értelmében a fiziológiásan elfogadható származékok lehetnek például az észterek, amidok és karbamátok; előnyösen az észterek és az amidok.

A találmány értelmében megfelelő sók például a szerves és szervetlen savakkal vagy bázisokkal alkotott sók. Gyógyászati elfogadható savaddíciós sók például a sósavval, hidrogén-bromiddal, kénsavval, citromsavval, borkósavval, foszforsavval, tejsavval, piro-szőlősavval, ecetsavval, trifluor-ecetsavval, borostyánkősavval, oxálsavval, fumársavval, maleinsavval, oxálcetsavval, metánszulfonsavval, etánszulfonsavval, p-toluolszulfonsavval, benzolszulfonsavval és izetionsavval alkotott sók. Gyógyászati elfogadható bázisos sók például az ammóniumsók, alkálifém-sók, mint például a nátrium- és káliumsók, alkáliföldfém-sók, mint például a kalcium- és magnéziumsók, továbbá a szerves bázisokkal, mint például dicitlohexil-aminnal és N-metil-D-glükaminnal képzett sók.

Az (I) képletű vegyület gyógyászati elfogadható észtereit és amidjait a savcsoportokat 1–6 szénatomos alkil-, aril-, aril-(1–6 szénatomos)-alkil- vagy aminosav-észterre vagy amiddá alakított formában tartalmazhatják. Az (I) képletű vegyület gyógyászati elfogadható amidjai és karbamátjai egy aminocsoportot 1–6 szénatomos alkil-, aril-, aril-(1–6 szénatomos)-alkil- vagy

aminosav-amiddá vagy karbamáttá alakított formában tartalmazhatják.

Amint az előzőekben említettük, az (I) képletű vegyület az NO-szintetáz-inhibitora, amint ezt a későbbiekben NOS gátlási vizsgálatok alapján bemutatjuk.

Ennélfogva az (I) képletű vegyület és gyógyászati-
lag elfogadható sói, szolvátjai és fiziológiásan elfogadható származékai olyan kóros klinikai állapotok megelőzésében és kezelésében alkalmazhatók, amelyekhez NO-szintetáz-inhibitor, különösen iNOS-inhibitor javallt. Az ilyen kóros állapotok például a gyulladással, sokkos állapotok, immun-rendellenességek, valamint a gyomor- és bélrendszer mozgékonyosságának rendellenességei. Az (I) képletű vegyület és gyógyászati-
lag elfogadható sói, szolvátjai és fiziológiásan elfogadható származékai a központi idegrendszer betegségeinek, ezeken belül például a migrénnek a megelőzésében és kezelésében is alkalmazhatók.

A sokkos állapotok olyan állapotokat jelentenek, amelyek az NO túltermelésének eredményei, ilyenek például a septicus sokk, a vérzéses sokk, traumás sokk, vagy olyan sokk, amelyet heveny májelégtelenség idéz elő, vagy a citokinekkel, mint a TNF-fel, IL-1-gyel és IL-2-vel végzett terápia, vagy a citokinindukáló szerekkel, mint például 5,6-dimetil-xantenon-ecetsavval végzett terápia idéz elő.

Gyulladásos állapotok és immun-rendellenességek például az ízületek rendellenességei, elsősorban az ízületi gyulladások (ízületi csúz, oszteoarthritis, prosztetikai ízületi elégtelenség), a gyomor- és bélrendszer rendellenességei (például fekélyes végbélfurug, Crohn-féle betegség és más gyulladásos bélbetegségek, gyomorfurug, fertőzésből eredő nyálkahártyagyulladás és a nem szteroid gyulladásgátlók által kiváltott enteropátia), a tüdő rendellenességei (például felnőtt légzési kimerülési szindróma, asztma, cisztás fibrózis vagy krónikus elzáródásos tüdőbetegség), a szív rendellenességei (például szívizomgyulladás), az idegszövetek rendellenességei (például sclerosis multiplex), a hasnyálmirigy rendellenességei (például cukorbetegség és ennek komplikációi), a vese rendellenességei (például glomerulonefritisz), a bőr rendellenességei (például bőrbaj, pikkelysömör, ekcéma, csalánkiütés), a szem rendellenességei (például zöldhályog), valamint a transzplantált szervek rendellenességei (például kilökődés), továbbá a több szervre kiterjedő betegségek (például a szisztémás eritémás bőrfarkas) és a vírus- és baktériumfertőzések gyulladásos utókövetkezményei.

Ezenkívül bizonyíték van arra, hogy az iNOS révén NO túltermelése következik be ateroszklerózisban és az ezt követő hipoxiás vagy ischaemiás sérülésekben (reperfúzióval vagy a nélkül), például az agyban vagy ischaemiás szívbetegségben.

A gyomor- és bélrendszer mozgékonyságának rendellenességei között megemlítjük a bélelzáródást, például az operációk utáni bélelzáródást és a fertőzések közötti bélelzáródást.

A központi idegrendszer betegségei azokat a betegségeket jelentik, amelyeknél az NO túltermelése

érintett, ilyen például a migrén, elmezavar, szorongás, skizofrénia, alvási rendellenességek, agyi ischaemia, központi idegrendszeri trauma, epilepszia, sclerosis multiplex, AIDS, tébolyodottság, krónikus idegefajulási betegségek (például Lewy Body Dementia, Huntington-kór, Parkinson-kór, Alzheimer-kór), akut és krónikus fájdalom, továbbá olyan kóros állapotok, amelyekben nem adrenerg, nem kolinerg idegek lehetnek érintettek, ilyenek például a priapizmus, elhízottság és hiperfágia.

5 Az akut fájdalmak például izom- és vázrendszer fájdalmak, az operáció utáni fájdalmak és a műtéti fájdalom. A krónikus fájdalmak közt megemlítjük a krónikus gyulladással járó fájdalmakat (például a reumatikus ízületi gyulladás és oszteoarthritis), neuropatikus fájdalmakat (például a sömörös neuralgia, cukorbeteg társult diabéteszes neuropátiák, hármásideg neuralgia; funkcionális bélrendellenességekkel társult fájdalom, például irritálható bél szindróma, nem szív eredetű mellkasi fájdalom és szimpatikus fenntartott fájdalom), továbbá a 10 a krónikus fibromialgiával társult fájdalmakat.

Ezenkívül az NO-szintetáz gátlása előnyös lehet a HIV-fertőzéssel társult limfocitavesztés megelőzésében, a tumorok radioérzékenységének növelésében radioterápia során, továbbá a tumor növekedésének, a 15 tumor előrehaladásának, az angiogenezisnek és az át-tételeknek a csökkentésében.

Következésképpen a találmány szerint vegyületek alkalmazhatók olyan kóros klinikai állapotok megelőzéséhez vagy kezeléséhez emlősökben és emberekben, 20 amelyeknek kezeléséhez a nitrogén(II)-oxid-szintetáz-inhibitor, például iNOS inhibitor javallt; a kezelés során egy (I) általános képletű vegyület vagy gyógyászati-
lag elfogadható sója, szolvátja vagy fiziológiásan elfogadható származéka gyógyászati-
lag hatékony mennyiségű adagoljuk. Közelebbről a találmány szerinti vegyületek gyulladásos és/vagy immunrendellenesség, mint például ízületi gyulladás vagy asztma megelőzéséhez vagy kezeléséhez alkalmazhatók. A találmány szerinti 25 vegyületek különösen előnyösen kóros klinikai állapotok, például ízületi gyulladás, asztma, bélelzáródás és migrén megelőzésére vagy kezelésére alkalmazhatók.

Másképpen: az (I) képletű vegyület és gyógyászati-
lag elfogadható sói, szolvátjai vagy fiziológiásan elfogadható származékai orvosi terápiában való alkalmazáshoz, elsősorban olyan kóros klinikai állapotok megelőzéséhez vagy kezeléséhez alkalmazhatók emlősökben és emberben, amelyeknek kezeléséhez a nitrogén(II)-oxid-szintetáz-inhibitor, például iNOS inhibitor javallt. Közelebbről az (I) képletű vegyület és gyógyászati-
lag elfogadható sói, szolvátjai vagy fiziológiásan elfogadható származékai gyulladásos és/vagy immunrendellenesség, mint például ízületi gyulladás vagy asztma megelőzéséhez vagy kezeléséhez alkalmazhatók. Az (I) képletű vegyület és gyógyászati-
lag elfogadható sói, szolvátjai vagy fiziológiásan elfogadható származékai ízületi gyulladás, asztma, bélelzáródás és migrén megelőzéséhez vagy kezeléséhez alkalmazhatók.

Az (I) képletű vegyületnek vagy gyógyászati-
lag elfogadható sóinak, szolvátjainak vagy fiziológiásan elfogadható származékainak a gyógyászati hatás elérésé-

hez szükséges mennyisége természetesen az adott vegyülettől, a beadás útjától, a kezelés alatt álló személytől és az adott kezelendő rendellenességtől vagy betegségtől függően változik. A találmány szerinti vegyületeket beadhatjuk szájon át vagy injekcióban 0,1–1500 mg/kg/nap, előnyösen 0,1–500 mg/kg/nap közti dózisban. Az adag tartománya felnőtt embereknél általában 5 mg/nap és 35 mg/nap, előnyösen 5 mg/nap és 2 g/nap között van. A tabletták vagy más formák egyes egységei előnyösen a találmány szerinti vegyület olyan mennyiségét tartalmazzák, amely ilyen az adagban vagy ennek az adagnak a többszörösében hatásos; így például az adagok tartalmazhatnak 5 mg és 300 mg közti, általában 10 mg és 200 mg közti mennyiségeket.

Bár lehetséges az (I) képletű vegyületet vagy egy gyógyászatiilag elfogadható sóját, szolvátját vagy egy fiziológiásan elfogadható származékát önmagában is beadni, előnyösebb ezt gyógyászati kiszerezésben szolgáltatni.

A találmány tehát gyógyászati készítményekre is vonatkozik, amelyek (I) képletű vegyületet vagy gyógyászatiilag elfogadható sóját, szolvátját vagy fiziológiásan elfogadható származékát, továbbá valamely gyógyászatiilag elfogadható hordozót és/vagy hígítót és kívánt esetben egy vagy több más terápiás alkotórészt is tartalmaznak.

A találmány továbbá az (I) képletű vegyület vagy gyógyászatiilag elfogadható sója, szolvátja vagy fiziológiásan elfogadható származéka olyan kóros klinikai állapotok megelőzésére vagy kezelésére szolgáló gyógyszerek gyártásához történő alkalmazására vonatkozik, amelyekhez nitrogén(II)-oxid-szintetáz-inhibitor, például iNOS inhibitor alkalmazása javasolt, ilyenek például a gyulladásos és/vagy immunrendellenességek, mint például az ízületi gyulladás vagy asztma. A találmány szerinti megoldás egy előnyös megvalósítási módja az (I) képletű vegyület vagy gyógyászatiilag elfogadható sói, szolvátjai vagy fiziológiásan elfogadható származékai olyan kóros klinikai állapotok, mint az ízületi gyulladás, asztma, bélelzáródás és migrén, megelőzésére és kezelésére szolgáló gyógyszerek gyártásához történő alkalmazására vonatkozik.

A „hatóanyag” kifejezés egy (I) képletű vegyületet vagy gyógyászatiilag elfogadható sóját, szolvátját vagy fiziológiásan elfogadható származékát jelenti.

A készítmények lehetnek orális, parenterális (ideértve a szubkután, intradermális, intramuszkuláris, intravénás és intraartikuláris formákat), inhalációs (ideértve a finomrészeskés ködöket vagy porokat, amelyek különböző típusú dózisadagoló, nyomás alatti aeroszolkészülékek, inszufflátorok vagy porlasztókészülékek segítségével alakíthatók ki), rektális vagy helyi (ideértve a dermális, szájüregi, nyelv alatti és intraokuláris formákat) beadáshoz alkalmasak, ahol a legmegfelelőbb beadási mód a befogadó állapotától és rendellenességétől függ. A készítmények lehetnek – kényelmi szempontok miatt – egységdózisformájában, és elkészíthetők bármely olyan eljárással, amely jól ismert a gyógyszergyártás szakterületén. Az előállítás során a

hatóanyagot az adott esetben egy vagy több járulékos alkotórészt tartalmazó hordozóval összekeverjük. A készítményeket általában úgy állítjuk elő, hogy a hatóanyagot egyenletesen és bensőségesen egyesítjük a folyékony hordozókkal vagy finoman elosztott szilárd hordozókkal vagy mindkettővel, majd kívánt esetben a terméket formázzuk a kívánt kiszerezési alakra.

Az orális beadáshoz alkalmas találmány szerinti készítmények dóziségségek formájában állíthatók elő, így például kapszulák, tasakok vagy tabletták formájában, amelyek mindegyike az hatóanyag előre meghatározott mennyiségét tartalmazza. Előállíthatók azonban por vagy granulátum, oldat vagy szuszpenzió formájában is vizes vagy nemvizes folyadék vagy „olaj a vízben” típusú vagy „víz az olajban” típusú emulzió formájában. A készítmény előállítható bólusz, szirup, vagy kenőcs formájában is.

A tabletták sajtolással vagy ömlesztéssel készülhetnek, kívánt esetben egy van több járulékos alkotórészrel. A sajtolott tablettákat úgy készíthetjük el, hogy a hatóanyagot szabadon folyó formában, például porként vagy granulátumként megfelelő berendezésben, kívánt esetben valamely kötőanyaggal, sikosítószerrel, inert hígítóval és zsírosító-, felületaktív vagy diszpergáló-szerrel összekeverve sajtoljuk. Az ömlesztett tablettákat úgy készíthetjük el, a porított vegyület inert folyékony hígítóval megnedvesített keverékét hogy megfelelő berendezésben ömlesztjük. A tablettákat kívánt esetben bevonhatjuk vagy bemetszhetjük, és kiszerezhetjük úgy is, hogy a benne levő hatóanyag lassan vagy szabályozottan bocsátódjék ki.

A parenterális beadáshoz szolgáló készítmények magukban foglalják a vizes és nemvizes steril injekciós oldatokat, amelyek tartalmazhatnak antioxidánsokat, puffereket, bakteriosztatikumokat és oldott anyagokat, amelyek a kiszerezést a kijelölt befogadó vérével izotóniássá teszik; magukban foglalják továbbá a vizes és nemvizes steril szuszpenziókat, amelyek tartalmazhatnak szuszpendálószerkeket és sűrítőszerkeket. A készítményeket szolgáltatathatjuk egységdózisú vagy többdózisú tartályokban, például leforrasztott ampullákban vagy üvegcsékben, és tárolhatjuk fagyaszta száritott (liofilizett) állapotban, amelyhez csak steril folyékony hordozót, például fiziológiás konyhasóoldatot vagy injekcióhoz vizet kell adni közvetlenül felhasználás előtt. Alkalmi injekciós oldatok és szuszpenziók készíthetők steril porokból, granulátumokból vagy tablettákból az előzőekben leírt módokon.

A rektális beadáshoz alkalmas kiszerezéseket végbélkúp formájában állítjuk elő a szokott hordozókkal, mint például kakaóvajjal vagy polietilén-glikollal.

A szájban való helyi beadáshoz, például szájüregi és nyelv alatti beadáshoz alkalmas kiszerezések magukban foglalják a cukorkákat, amelyek a hatóanyagot ízesített-illatosított alapon, például szacharózban, gumiarábikumban vagy tragantmégzében tartalmazzák, és a pasztillákat, amelyek a hatóanyagot a zselatin, glicerin, szacharóz vagy gumiarábikum alapon tartalmazzák.

Az előnyös egységdózis kiszerezések azok, amelyek – amint az előzőekben leírtuk – a hatóanyag haté-

kony dózísát vagy ennek megfelelő töredékrészét tartalmazzák.

Nyilvánvaló, hogy az említett alkotórészekon kívül a találmány szerinti készítmények magukban foglalhatnak más, a szakterületen hagyományos szereket is, tekintetbe véve a szóban forgó kiszerelés típusát; így például az orális beadáshoz azok az alkalmasak igazán, amelyek íz- és illatanyagokat is tartalmaznak.

A találmány tárgya továbbá eljárás az (I) képletű vegyületek és sóik, szolvátjaik vagy fiziológiásan elfogadható származékaik előállítására, amelynek során

(i) egy (II) általános képletű vegyületet vagy valamely enantiomerjét, sóját vagy védett származékát egy (III) általános képletű vegyülettel vagy sójával reagáltunk, a képletben L jelentése valamely kilépőcsoport, előnyösen 1–6 szénatomos alkoxicsoport, például etoxicsoport, vagy alkil-tio-, aralkil-tio- vagy aril-tio-csoport, például benzil-tio- vagy 1- vagy 2-naftil-metil-tio-csoport; majd elvégezzük az alábbi lépéseket bármely sorrendben:

(ii) kívánt esetben eltávolítunk minden védőcsoportot;

(iii) kívánt esetben egy enantiomert elkülönítünk az enantiomerek keverékéből;

(iv) kívánt esetben a terméket megfelelő sójává, szolvátjává vagy fiziológiásan elfogadható származékává alakítjuk.

Amikor L jelentése 1–6 szénatomos alkoxicsoport, a fenti (i) lépésben szereplő reakciót alkalikus pH-jú, például pH=8 és 11 közti, előnyösen 8,5 pH-jú oldatban, alacsony hőmérsékleten, például $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti, előnyösen $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten hajthatjuk végre. Amikor L jelentése alkil-tio-, aralkil-tio- vagy aril-tio-csoport, a reakciót szerves oldószerben, például tetrahidrofuránban vagy 1–4 szénatomos alkoholban, például etanolban hajthatjuk végre mérsékelt hőmérsékleten, például $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ közti hőmérsékleten, előnyösen szobahőmérsékleten.

A (III) általános képletű vegyületek és sóik kereskedelmi forgalomban kaphatók vagy előállíthatók a szerves kémia olyan eljárásai szerint, amelyek jól ismertek azok számára, akik a szakterületen jártasak; ilyeneket írnak le például Shearer és munkatársai [Tetrahedron Letters 38, 179–182 (1997)].

A (II) képletű vegyületeket és védett származékait úgy állíthatjuk elő, hogy a (B) képletű homocisztin vagy védett származékai diszulfidkötését hasítjuk, és a kapott homociszteint vagy védett (IV) általános képletű vegyülettel vagy védett származékával kapcsoljuk, a képletben L¹ jelentése kilépőcsoport, például halogénatom, mint brómatom, vagy alkil-, aril- vagy aralkil-szulfonát-észter, például toluolszulfonilcsoport.

A homocisztin vagy védett származéka diszulfidkötésének homocisztein vagy védett származéka kialakítására történő elhasítása elvégezhető bármely eljárással, amely ismeretes azok számára, akik a szakterületen jártasak, így például nátrium alkalmazásával folyékony ammóniában, vagy ditiotreitól vagy nátrium-bór-hidrid alkalmazásával.

A homocisztein védett származékait, például az N-terc-butoxi-karbonil-homocisztein-terc-butyl-észtert,

a (IV) általános képletű vegyületekkel ismert körülmények között reagáltatjuk, megfelelő szerves oldószerben (például toluolban) egy olyan reakcióban, amelyet valamely bázis, például 1,8-diazo-biciklo[5.4.0]undec-7-én vagy hasonló szer közvetít; a megfelelő körülményeket a szakterületen jártas szakemberek meg tudják határozni.

A homocisztin, a (IV) általános képletű vegyületek és védett származékaik kereskedelmi forgalomban kaphatók vagy elkészíthetők a szerves kémia azon eljárásaival, amelyek jól ismertek a területen jártas szakembereknek.

Az (I) képletű vegyület előállításában alkalmazott védőcsoportok hagyományos módon használhatók, például a „Protective Groups in Organic Synthesis” című könyvben [Theodora W. Green, 2. kiadás (John Wiley and Sons, 1991)] leírt eljárásokat alkalmazva, amely könyv leírja az ilyen csoportok eltávolításának eljárásait is.

A fenti reakciókban a primer aminokat megfelelően védjük acilcsoportok, például terc-butoxi-karbonil-csoportok vagy benzil-oxi-karbonil-csoportok alkalmazásával, amely csoportok savas körülmények között távolíthatók el, például sósavval vagy hidrogén-bromiddal történő kezeléssel vagy hidrogenolízissel.

A szakterületen jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy az ilyen védőcsoportok magukban foglalhatják az aminocsoportok ortogonális védelmét a (II) általános képletű vegyületekben, ami megkönnyíti egy csoport szelektív eltávolítását egy másik jelenlétében, így lehetővé teszi egy egyedi amino-funkció szelektív működőképességét. Így például egy benzil-oxi-karbonil-csoport szelektíven eltávolítható hidrogenolízissel. A szakterületen jártas szakember számára más ortogonális védelmi stratégiák is nyilvánvalók, amelyek hagyományos eszközök segítségével kivitelezhetők, amint ezt Theodora W. Green ismerteti (lásd a fentebb idézett munkát).

A találmány szerinti enantiomervegyületeket (a) a megfelelő racém keverék komponenseinek elkülönítésével, például egy királis kromatográfias oszlop és enzimes rezolválási eljárások segítségével vagy megfelelő diasztereomerek előállításával és elkülönítésével, vagy (b) a megfelelő királis intermedierekből a fentebb leírt eljárásokkal közvetlen szintézissel állíthatjuk elő.

A kapott (I) képletű vegyület kívánt esetben megfelelő sóvá történő átalakítását könnyen végre lehet hajtani a megfelelő savval vagy bázissal végzett reakcióval. Az (I) képletű vegyület kívánt esetben megfelelő szolváttá vagy fiziológiásan elfogadható származékká történő átalakítását olyan eljárásokkal hajthatjuk végre, amely ismeretes azok számára, akik a szakterületen jártasak.

A találmány továbbá új közlitemékekre vonatkozik az (I) általános képletű vegyületek előállításához, ilyenek például a fentebb meghatározott (II) képletű vegyületek és enantiomerjeik, sóik és védett származékaik, elsősorban az alábbi vegyületek:

(S)-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(S)-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(R,S)-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;
(R,S)-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(S)-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(S)-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(S)-terc-butyl-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptanoát;

(S)-terc-butyl-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptanoát;

(R,S)-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(R,S)-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(R,S)-terc-butyl-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptanoát; és

(R,S)-terc-butyl-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptanoát.

Az (I) képletű vegyület bizonyos védett származékai szintén alkalmasak köztitermékként az (I) képletű vegyület előállítására, különösen az alábbi vegyületek:

(S)-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(S)-terc-butyl-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptanoát;

(R,S)-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptánsav;

(R,S)-terc-butyl-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptanoát;

valamint mindezek sói és szolvátjai.

A találmány szerinti megoldást a következő példák szemléltetik, a korlátozás szándéka nélkül.

Szintézispéldák

1. példa

(S)-[2-(1-Imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein vagy (S)-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptánsav szintézise

(i) (S)-7N-Benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav

-80 °C hőmérsékletre lehűtött folyékony ammóniához (130 ml) L-homocisztint (3 g), majd fémnátriumot (1,06 g) adunk, amíg a kék szín 15 percig meg nem marad. Ez után N-benzil-oxi-karbonil-etanol-amin-tozilátot (8,16 g) adunk az elegyhez, és a reakciókeveréket szobahőmérsékleten kevertetjük, amíg az ammónia le nem párolódik. A maradékot vízben (80 ml) feloldjuk, és 0,5 mol/l EDTA-nátriumsóval (2 ml) kezeljük. Az oldat pH-ját 2 n kénsavval 7,0-ra állítjuk be, és a létrejövő fehér csapadékot szűrjük, hideg vízzel és acetonnal mossuk, majd vákuumexszikkátorban szárítjuk, így kapjuk meg a cím szerinti vegyületet fehér, szilárd anyag formájában (5,3 g).

Tömegspektrum: M+H=313.

(ii) (S)-2,7-Diamino-5-tio-heptánsav

(S)-7N-Benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsavat (5,3 g) 1 órán át 45 térfogat% HBr-t tartalma-

zó ecetsavval (23 ml) kezelünk. Egy kezelhetetlen gyanta keletkezik, amelyhez étert adunk, hogy biztosítsuk a termék teljes kicsapódását. A folyadékot dekantáljuk, és a szilárd anyagot forró SVM-ben feloldjuk.

5 A forró oldatot piridinnel kezeljük, amíg egy kevés csapadék éppen megmarad, és a keveréket hagyjuk lehűlni szobahőmérsékletre. Az így létrejövő csapadékot kiszűrjük, és SVM/víz elegyből átkristályosítjuk, így kapjuk meg a cím szerinti vegyületet fehér, szilárd anyagként (2,2 g); olvadáspont: 222 °C (bomlik).

(iii) (S)-[2-(1-Imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein

(S)-2,7-Diamino-5-tio-heptánsav (2,17 g) és 1 n NaOH (16,75 ml) elegyét 10,5 pH-n, 0-5 °C hőmérsékleten kevertetjük. Az oldathoz részletekben etil-acetimidát-hidrokloridot (2,07 g) adunk, miközben a pH-t 10,5 értékre állítjuk, a pH-t 1 n sósavval 3 értékre állítjuk, és a keveréket Dowex AGX8 H⁺ formájú ioncserélő oszlopra visszük. Az oszlopot vízzel semlegesre mossuk, majd 2,5 mol/literes piridinoldattal, majd ismét vízzel semlegesre mossuk. Az eluálást 0,5 mol/l ammóniával végezzük, és a ninhidrinpozitív-frakciókat összegyűjtjük, majd bepároljuk. A létrejött maradékot 1 n HCl-oldattal kezeljük pH=4,5 értékig, majd szárazra pároljuk. A maradékot ezután etanollal kezeljük, és szárazra pároljuk, majd dietil-éterrel kezeljük, és szárazra pároljuk, így kapjuk meg a cím szerinti vegyület monohidrokloridját kemény, fehér hab formájában.

20 A termék mikroelemzése 1,75 hidrátnak felel meg. Elemanalízis:

talált:	C: 33,56	H: 7,11	N: 13,74
számított:	33,45	7,49	14,63.

35 2. példa

(R/S)-[2-(1-Imino-etil-amino)-etil]-D-L-homociszteint állítunk elő az 1. példában alkalmazott eljárással analóg eljárással D,L-homocisztinből kiindulva.

40 A termék ¹H-NMR-spektruma egybevág a javasolt szerkezettel.

2a. példa

45 A 2. példa racém termékét lényegében rezolváljuk a két alkotó enantiomerré [az (S) termék azonos az 1. és 4. példa termékével, míg az (R) termék a 3. példa termékével] királis Crownpac(+) HPLC-oszlopot alkalmazva, és az eluálást vizes trifluor-ecetsavval végezzük pH=2 értéknél.

(S)-[2-(1-Imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein

50 A termék mikroelemzése a ditrifluor-acetátsó-hidrátnak megfelelő terméket mutat.

Elemanalízis a C₈H₁₇N₃O₂S. (CF₃CO₂H)₂.H₂O képlet alapján:

talált:	C: 31,06	H: 4,53	N: 9,08
számított:	30,97	4,55	9,03.

55 CD-spektrum (0,1 n vizes HCl): 210 (+0,80) nm.

(R)-[2-(1-Imino-etil-amino)-etil]-D-homocisztein

60 A termék mikroelemzése az 1,67 trifluor-acetát:0,3 HCl:1,5 hidrátsó formának megfelelő terméket mutat:

Elemanalízis a

$C_8H_{17}N_3O_2S \cdot (CF_3CO_2H)_{1,67} \cdot HCl_{0,3} \cdot 1,5 H_2O$ képlet alapján:
 talált: C: 30,18 H: 4,92 N: 9,53 S: 7,41 Cl: 1,86 F: 21,36
 számított: 30,40 4,97 9,41 7,18 2,38 21,28.
 CD-spektrum (0,1 n vizes HCl): 210 (-0,64) nm.

3. példa

Az (R)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-D-homociszteint az 1. példában alkalmazott eljárással analóg eljárással állítjuk elő D-homocisztinből kiindulva.

4. példa

(S)-[2-(1-Imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein szintézise

(i) (S)-7N-Benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav

-80 °C hőmérsékletre lehűtött folyékony ammóniához (430 ml) L-homociszteint (10 g; 37,45 mmol) adunk. A hűtőfűdőt eltávolítjuk, és fémnátriumot (3,18 g; 138,26 mmol) adunk hozzá adagonként 25 perc alatt, engedve, hogy a hőmérséklet megemelkedjen a visszafolytatás hőmérsékletére. A kevertetést visszafolytató hűtő alkalmazása mellett folytatjuk további 30 percen át, ezután N-benzil-oxi-karbonil-etanol-amintozilátot (25 g; 74,9 mmol) adunk hozzá, és a reakciókeveréket szobahőmérsékleten kevertetjük egy éjszakán át, amíg az ammónia lepárlódik. A maradékot vízzel (250 ml) kevertetjük 40 °C hőmérsékleten 10 percen át, lehűtjük szobahőmérsékletre, majd szűrjük. Az oldat pH-ját 2 mol/literes kénsavoldattal 7,0 értékre állítjuk, és a létrejövő fehér csapadékot kiszűrjük, hideg vízzel és acetonnal mossuk, és vákuumexszikkátorban szárítjuk, így kapjuk meg fehér, szilárd anyagként az (S)-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsavat.

Olvadáspont 240 °C (bomlik).

(ii) (S)-2N-terc-Butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav

(S)-7N-Benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsavat (15,5 g; 49,67 mmol) hozzáadunk vízben (110 ml) levő nátrium-hidroxidhoz (6,357 g; 159 mmol), majd dioxánt (55 ml) adunk hozzá. Ehhez a keverékhez hozzáadunk diterc-butil-dikarbonátot (16,26 g; 74,5 mmol), és a keveréket egy éjszakán át szobahőmérsékleten nitrogénatmoszférában kevertetjük. Ekkor a kicsapódott szilárd anyagot kiszűrjük, toluolt (300 ml) adunk hozzá, és a fázisokat elválasztjuk. A vizes fázist lehűtjük, és 1 n sósavval megsavanyítjuk (~pH=3). A savas frakciót toluollal (4×100 ml) és etil-acetáttal (3×100 ml) extraháljuk, és az egyesített szerves frakciókat $MgSO_4$ -en víztelenítjük. Az egyesített szerves anyagok csökkentett nyomáson történő koncentrációja után (S)-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsavat kapunk fehér mézga formájában.

Tömegspektrum: M+H: 413.

(iii) (S)-2N-t-Butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav-formiátsó

5 °C hőmérsékletre lehűtött metanolhoz nitrogénatmoszférában hozzáadunk egy adagban palládiumkor-

mot (0,678 g). Ehhez a hűtött oldathoz hozzáadjuk metanol (50 ml) és hangyasav (11 ml; 196 mmol) keverékét 1 perc alatt, majd 2 perc alatt (S)-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsavat (2 g; 4,85 ml) 50 ml metanolban. A keveréket egy éjszakán át kevertetjük szobahőmérsékleten, újabb adag palládiumkormot (257 mg) adunk hozzá, és a kevertetést folytatjuk további 3 órán át. A reakciókeveréket Hyflón keresztül szűrjük, és csökkentett nyomáson koncentráljuk. A maradékot megosztjuk víz és etil-acetát között, a vizes fázist újabb etil-acetáttal mossuk, és a vizes fázist koncentráljuk, így kapjuk meg az (S)-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav-formiátsót fehér, szilárd anyagként.

Tömegspektrum: M+H: 279 (65%), 223 (100%).

(iv) (S)-2N-terc-Butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptánsav-hidroklorid

(S)-2N-terc-Butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptánsav-formiátsó (2,154 g; 6,59 mmol) etanolos (50 ml) oldatához szobahőmérsékleten nitrogénatmoszférában S-(1-naftil-metil)-tio-acetimidát-hidrokloridot (3,70 g; 14,75 mmol), majd 50 ml etanolt adunk. Szobahőmérsékleten kevertetve a szilárd anyagok 2 óra múlva feloldódnak, ez után az oldatot egy éjszakán át kevertetjük. A reakciókeveréket vákuumban koncentráljuk, a maradékot vízzel kezeljük, és a vizes frakciót dietil-éterrel (4×50 ml) mossuk. A vizes frakció koncentrációja után vákuumban (S)-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptánsav-hidrokloridot kapunk fehér, higroszkópos anyagként.

Tömegspektrum: M+H: 320 (75%), 264 (100%), 220 (15%).

(v) (S)-[2-(1-Imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein

(S)-2N-terc-Butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptánsav-hidrokloridhoz (3,086 g; 8,69 mmol) lassan hozzáadunk 4 n HCl/dioxánt (20 ml), és a reakciókeveréket szobahőmérsékleten kevertetjük egy éjszakán át. A reakciókeveréket vákuumban koncentráljuk, a maradékot feloldjuk vízben, és dietil-éterrel mossuk (3×20 ml). A vizes fázist vákuumban koncentráljuk, így kapjuk meg a cím szerinti vegyületet hidrokloridként, mint higroszkópos szilárd anyagot.

Tömegspektrum: M+H: 220.

1H -NMR (D_2O) δ : 2,1–2,35 (5H, m); 2,76 (2H, t); 2,87 (2H, t); 3,51 (2H, t); 4,12 (1H, t).

5. példa

(S)-[2-(1-Imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein szintézise

(i) (S)-terc-Butil-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptanoát

N-terc-Butoxi-karbonil-cisztein-terc-butyl-észter (291 mg; 1 mmol) (amelyet N-terc-butoxi-karbonil-cisz-

tein-terc-butil-észter redukciójával állítunk elő ditiotrietollal) vízmentes toluollal (20 ml) képzett oldatához hozzáadunk N-benzil-oxi-karbonil-etanol-amin-tozilátot (349 mg; 1 mmol) és 1,8-diaza-biciklo[5.4.0]undec-7-ént (150 µl; 1 mmol), majd a keveréket élénken kevertetjük egy éjszakán át szobahőmérsékleten nitrogénatmoszférában. A keveréket megosztjuk 50–50 ml etilacetát és 1 n vizes HCl-oldat között. Egy további szerves extrahálást is végzünk, az extraktumokat egyesítjük, és mossuk vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, vízzel és tömény konyhasóoldattal, majd víztelenítjük és bepároljuk. Az oszlopkromatográfiával végzett tisztítás a cím szerinti vegyületet szolgáltatja.

Tömegspektrum: M+H: 469 (25%), 369 (100%).

Egy alternatív eljárás szerint a 4. példa (ii) lépéséből származó termék átalakítása terc-butil-észterre N,N-dimetil-formamid di-O-terc-butil-acetált vagy O-terc-butil-1,1,1-triklór-acetimidátot alkalmazva kialakítja a cím szerinti vegyületet fehér, kristályos anyag formájában.

(ii) (S)-terc-Butil-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptanoát-formiátsó

(S)-terc-Butil-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptanoát (1 g; 2,1 mmol) etanollal (50 ml) képzett oldatához hozzáadunk szénhordozós palládium-hidroxidot (20%, 0,5 g) és ammónium-formiátot (1,34 g). A szuszpenziót visszafolyató hűtő alkalmazása mellett melegítjük 2,5 órán át, majd lehűtjük, és szilícium-dioxidon keresztül szűrjük, amelyet alaposan átmostunk etanol-víz 1:1 térfogatarányú keverékével, majd a szűrletet bepároljuk, így kapjuk meg a cím szerinti vegyületet formiátsóként.

Tömegspektrum: M+H: 335.

(iii) (S)-terc-Butil-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptanoát-hidroklorid

A (ii) lépésből származó nyers (S)-terc-butil-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tio-heptanoát-formiátsót 50 ml tetrahidrofuránnal szuszpendáljuk, a folyadékot dekantáljuk és összekeverjük S-(1-naftil-metil)-tio-acetimidát-hidrokloriddal (0,5 g; 2 mmol), majd 24 órán át kevertetjük szobahőmérsékleten. Az oldószert lepároljuk, és a maradékot megosztjuk 25–25 ml éter és víz között, ezt két éteres mosás követi; a visszamaradt vizes extraktumokat egyesítjük, és bepároljuk, így fehér pépet kapunk. Ezt kétszer fagyasztva szárítjuk, így kapjuk meg a cím szerinti vegyületet fehér, higroszkópos, szilárd anyag formájában.

Tömegspektrum: M+H: 376 (100%), 320 (15%), 276 (12%).

(vi) (S)-S-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein

Az (S)-terc-butil-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-(1-imino-etil)-2,7-diamino-5-tio-heptanoát-hidroklorid védőcsoportjainak eltávolítása után, amelyhez 4 n dioxános HCl-t alkalmazunk a 4. példa (v) lépésében alkalmazott eljárással analóg eljárás szerint, az (S)-S-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein keletkezik.

A cím szerinti vegyület jellemző adatai egybevágnak a 4. példa termékének adataival.

Biológiai aktivitás

1. eNOS és iNOS gátlása patkány aorta gyűrűkben

Az eNOS és iNOS gátlását patkány aorta-gyűrűkben olyan módon becsüljük meg, hogy mérjük a növekedést a gyűrűfeszülésben, amelyet az NO-szintetáz-gátlás okoz. Az alaptónus (amely az eNOS-t tükrözi) meghatározásához mellkasi aortagyűrűket készítünk, ép endotéliummal, amint ezt korábban leírták [Rees és munkatársai: Br. J. Pharmacol. 96, 418–424 (1989)], és az inhibitorokhoz tartozó kumulatív koncentrációs görbéket fenilefrin küszöbkoncentrációjának ($ED_{10}=10$ nmol/l) jelenlétében vesszük fel. Az indukált simaizomtónus (amely az iNOS-t tükrözi) tanulmányozásához endotéliumtól lemeztelenített gyűrűket teszünk ki LPS-nek (0,1 µg/ml *S. typhosából*) fenilefrin jelenlétében, mintegy ED_{90} -nél 6 órán át, amint ezt korábban leírták [Rees és munkatársai: Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 541–547 (1990)]. Ezen idő alatt a tónus progresszív vesztesége következik be az iNOS indukció miatt. Ekkor megkapjuk az inhibitorokhoz tartozó kumulatív koncentráció görbéket.

Az eredmények az alábbi táblázatban láthatók:

	iNOS IC_{50} (µmol/l)	eNOS % gátlás, 300 µmol/l	Szelektivitás iNOS az eNOS-sal szemben
1. példa	0,73	43	>500-szoros
2. példa	0,45	53	>500-szoros
3. példa	6,6	20	>150-szeres

Ezzel ellentétben a 2-(1-imino-etil-amino)-etil-cisztein-hidroklorid (a WO93/13055 számú dokumentum 4. példája) csak 33-szoros szelektivitást mutat az iNOS-ra az eNOS-sal szemben ugyanezen vizsgálatban.

2. Az nNOS gátlása patkány agykéreg-szeletekben

A vegyületek hatásait nNOS-ra patkány agykéreg-szeletekben azzal az eljárással határozzuk meg, amelyet Furfine és munkatársai [J. Biol. Chem. 269, 26 677–26 683 (1994)] és Lizasoain és munkatársai [J. Neurochem. 64, 636–642 (1995)] írtak le.

KCl-dal (54 mmol/l) stimulált NO-szintézist mérünk ^{14}C -arginin ^{14}C -citrulinná történő átalakulása alapján, 2 órás időtartama alatt, 37 °C hőmérsékleten, McIlvain patkányok felaprított (0,2 mm×0,2 mm) patkány agykéreg-szeletein, a vegyület vagy nagy KCl-koncentráció távollétében végzett 1 órás előinkubálási időtartamot követően.

Az 1. példa szerinti vegyület IC_{50} -értéke 220 µmol/l, ami azt jelenti, hogy az iNOS szelektivitása az nNOS-sal szemben mintegy 300-szoros.

3. Eljárás iNOS inhibitor vegyületek orális biológiai hozzáférhetőségének méréséhez

Az állatokon végzett munka

Egereknek (3 állat időpontként) intravénás (10 mg/kg) és orális (50 mg/kg) dózisokat adunk a vizsgált vegyületekből vizes oldatban. A beadástól számított megfelelő időközönként vérmintákat veszünk, és

centrifugálással plazmát készítünk. A mintákat az elemzésig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tároljuk.

A vegyületek elemzése a plazmában

50 μl plazmát fehérjementesítünk, és a vegyületeket kvaterner ammóniumszármazékká alakítjuk. A mintákat azután egy HPLC-rendszerbe injektáljuk, és a vegyületek koncentrációját tömegspektrometriás kimutató felhasználásával meghatározzuk.

Farmakokinetikai elemzés

A fenti eljárással kapott plazmakoncentrációkat bevezetjük egy farmakokinetikai szoftvercsomagba (PKCAL v 1.2s), és az adatokat beillesztjük egy nem szakaszolt eljárás alkalmazásával. A vegyületek orális biológiai hozzáférhetőségét úgy határozzuk meg, hogy összehasonlítjuk a szoftverrel az orális profilhoz kalkulált AUC (Area Under the Curve) értékeket az intravénás profilhoz tartozó AUC-értékekkel. A félélettartamot úgy kapjuk meg, hogy illesztjük az intravénás profilvégfázis időpontjait.

Az (S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein orális biológiai hozzáférhetősége 55%, félélettartama 5,7 óra.

Amikor ezt intravénásan és 100 mg/kg-os dózisonál megismételjük, az (S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein biológiai hozzáférhetősége 92%.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (I) képletű vegyület és sói, szolvátjai és fiziológiásan elfogadható származékai.

2. Az 1. igénypont szerinti (I) képletű alábbi vegyületek:

(R/S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-DL-homocisztein; (S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein; és (R)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-D-homocisztein, és ezek sói, szolvátjai és fiziológiásan elfogadható származékai.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti (I) képletű (S)-[2-(1-imino-etil-amino)-etil]-L-homocisztein és ennek sói, szolvátjai és fiziológiásan elfogadható származékai.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti (I) képletű vegyület vagy gyógyászati lag elfogadható sói, szolvátjai vagy fiziológiásan elfogadható származékai orvosi terápiában történő alkalmazására.

5. Gyógyászati készítmények, amelyek valamely az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy gyógyászati lag elfogadható sóját, szolvátját vagy fiziológiásan elfogadható származékát tartalmazzák, gyógyászati lag elfogadható hordozó- és/vagy vivőanyagok és kívánt esetben egy vagy több más terápiás alkotórész mellett.

6. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti (I) képletű vegyületek vagy gyógyászati lag elfogadható sóik, szolvátjaik vagy fiziológiásan elfogadható származékaik alkalmazása olyan kóros klinikai állapotok megelőzésére vagy kezelésére szolgáló gyógyszerek előállításához, amelyhez a nitrogén(II)-oxid-szintetáz gátlása javallt.

7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, izületi gyulladás, asztma, bélcsavarodás vagy migrén megelőzésére és kezelésére szolgáló gyógyszerek előállításához.

8. Eljárás (I) képletű vegyület és sói, szolvátjai és fiziológiásan elfogadható származékai előállítására, az alábbi jellemezve, hogy

(i) egy (II) általános képletű vegyületet vagy valamely enantiomerjét, sóját vagy védett származékát egy (III) általános képletű vegyülettel vagy sójával reagáltatunk – a képletekben L jelentése kilépőcsoport –, majd elvégezzük az alábbi lépéseket bármely sorrendben:

(ii) kívánt esetben eltávolítunk minden védőcsoportot;

(iii) kívánt esetben egy enantiomert elkülönítünk az enantiomerek keverékéből;

(iv) kívánt esetben a terméket megfelelő sójává, szolvátjává vagy fiziológiásan elfogadható származékává átalakítjuk.

9. Az alábbi vegyületek:

(R,S)-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tioheptánsav;

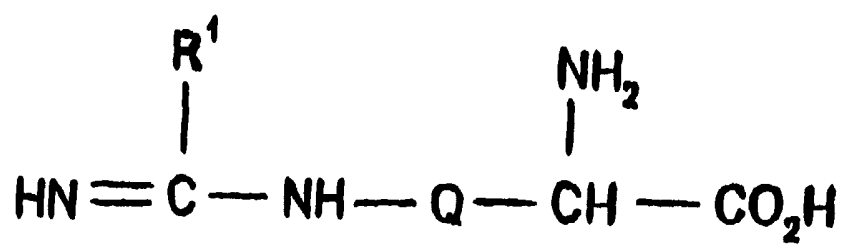
(S)-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tioheptánsav;

(S)-terc-butil-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tioheptanoát;

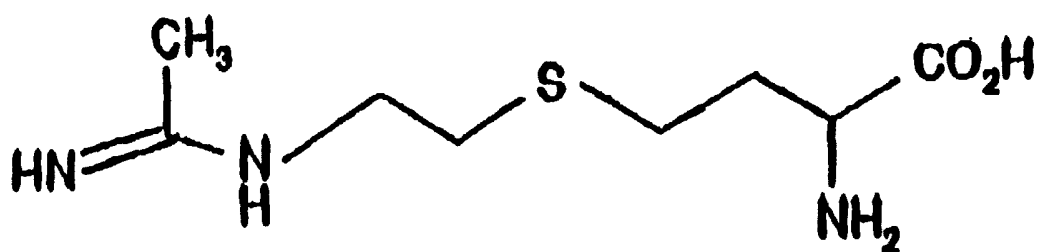
(S)-terc-butil-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tioheptanoát;

(R,S)-terc-butil-2N-terc-butoxi-karbonil-7N-benzil-oxi-karbonil-2,7-diamino-5-tioheptanoát; és

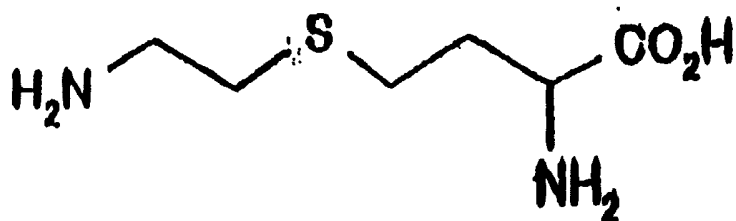
(R,S)-terc-butil-2N-terc-butoxi-karbonil-2,7-diamino-5-tioheptanoát.



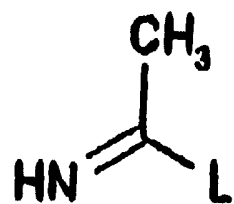
(A)



(I)



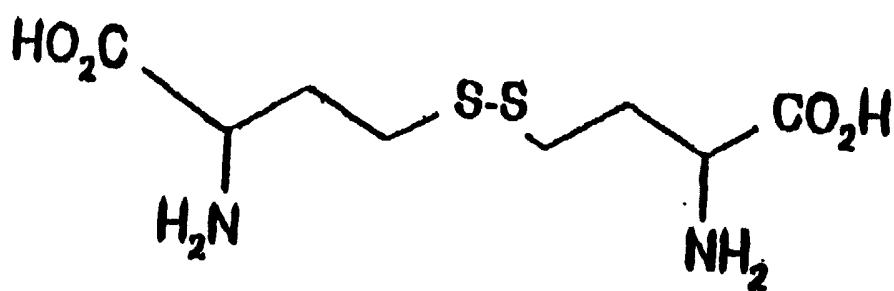
(II)



(III)



(IV)



(B)