



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 312192

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 C 323/58, A 61 K 31/195

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19993429	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1998.01.09, PCT/EP98/00096
(22) Inng. dag	1999.07.12	(85) Videreføringssdag	1999.07.12
(24) Løpedag	1998.01.09	(30) Prioritet	1997.01.13, US, 783402
(41) Alm. tilgj.	1999.07.12		
(45) Meddelt dato	2002.04.08		

(71) Patenthaver
Glaxo Group Ltd, Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN, England, GB

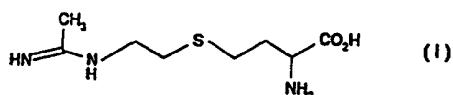
(72) Oppfinner
Richard Mansfield Beams, Shirley, Surrey, England, GB
Martin James Drysdale, Cambridge, England, GB
Karl Witold Franzmann, London, England, GB
Anthony Joseph Friend, Stevenage, Hertfordshire, England, GB
Harold Francis Hodson, Beckenham, Kent, England, GB
Richard Graham Knowles, Stevenage, Hertfordshire, England, GB
Daryl David Rees, Keston, Kent, England, GB
David Alan Sawyer, Beckenham, Kent, England, GB

(74) Fullmektig
Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse
Nitrogenoksydantaseinhibitorer, anvendelse og fremgangsmåte for fremstilling derav, samt farmasøytisk formulering

(56) Anførte publikasjoner
Ingen

(57) Sammendrag



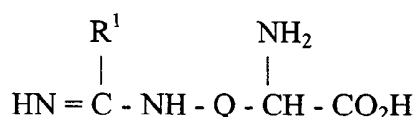
Den foreliggende oppfinnelse vedrører nye amidinoforbindelser med formel (I), en fremgangsmåte for deres fremstilling, farmasøytiske blandinger inneholdende dem, og deres anvendelse i terapi, spesielt deres anvendelse som selektive inhibitorer av induserbar nitrogenoksydantase.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører nitrogenoksydsyntaseinhibitorer, anvendelse og fremgangsmåte for fremstilling derav, samt farmasøytisk formulering. Forbindelsene kan spesielt anvendes som selektive inhibitorer av induserbar nitrogenoksydsyntase.

Nitrogenoksyd er den endogene stimulator av det løselige guanylatcyklase-enzym og er involvert i flere biologiske virkninger. Overskudd av nitrogenoksyd-fremstilling blir også antatt å være involvert i flere tilstander, innbefattet septisk sjokk og mange inflammatoriske sykdommer. Den biokjemiske syntese av nitrogenoksyd fra L-arginin, blir katalysert av enzymet NO-syntase. Mange inhibitorer av NO-syntase er blitt beskrevet og foreslått for terapeutisk anvendelse.

Ganske nylig, er det blitt et formål på dette område å tilveiebringe NO-syntaseinhibitorer som har selektivitet for enten induserbar NO-syntase (iNOS) eller neuronal NO-syntase (nNOS) over endotel NO-syntase (eNOS).

WO93/13055 beskriver således selektive NO-syntaseinhibitorer med formelen



og salter, og farmasøytisk akseptable estere og amider derav, hvori:

R₁ er en C₁₋₆ rettkjedet eller forgrenet alkylgruppe, en C₂₋₆alkenylgruppe, en C₂₋₆alkynylgruppe, en C₃₋₆cykloalkylgruppe eller en C₃₋₆cykloalkyl-C₁₋₆alkylgruppe;

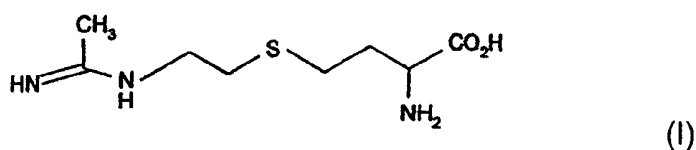
Q er en alkyl, alkenyl eller alkynylengrupper med 3 til 6 karbonatomer og som eventuelt kan være substituert med én eller flere C₁₋₃alkylgrupper;

en gruppe med formelen -(CH₂)_pX(CH₂)_q- hvor p er 2 eller 3, q er 1 eller 2, og X er S(O)_x hvor x er 0, 1 eller 2, O eller NR² hvor R² er H eller C₁₋₆alkyl; eller

en gruppe med formelen -(CH₂)_rA(CH₂)_s- hvor r er 0, 1 eller 2, s er 0, 1 eller 2, og A er en 3 til 6 leddet karbocyklisk eller heterocyklisk ring som eventuelt kan være substituert med én eller flere egnede substituenten slik som C₁₋₆alkyl, C₁₋₆alkoksy, hydrokso, halogen, nitro, cyano, trifluor-C₁₋₆alkyl, amino, C₁₋₆alkylamino eller di-C₁₋₆alkylamino.

Vi har nå funnet forbindelser som faller innenfor rammen av WO 93/13055 som i tillegg til å være selektive iNOS-inhibitorer, har fordeler som innbefatter at de har lang halveringstid og er oralt biotilgjengelige når de administreres in vivo.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse, tilveiebringes derfor en forbindelse med
5 formel (I)



eller et salt, solvat, eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav.

Formel (I) inkluderer et asymmetrisk sentrum i aminosyregruppen, og selv
10 om den naturlige L eller (S)-konfigurasjon av arginin blir foretrukket, er det meningen at formel (I) inkluderer både (S) og (R)-enantiomerer enten i hovedsakelig ren form eller blandet sammen i hvilket som helst forhold.

Alternativt skal den foreliggende oppfinnelse således tilveiebringe en forbindelse valgt fra:

- 15 (R/S)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-DL-homocystein;
(S)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-L-homocystein; og
(R)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-D-homocystein

og salter, solvater og fysiologisk funksjonelle derivater derav.

I et foretrukket aspekt, skal den foreliggende oppfinnelse tilveiebringe (S)-
20 [2-(1-iminoethylamino)etyl]-L-homocystein eller et salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav.

Salter og solvater av forbindelser med formel (I) som er egnet for anvendelse i medisinen, er de hvori motionet eller det assosierte løsningsmiddel er farmasøytisk akseptabelt. Salter og solvater som har ikke-farmasøytisk akseptable motioner eller
25 assosierte løsningsmidler, skal imidlertid være innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelse, for eksempel for anvendelse som mellomprodukter ved fremstilling av andre forbindelser med formel (I) og deres farmasøytisk akseptable salter, solvater og fysiologisk funksjonelle derivater.

Med betegnelsen "fysiologisk funksjonelt derivat" menes et kjemisk derivat av en forbindelse med formel (I) som har den samme fysiologiske funksjon som den frie forbindelse med formel (I), for eksempel ved å la seg omdanne i kroppen dertil. Ifølge den foreliggende oppfinnelse, skal eksempler på fysiologisk funksjonelle derivater inkludere, estere, amider og karbamater; fortrinnsvis estere og amider.

Egnede salter ifølge denne oppfinnelse inkluderer de som dannes med både organiske og uorganiske syrer eller baser. Farmasøytisk akseptable syreaddisjons-salter inkluderer de som dannes av saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovelsyre, sitronsyre, vinsyre, fosforsyre, melkesyre, pyrodruesyre, eddiksyre, trifluoreddiksyre, ravsyre, oksalsyre, fumarsyre, maleinsyre, oksaloeddiksyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, p-toluensulfonsyre, benzensulfonsyre og isetionsyre. Farmasøytisk akseptable basesalter inkluderer ammoniumsalter, alkalimetallsalter slik som de av natrium og kalium, jordalkalimetallsalter slik som de av kalsium og magnesium, og salter med organiske baser slik som dicyklo-heksylamin og N-metyl-D-glukamin.

Farmasøytisk akseptable estere og amider av forbindelsene med formel (I), kan ha syregruppen omdannet til en C₁₋₆alkyl, aryl, aryl-C₁₋₆alkyl eller aminosyre-ester eller amid. Farmasøytisk akseptable amider og karbamater av forbindelsene med formel (I), kan ha en aminogruppe omdannet til et C₁₋₆alkyl, aryl, aryl-C₁₋₆alkyl eller aminosyreamid eller karbamat.

Som nevnt ovenfor, vil forbindelsene med formel (I) være inhibitorer av NO-syntase som demonstrert i NOS-inhiberingsanalysene nedenfor.

Forbindelser med formel (I) og deres farmasøytisk akseptable salter, solvater og fysiologisk funksjonelle derivater vil derfor ha anvendelse ved profylakse og behandling av kliniske tilstander for hvilke en inhibitor av NO-syntase er indikert, spesielt en inhibitor av iNOS. Slike tilstander inkluderer inflammatoriske tilstander, sjokktilstander, immunforstyrrelser og forstyrrelser av mage-tarm-motiliteten. Forbindelsene med formel (I) og farmasøytisk akseptable salter, solvater og fysiologisk funksjonelle derivater derav, kan også finne anvendelse ved profylakse og behandling av sykdommer i sentralnervesystemet innbefattet migrene.

Ved sjokktilstander menes de som resulterer fra overproduksjon av NO, slik som septisk sjokk, hemoragisk sjokk, traumatisk sjokk, eller sjokk forårsaket av

fulminant leversvikt eller ved terapi med cytokiner slik som TNF, IL-1 og IL-2, eller terapi med cytokininduserende midler, for eksempel 5,6-dimetylksantenon-eddiksyre.

Eksempler på inflammatoriske tilstander og immunforstyrrelser inkluderer dem i leddene, spesielt artritt (for eksempel reumatoid artritt, osteoartritt, proteseleddsvikt), eller i mage-tarmkanalen (for eksempel ulcerativ kolitt, Crohn's sykdom, og andre inflammatoriske tarmsykdommer, magebetennelse og slimhinnebetennelse som skriver seg fra infeksjon, den tarmsykdom som fremkalles av ikke-steroidale antiinflammatoriske medikamenter), i lungene (for eksempel voksent åndenødsyndrom, astma, cystisk fibrose, eller kronisk obstruktiv lungesykdom), i hjertet (for eksempel myokarditt), i nervevev (for eksempel multippel sklerose), i bukspyttkjertelen (for eksempel diabetes melitus og komplikasjoner derav), i nyrene (for eksempel glomerulonefritt), i huden (for eksempel hudbetennelse, psoriasis, eksem, urticaria), i øyet (for eksempel glaukom) så vel som i transplanterte organer (for eksempel avstøtning) og multi-organsykdommer (for eksempel systemisk lupuserytematose) og inflammatoriske følgesykdommer av virus og bakterieinfeksjoner.

Videre er det tegn på overproduksjon av NO ved iNOS ved aterosklerose og etter hypoksisk eller ischemisk anfall (med eller uten reperfusjon), for eksempel i hjernen eller ved ischemisk hjertesykdom.

Forstyrrelser av mage-tarmmotiliteten inkluderer tarmslyng, for eksempel postoperativ tarmslyng og tarmslyng under sepsis.

Ved sykdommer i sentralnervesystemet menes de hvor overproduksjon av NO er implisert, for eksempel migrene, psykose, angst, schizofreni, søvnforstyrrelser, cerebral ischemi, CNS-trauma, epilepsi, multippel sklerose, AIDS-demens, kronisk neurodegenerativ sykdom (for eksempel Lewy Body-demens, Huntington's sykdom, Parkinson's sykdom eller Alzheimer's sykdom) og akutt og kronisk smerte, og tilstander hvori ikke-adrenerg ikke-kolinerg nerve kan være implisert slik som priapisme, fedme og hyperfagi.

Eksempler på akutt smerte inkluderer muskelskjelettsmerter, post operative smerter og kirurgiske smerter. Eksempler på kronisk smerte inkluderer kronisk inflammatorisk smerte (for eksempel reumatoid artritt og osteoartritt), neuropati-

smerte (for eksempel postherpetisk neurlagi, diabetisk neuropati i forbindelse med diabetes, trigeminal neuralgi, smerte i forbindelse med funksjonelle tarmforstyrrelser, for eksempel irritabelt tarmsyndrom, ikke-hjerte brystmerter og sympatetisk vedlikeholdt smerte) og smerter i forbindelse med kreft og fibromyalgi.

5 Videre kan inhibering av NO-syntase være fordelaktig til å forebygge lymfocytt-tap i forbindelse med HIV-infeksjon, til å øke radiosensitiviteten av tumorer under radioterapi og til å redusere tumorvekst, tumorprogresjon, angiogenese og metastase.

Med forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er det dermed mulig å
10 oppnå profylakse eller behandling av en klinisk tilstand valgt fra artritt, astma.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig forbindelse med formel (I) som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 3, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller fysiologisk funksjonelt derivat derav for anvendelse i medisinsk terapi.

Det er videre beskrevet farmasøytisk formulering, kjennetegnet ved at den
15 omfatter en forbindelse med formel (I) som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 3, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller fysiologisk funksjonelt derivat derav, og en farmasøytisk akseptabel bærer eller eksipient, og eventuelt én eller flere andre terapeutiske bestanddeler.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av en forbindelse med
20 formel (I) som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 3, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller fysiologisk funksjonelt derivat derav, til fremstilling av et medikament for profylakse eller behandling av en klinisk tilstand for hvilken en inhibitor av nitrogenoksydsyntase er indikert.

Det er videre beskrevet anvendelse ifølge krav 6, hvori den kliniske tilstand
25 er valgt fra artritt, astma, tarmslyng og migrene.

Den mengde av en forbindelse med formel (I) eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav, som kreves for å
30 oppnå en terapeutisk effektiv, vil naturligvis variere med den spesielle forbindelse, administreringsveien, individet under behandling, og den spesielle forstyrrelse eller sykdom som behandles. Forbindelsene ifølge denne oppfinnelse kan administreres oralt eller via injeksjon i en dose på fra 0,1 til 1500 mg/kg pr. dag, fortrinnsvis 0,1

til 500 mg/kg pr. dag. Doseområdet for voksne mennesker vil generelt være fra 5 mg til 35 g/dag og fortrinnsvis 5 mg til 2 g/dag. Tabletter eller andre presentasjonsformer som tilveiebringes i adskilte enheter, kan beleilig inneholde en mengde av forbindelse ifølge denne oppfinnelse, som er effektiv ved slik dosering eller som et multiplum av samme, for eksempel enheter som inneholder 5 mg til 500 mg, vanligvis omkring 10 mg til 200 mg.

Selv om det er mulig å administrere utelukkende forbindelsen med formel (I), eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav, blir det foretrukket å presentere den som en farmasøytisk formulering.

I det følgende skal betegnelsen "aktiv bestanddel" bety en forbindelse med formel (I) eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav.

Formuleringene inkluderer de som er egnet for oral, parenteral (innbefattet subkutan, intradermal, intramuskulær, intravenøs og intraartikulær), inhalering (innbefattet finpartikulært støv eller tåke som kan genereres ved hjelp av forskjellige typer av trykkaerosoler med avmålt dose, nebulisatorer eller insufflatorer), rektal og lokal (innbefattet dermal, bukkal, sublingual og intraokulær) administrering, selv om den mest egnede vei kan avhenge av for eksempel mottagerens tilstand og forstyrrelse. Formuleringene kan beleilig presenteres i enhetsdoseringsform, og kan fremstilles ved hvilken som helst av fremgangs-måtene som er velkjent i den farmasøytiske teknologi. Alle fremgangsmåter inkluderer trinn for å bringe den aktive bestanddel i assosiasjon med bæreren som består av én eller flere hjelpebestanddel. Generelt blir formuleringene fremstilt ved jevnt og intimt å bringe sammen den aktive bestanddel med flytende bærere eller fint oppdelte faste bærere eller begge, og deretter om nødvendig, å danne produktet til den ønskede formulering.

Formuleringer ifølge den foreliggende oppfinnelse egnet for oral administrering, kan presenteres som adskilte enheter slik som kapsler, kapsler med pulver som skal svelges eller tabletter som hver inneholder en forutbestemt mengde av den aktive bestanddel; som et pulver eller granuler; som en løsning eller en suspensjon i en vandig væske eller en ikke-vandig væske; eller som en olje-i-vann flytende

emulsjon eller en vann-i-olje flytende emulsjon. Den aktive bestanddel kan også presenteres som en bolus, et søtt medisinsk pulver eller en pasta.

En tablett kan lages ved kompresjon eller støping, eventuelt med én eller flere hjelpebestanddeler. Komprimerte tabletter kan fremstilles ved komprimering i en egnet maskin av den aktive bestanddel i frittflytende form, slik som et pulver eller granuler, eventuelt blandet med et bindemiddel, smøremiddel, inert fortynningsmiddel, smøremiddel, overflateaktivt eller dispergeringsmiddel. Støpte tabletter kan lages ved støping i en egnet maskin av en blanding av den pulveriserte forbindelse fuktet med et inert flytende fortynningsmiddel. Tabletter kan eventuelt belegges eller scores, og kan formuleres slik at de gir langsom eller kontrollert frigiving av den aktive bestanddel deri.

Formuleringer for parenteral administrering inkluderer vandige og ikke-vandige sterile injeksjonsløsninger som kan inneholde antioksidanter, buffere, bakteriestater og løste stoffer som gjør formuleringen isotonisk med blodet hos den tilsiktede mottager; og vandige og ikke-vandige sterile suspensjoner som kan inkludere suspensjonsmidler og fortykningsmidler. Formuleringene kan presenteres i enhetsdose eller multidoserholdere, for eksempel forseglede ampuller og medisinglass, og kan lagres i frysetørket (lyofilisert) tilstand som krever bare tilsetning av den sterile flytende bærer, for eksempel saltløsning eller vann for injeksjon, umiddelbart før anvendelse. Improviserte injeksjonsløsninger og suspensjoner kan fremstilles fra sterile pulvere, granuler og tabletter av den tidligere beskrevne type.

Formuleringer for rektal administrering kan presenteres som en stikkpille med de vanlige bærere slik som kakaosmør eller polyetylglykol.

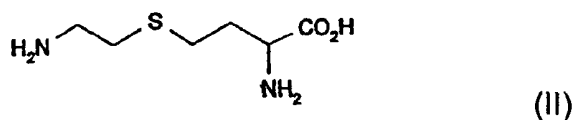
Formuleringer for lokalt administrering i munnen, for eksempel bukkalt eller sublinguallt, inkluderer lozenger omfattende den aktive bestanddel i en smaksbase slik som sukrose og akasia eller tragakant, og pastiller omfattende den aktive bestanddel i en basis slik som gelatin og glycerol eller sukrose og akasia.

Foretrukne enhetsdoseformuleringer er de som inneholder en effektiv dose, som gjengitt heri tidligere, eller en hensiktsmessig fraksjon derav, av den aktive bestanddel.

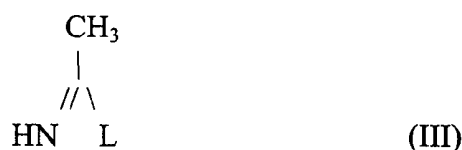
Det skal forstås at i tillegg til bestanddelene spesielt nevnt ovenfor, kan formuleringene ifølge denne oppfinnelse inkludere andre midler konvensjonelle i teknologien og som er relevante for den aktuelle formuleringstype, for eksempel vil de som er egnet for oral administrering kunne inkludere smaksmidler.

5 Ifølge et ytterligere aspekt av denne oppfinnelse, tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse med formel (I) eller et salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav og som omfatter:

(i) omsetning av forbindelsen med formel (II)



10 eller en enantiomer, et salt, eller et beskyttet derivat derav, med en forbindelse med formelen (III)



15

eller et salt derav, hvori L er en utgående gruppe etterfulgt av følgende trinn i hvilken som helst rekkefølge:

- (ii) eventuell fjerning av eventuelle beskyttelsesgrupper;
- 20 (iii) eventuell separasjon av en enantiomer fra en blanding av enantiomerer;
- (iv) eventuell omdanning av produktet til et tilsvarende salt, solvat eller fysiologisk funksjonelt derivat derav.

Den utgående gruppen L er fortrinnsvis C₁₋₆alkoksygruppe, for eksempel etoksy, eller en alkyltio, aralkyltio eller aryltiogruppe, for eksempel en benzyltio, eller 1- eller 2-naftylmetyltiogruppe.

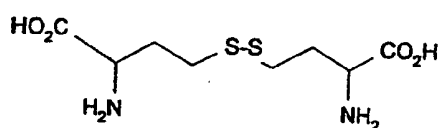
25

Når L er C₁₋₆alkoksy, kan reaksjonen i trinn (i) ovenfor, gjennomføres i løsning ved alkalisk pH, for eksempel pH 8 til 11, passende ved pH 10,5, og ved lav temperatur, for eksempel -5°C til 20°C, passende 0 til 5°C. Når L er en alkyltio, aralkyltio eller aryltiogruppe, kan reaksjonen gjennomføres i et organisk løsnings-

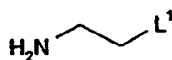
30 middel, for eksempel tetrahydrofuran eller en C₁₋₄alkohol slik som etanol, ved en moderat temperatur for eksempel 10 til 40°C, passende ved omgivende temperatur.

Forbindelser med formel (III) og salter derav er tilgjengelige kommersielt eller kan fremstilles ved fremgangsmåter i organisk kjemi vel kjent for fagpersoner på dette område, for eksempel som bekreftet av Shearer et al. i Tetrahedron Letters, 1997, 38, 179-182.

5 Forbindelser med formel (II) og salter og beskyttede derivater derav, kan fremstilles fra homocystin:



10 eller et beskyttet derivat derav, ved spalting av disulfidbindingen under dannelse av homocystein eller et beskyttet derivat derav, og kobling med en forbindelse med formelen (IV)



(IV)

eller et beskyttet derivat derav, hvori L^1 er en utgående gruppe, for eksempel halogen, slik som brom, eller en alkyl, aryl eller aralkylsulfonater, slik som toluensulfonyl.

15 Spalting av disulfidbindingen i homocystin eller et beskyttet derivat derav under dannelse av homocystein eller et beskyttet derivat derav, kan gjennomføres ved fremgangsmåter kjent for fagpersoner på dette område, for eksempel ved anvendelse av natrium i flytende ammoniakk, ditiotreitol eller natriumborhydrid.

20 Beskyttede derivater av homocystein, for eksempel. N-t-butoksykarobnyl-homocystein-t-butylester, kan reagere med forbindelser med formel (IV) under betingelser i et hensiktsmessig organisk løsningsmiddel (for eksempel toluen) i en reaksjon formidlet av en base slik som 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en eller et lignende middel som ville være anerkjent av en fagperson på dette område.

25 Homocystin, forbindelsene med formel (IV) og beskyttede derivater derav, er kommersielt tilgjengelige eller kan fremstilles ved fremgangsmåter i organisk kjemi vel kjent for fagpersoner på dette område.

De beskyttelsesgrupper som anvendes ved fremstilling av forbindelser med formel (I), kan anvendes på konvensjonell måte, for eksempel ved anvendelse av fremgangsmåter beskrevet i "Protective Groups in Organic Synthesis" av Theodora W. Green, 2. utgave (John Wiley & Sons, 1991), som også beskriver fremgangs-
5 måter for fjerning av slike grupper.

I reaksjonene ovenfor, blir primære aminer passende beskyttet ved anvendelse av acylgrupper, slik som t-butoksykarobnyl eller benzyloksykarbonylgrupper som kan fjernes under sure betingelser, for eksempel ved behandling med saltsyre eller hydrogenbromidsyre, eller ved hydrogenolyse.

10 Som det vil bli forstått av fagpersoner på dette område, kan anvendelse av slike beskyttelsesgrupper inkludere ortogonal beskyttelse av aminogrupper i forbindelsene med formel (II) for å lette den selektive fjerning av én gruppe i nærvær av en annen, og således muliggjøre selektiv funksjonalisering av en enkelt aminofunksjon. For eksempel kan en benzyloksykarbonylgruppe bli selektivt
15 fjernet ved hydrogenolyse. En fagperson på dette område vil også anerkjenne andre ortogonale beskyttelsesstrategier, tilgjengelige på konvensjonell måte som beskrevet i Theodora W. Green (se ovenfor).

De enantiomere forbindelser ifølge denne oppfinnelse, kan oppnås (a) ved separasjon av forbindelsene i den tilsvarende racemiske blanding, for eksempel ved
20 hjelp av en kiral kromatografikolonne, enzymatiske oppløsningsfremgangs-måter eller fremstilling og separasjon av egnede diastereoisomerer, eller (b) ved direkte syntese fra de hensiktsmessige kirale mellomprodukter ved fremgangs-måtene beskrevet ovenfor.

Eventuell omdanning av en forbindelse med formel (I) til et tilsvarende salt
25 kan beleilig gjennomføres ved reaksjon med den hensiktsmessige syre eller base. Eventuell omdanning av en forbindelse med formel (I) til et tilsvarende solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat, kan gjennomføres ved fremgangsmåter kjent for fagfolk på dette område.

Ifølge et ytterligere aspekt, vil den foreliggende oppfinnelse tilveiebringe nye
30 mellomprodukter for fremstilling av forbindelser med formel (I), for eksempel:

forbindelser med formel (II) som definert ovenfor, eller en enantiomer, et salt eller et beskyttet derivat derav; spesielt en forbindelse valgt fra:

(R,S)-7N-benzyløksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre;

(S)-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre;

5 (S)-t-butyl-2N-t-butoksykarobnyl-7N-benzyløksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat;

(S)-t-butyl-2N-t-butoksykarobnyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat;

(R,S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-7N-benzyløksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat; og

10 (R,S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat.

For en bedre forståelse av oppfinnelsen, er følgende eksempler gitt som en illustrasjon.

15 SYNTESEKSEMPLER

EKSEMPEL 1

Syntese av (S)-[2-(1-iminoetyl-amino)etyl]-L-homocystein eller (S)-7N-(1-
iminoetyl)-2,7-diamino-5-tioheptansyre

20

(i) (S)-7N-Benzyløksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre

Til flytende ammoniakk (130 ml), avkjølt til -80°C , ble tilsatt L-homocystin (3 g), etterfulgt av natriummetall (1,06 g) inntil den blå fargen holdt seg i 15 minutter. Etter denne tid ble tilsatt N-benzyløksykarbonyl-etanolamintosylat (8,16 g), og reaksjonen omrørt ved omgivende temperatur, inntil ammoniakken hadde for-
25 dampet. Residuet ble løst i vann (80 ml) og behandlet med 0,5M EDTA natrium-salt (2 ml). pH av løsningen ble justert til 7,0 med 2N svovelsyre, og det resulterende hvite bunnfall frafiltrert, vasket med kaldt vann og acetone og tørket i en vakuumeksikator under dannelse av tittelforbindelsen som et hvitt fast stoff, 5,3 g.

30 Massespektrum M+H 313.

(ii) (S)-2,7-Diamino-5-tioheptansyre

(S)-7N-Benzylloksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre (5,3 g) ble behandlet med 45% HBr i eddiksyre (23 ml) i 1 time. Det ble dannet en uregjerlig gummi, og eter ble tilsatt til blandingen for å sikre fullstendig utfelling av produktet. Væsken ble dekantert av, og de faste stoffer løst i varm SVM. Denne varme løsning ble behandlet med pyridin, inntil et bunnfall akkurat ble værende, og blandingen fikk avkjøle seg til romtemperatur. Det resulterende bunnfall ble frafiltrert og omkrystallisert fra SVM/vann, under dannelse av tittelforbindelsen som et hvitt fast stoff, 2,2 g, smp. 222°C (dek.).

(iii) (S)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-L-homocystein

(S)-2,7-Diamino-5-tioheptansyre (2,17 g) ble omrørt i 1N NaOH (16,75 ml) til pH 10,5 ved 0 til 5°C. Til denne løsning ble tilsatt etylacetimidathydroklorid (2,07 g) porsjonsvis, mens pH ble holdt på 10,5 med 1N NaOH. Når reaksjonen var fullstendig, ble pH justert til 3 med 1N HCl, og blandingen påsatt på en Dowex AGX8 H⁺-formionebytterkolonne. Kolonnen ble vasket til nøytral, deretter med 2,5M pyridin og igjen til nøytral med vann. Eluering med 0,5M ammoniakk og oppsamling av de ninhydrinpositive fraksjoner, ga etter inndamping et resulterende residuum som ble behandlet med 1N HCl til pH 4,5, og som ble inndampet til tørrhet. Residuet ble deretter behandlet med etanol og inndampet til tørrhet og deretter med dietyleter og dietyleter og inndampet til tørrhet, under dannelse av monohydrokloridet av tittelforbindelsen som et hardt hvitt skum.

Mikroanalysen av produktet var overensstemmende med 1,75 hydratet: funnet (beregnet): C 33,56 (33,45); H 7,11 (7,49), N 13,74 (14,63).

EKSEMPEL 2

(R/S)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-D,L-homocystein ble fremstilt ved fremgangsmåter analog med dem anvendt i eksempel 1, ved å gå ut ifra D,L-homocystin.

¹H NMR av produktet var overensstemmende med den foreslåtte struktur.

EKSEMPEL 2A

Det racemiske produkt fra eksempel 2, ble i alt vesentlig oppløst i de to enantiomere bestanddeler (identiske med (S)-produktet i eksemplene 1 og 4 og (R)-produktet i eksempel 3) ved anvendelse av en kiral Crownpac (+) HPLC-kolonne og eluering med vandig trifluoreddiksyre ved pH 2.

(S)-[2-(1-Iminoetyl-amino)etyl]-L-homocystein

Mikroanalysen av produktet var overensstemmende med ditrifluoracetatsalt-hydratet $C_8H_{17}N_3O_2S.(CF_3CO_2H)_2.H_2O$.

10 Funnet (beregnet): C 31,06 (30,97); H 4,53 (4,55), N 9,08 (9,03).

CD-spektrum (0,1N aq HCl) 210 (+0,80) nm.

(R)-[2-(1-Iminoetyl-amino)etyl]-D-homocystein

Mikroanalysen av produktet var i overensstemmelse med saltformen . 1,67

15 trifluoracetat . 0,3 HCl . 1,5 hydrat $C_8H_{17}N_3O_2S.(CF_3CO_2H)_{1,67}.HCl_{0,3}.1,5H_2O$.

Funnet (beregnet): C 30,18 (30,40); H 4,92 (4,97), N 9,53 (9,41), S 7,41 (7,18), Cl 1,86 (2,38), F 21,36 (21,28).

CD-spektrum (0,1N aq HCl) 210 (-0,64) nm.

20 EKSEMPEL 3

(R)-[2-(1-Iminoetyl-amino)etyl]-D-homocystein ble fremstilt ved fremgangsmåter analoge med dem anvendt i eksempel 1, ved å gå ut ifra D-homocystin.

EKSEMPEL 4**25 Syntese av (S)-[2-(1-iminoetyl-amino)etyl]-L-homocystein****(i) (S)-7N-Benzyl-oksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre**

Til flytende ammoniakk (430 ml) avkjølt til $-80^{\circ}C$, ble tilsatt L-homocystin (10 g, 37,45 mmol). Kjølebadet ble fjernet, og natriummetall (3,18 g, 138,26 mmol) ble tilsatt porsjonsvis i løpet av 25 minutter, mens temperaturen fikk stige til tilbake-løpstemperatur. Omrøringen ble fortsatt med tilbakeløp i ytterligere 30

minutter, hvorefter N-benzylloksykarbonyl-etanolamintosylat (25 g, 74,9 mmol) ble tilsatt, og reaksjonen omrørt ved omgivende temperatur over natten, inntil ammoniakken hadde fordampet. Residuet ble omrørt med vann (250 ml) ved 40°C i 10 minutter, avkjølt til romtemperatur og filtrert. pH av løsningen ble justert til 7,0 med 2M svovelsyre, og det resulterende hvite bunnfall frafiltrert, vasket med kaldt vann og aceton og tørket i en vakuumeleksikator under dannelse av (S)-7N-benzylloksy-karbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre som et hvitt fast stoff, smp. 240°C (dek.).

10 (ii) (S)-2N-t-Butoksykarbonyl-7N-benzylloksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre

(S)-7N-Benzylloksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre (15,5 g, 49,67 mmol) ble tilsatt til natriumhydroksyd (6,357 g, 159 mmol) i vann (110 ml), etterfulgt av dioksan (55 ml). Til denne blanding ble tilsatt di-t-butyldikarbonat (16,26 g, 74,5 mmol), og blandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur under nitrogen. Etter denne tid, ble de utfelte faste stoffer frafiltrert, toluen (300 ml) tilsatt, og sjiktene skilt fra hverandre. Det vandige sjikt ble avkjølt og surgjort til pH ca. 3 ved anvendelse av 1N HCl. Den surgjorte fraksjon ble ekstrahert med toluen (4 x 100 ml) og etylacetat (3 x 100 ml), og de samlede organiske fraksjoner tørket over MgSO₄. Konsentrering av de samlede organiske bestanddeler under redusert trykk, ga (S)-2N-t-butoksykarbonyl-7N-benzylloksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre som en hvit gummi.

Massespektrum M+H 413.

25 (iii) (S)-2N-t-Butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyreformiatsalt

Til metanol (50 ml) avkjølt til 5°C under nitrogenatmosfære, ble tilsatt palladiumsvart (0,678 g) alt på en gang. Til denne avkjølte løsning ble tilsatt en blanding av metanol (50 ml) og maursyre (11 ml, 196 mmol) i løpet av 1 minutt, etterfulgt av tilsetning av (S)-2N-t-butoksykarbonyl-7N-benzylloksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre (2 g, 4,85 mmol) i metanol (50 ml) i løpet av 2 minutter. Blandingens ble omrørt over natten ved omgivende temperatur, mer palladiumsvart

(257 mg) tilsatt og omrøringen fortsatt i ytterligere 3 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom Hyflo og konsentrert under redusert trykk. Residuet ble fordelt mellom vann og etylacetat, det vandige sjikt vasket med mer etylacetat, og det vandige sjikt konsentrert under dannelse av (S)-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyreformiatsalt som et hvitt fast stoff.

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

(iv) (S)-2N-t-Butoksykarbonyl-7N-(1-iminoetyl)-2,7-diamino-5-tioheptansyrehydroklorid

Til (S)-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyreformiatsalt (2,154 g, 6,59 mmol) i etanol (50 ml) ved romtemperatur under nitrogen, ble tilsatt S-(1-naftylmetyl)tioacetimidathydroklorid (3,70 g, 14,75 mmol), etterfulgt av etanol (50 ml). Omrøring ved omgivende temperatur, de faste stoffer løste seg etter 2 timer, og løsningen ble omrørt over natten. Reaksjonen ble konsentrert i vakuum, residuet behandlet med vann, og den vandige fraksjon vasket med dietyleter (4 x 50 ml). Konsentrering av den vandige fraksjon i vakuum, ga (S)-2N-t-butoksykarbonyl-7N-(1-iminoetyl)-2,7-diamino-5-tioheptansyrehydroklorid som et hvitt hygroskopisk fast stoff.

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

(v) (S)-[2-(1-Iminoetyl)amino]etyl-L-homocystein

Til (S)-2N-t-butoksykarbonyl-7N-(1-iminoetyl)-2,7-diamino-5-tioheptansyrehydroklorid (3,086 g, 8,69 mmol) ble langsomt tilsatt 4N HCl/dioksan (20 ml), og reaksjonsblandingen ble omrørt ved omgivende temperatur over natten.

Reaksjonen ble konsentrert i vakuum, residuet løst i vann og vasket med dietyleter (3 x 20 ml). Det vandige sjikt ble konsentrert i vakuum under dannelse av tittel-forbindelsen som hydrokloridet, som et hygroskopisk fast stoff.

Massespektrum M+H 220;

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

EKSEMPEL 5Syntese av (S)-[2-(1-iminoetyl)etyl]-L-homocystein

5

(i) (S)-t-Butyl-2N-t-butoksykarbonyl-7N-benzyloksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat

Til en løsning av N-t-butoksykarbonylcystein-t-butylester (fremstilt ved reduksjon av N-t-butoksykarbonylcystin-t-butylester med ditioneitol) (291 mg, 1 mmol) i tørr toluen (20 ml), blir tilsatt N-benzyloksykarbonyletanolamintosylat (349 mg, 1 mmol) og 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en (150 µl, 1 mmol), og blandingen ble omrørt kraftig over natten ved romtemperatur under nitrogen. Blandingene fordeles mellom 50 ml hver av etylacetat og 1N vandig HCl. Et ytterligere organisk ekstrakt blir slått sammen, og disse ekstrakter vasket med vandig natrium-hydrogenkarbonat, vann og saltløsning, deretter tørket og inndampet. Rensing ved kolonnekromatografi gir tittelforbindelsen. Massespektrum M+H 469 (25%), 369 (100%).

I en alternativ fremgangsmåte, kunne omdanning av produktet fra eksempel 4, trinn (ii), til sin t-butylester ved anvendelse av enten N,N-dimetylformamid-di-O-t-butylacetal eller O-t-butyl-1,1,1-trikloracetimidat, gi tittelforbindelsen som et hvitt krystallinsk fast stoff.

(ii) (S)-t-Butyl-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoatformiatsalt

Til en løsning av (S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-7N-benzyloksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat (1 g, 2,1 mmol) i etanol (50 ml), ble tilsatt palladiumhydroksyd på karbon (20%, 0,5 g) og ammoniumformiat (1,34 g). Suspensjonen ble oppvarmet med tilbakesløp i 2,5 timer, avkjølt og filtrert gjennom en plugg av silika som ble godt vasket med 1:1 etanol:vann og inndampet under dannelse av tittelforbindelsen som formiatsalt. Massespektrum M+H 335.

(iii) (S)-t-Butyl-2N-t-butoksykarbonyl-7N-(1-iminoetyl)-2,7-diamino-5-tioheptanoathydroklorid

Det rå (S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoatformiat-salt fra trinn (ii), ble utrørt til en velling med 50 ml tetrahydrofuran, væsken dekantert og blandet med S-(1-naftylmetyl)tioacetimidathydroklorid (0,5 g, 2 mmol) og omrørt i 24 timer ved romtemperatur. Løsningsmiddelet ble fordampet, og residuet fordelt mellom 25 ml hver av eter og vann, etterfulgt av to eter-
vaskinger; de vandige tilbakeekstrakter ble slått sammen og inndampet under
dannelse av en hvit pasta. Denne ble frysetørket to ganger under dannelse av
tittelforbindelsen som et hvitt hygroskopisk fast stoff.

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

(iv) (S)-S-[2-(1-iminoetyl-amino)etyl]-L-homocystein

Avbeskyttelse av (S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-7N-(1-iminoetyl)-2,7-diamino-5-tioheptanoathydroklorid ved anvendelse av 4N HCl i dioksan, ved fremgangsmåter analoge med dem anvendt i eksempel 4, trinn (v), ga (S)-S-[2-(1-iminoetyl-amino)etyl]-L-homocystein.

De karakteriserende data for tittelforbindelsen var i overensstemmelse med dem for produktet i eksempel 4.

BIOLOGISK AKTIVITET

1. Inhibering av eNOS og iNOS i rotteaortaringer

Inhibering av eNOS og iNOS in situ i rotteaortaringer, ble bestemt ved å måle økningen i ringspenningen forårsaket av NO-syntaseinhibering. For studier av basal tone (som reflekterer eNOS), ble det fremstilt ringer av brystaorta med intakt endotelium som tidligere beskrevet (Rees et al. (1989) Br. J. Pharmacol. 96, 418-424) og kurver over kumulativ konsentrasjon oppnådd for inhibitorene i nærvær av en grensekonsentrasjon av fenylefrin ($ED_{10} \approx 10$ nM). For studier av indusert glatt muskel-tone (som reflekterer iNOS), ble ringer befridd for endotel, eksponert for

LPS (0,1 µg/ml fra *S. typhosa*) i nærvær av fenylefrin ved omlag ED₉₀ i 6 timer som tidligere beskrevet (Rees et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 541-547). I løpet av denne tid foregikk et progressivt tap av tone på grunn av iNOS-induksjon. Kurver over kumulativ konsentrasjon ble deretter oppnådd for

5 inhibitorene.

Resultatene er gitt i følgende tabell:

	iNOS IC ₅₀ (µM)	eNOS % inhib.@ 300 µM	selektivitet iNOS vs eNOS
Eksempel 1	0,73	43	>500 ganger
Eksempel 2	0,45	53	>500 ganger
Eksempel 3	6,6	20	>150 ganger

15

Som kontrast vil 2-(1-iminoethylamino)etylcysteinhydroklorid (eksempel 4 i WO93/13055) være bare 33 ganger selektiv for iNOS versus eNOS i den samme test.

20

2. Inhibering av nNOS i rottekortikale skiver

Virkningene av forbindelsene på nNOS i rottehjerneskliver ble bestemt som beskrevet i Furfine et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 26677-26683 og Lizasoain et al. (1995) J. Neurochem. 64, 636-642.

25

KCl (54 mM) stimulert NO-syntese ble målt ved omdanning av ¹⁴C-arginin til ¹⁴C-citrullin over et tidsrom på 2 timer ved 37°C i McIlwain-avkappede (0,2 mm x 0,2 mm) rottecerebrale korteksskiver, etter en 1 times preinkuberingsperiode i fravær av forbindelse eller høy KCl.

30

Forbindelsen i eksempel 1 ble bestemt til å ha en IC₅₀ på 220 µM, hvilket antyder ca. 300 ganger høyere selektivitet for iNOS enn for eNOS.

3. Fremgangsmåte for bestemmelse av den orale biotilgjengelighet av iNOS-inhibitorforbindelser

Dyrearbeid:

5 Mus (3 dyr pr. tidspunkt) ble dosert intravenøst (10 mg/kg) og oralt (50 mg/kg) med testforbindelse i vandig løsning. Blodprøver ble tatt med tidsmellomrom etter administrering, og plasma fremstilt ved sentrifugering. Prøvene ble lagret ved -20°C inntil analyse.

10 Analyse av forbindelser i plasma:

Plasma (50 µl) ble avproteinisert, og forbindelsen derivatisert med et kvaternært ammoniumreagens. Prøvene ble deretter injisert på et HPLC-system, og forbindelseskonsentrasjonen bestemt ved anvendelse av massespektrometisk deteksjon.

15 Farmakokinetisk analyse:

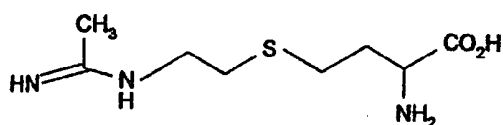
Plasmakonsentrasjonene oppnådd ved fremgangsmåten ovenfor, ble innsatt i en farmakokinetisk programvarepakke (PKCAL v 1.2s), og disse data ble tilpasset ved anvendelse av en ikke-kompartimentmetode. Den orale bio-tilgjengelighet av forbindelsene ble bestemt ved å sammenligne arealet under kurven (AUC) verdiene beregnet med programvaren for den orale profil med AUC for den intravenøse profil. Halveringstidene ble oppnådd ved å tilpasse terminal-fasetidspunktene for den intravenøse profil.

25 (S)-[2-(1-Iminoetyl-amino)etyl]-L-homocystein ble funnet å ha en oral biotilgjengelighet på 55% og en halveringstid på 5,7 timer.

Når den ble gjentatt ved intravenøs og oral dose på 10 mg/kg i rotter, hadde (S)-[2-(1-iminoetyl-amino)etyl]-L-homocystein en biotilgjengelighet på 92%.

Patentkrav

- 5 1. Forbindelse, karakterisert ved formelen (I)



(II)

eller et salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav.

2. Forbindelse ifølge formel (I), karakterisert ved at den er valgt fra:

10 (R/S)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-DL-homocystein;

(S)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-L-homocystein; og

(R)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-D-homocystein

eller et salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav.

- 15 3. Forbindelse med formel (I), karakterisert ved at den er (S)-[2-(1-iminoethylamino)etyl]-L-homocystein eller et salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav.

4. Forbindelse med formel (I) som definert i hvilket som helst av kravene 1 til
20 3, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller fysiologisk funksjonelt derivat derav for anvendelse i medisinsk terapi.

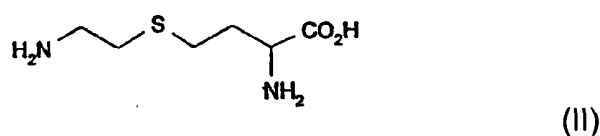
5. Farmasøytisk formulering, karakterisert ved at den omfatter en
forbindelse med formel (I) som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 3, eller
25 et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller fysiologisk funksjonelt derivat derav,
og en farmasøytisk akseptabel bærer eller eksipient, og eventuelt én eller flere andre terapeutiske bestanddeler.

6. Anvendelse av en forbindelse med formel (I) som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 3, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller fysiologisk funksjonelt derivat derav, til fremstilling av et medikament for profylakse eller behandling av en klinisk tilstand for hvilken en inhibitor av nitrogenoksydsyntase er indikert.

7. Anvendelse ifølge krav 6, hvori den kliniske tilstand er valgt fra artritt, astma, tarmslyng og migrene.

8. Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse med formel (I) eller et salt, solvat eller et fysiologisk funksjonelt derivat derav, karakterisert ved at den omfatter:

(i) omsetning av forbindelsen med formel (II)



eller en enantiomer, et salt eller et beskyttet derivat derav, med en forbindelse med formelen (III)



eller et salt derav, hvori L er en utgående gruppe; etterfulgt av følgende trinn i hvilken som helst rekkefølge:

- (ii) eventuell fjerning av eventuelle beskyttelsesgrupper;
- (iii) eventuell separasjon av en enantiomer fra en blanding av enantiomerer;
- (iv) eventuell omdanning av produktet til et tilsvarende salt, solvat eller fysiologisk funksjonelt derivat derav.

9. Forbindelse, karakteriseret ved at den er valgt fra:

(R,S)-7N-benzylloxykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre;

(S)-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptansyre;

5 (S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-7N-benzylloxykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat;

(S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat;

(R,S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-7N-benzylloxykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat; og

10 (R,S)-t-butyl-2N-t-butoksykarbonyl-2,7-diamino-5-tioheptanoat.