



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54382 (13) C2

(51) 7 C07C281/16,281/18, A61K31/195

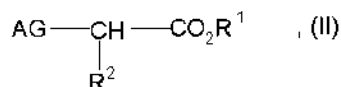
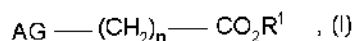
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АМІНОГУАНІДИНКАРБОКСИЛАТИ

1

2

(21) 97062933
 (22) 13 11 1995
 (24) 17 03 2003
 (86) PCT/US95/14126, 13 11 1995
 (31) 08/344,274
 (32) 23 11 1994
 (33) US
 (31) 08/484,547
 (32) 07 06 1995
 (33) US
 (46) 17 03 2003, Бюл. № 3, 2003 р.
 (72) Ларсен Скотт Д., US, Вейленкорт Валері А., US, Мей Пол Д., US, Теніс Стівен П., US, Такер Джон А., US, Меллессон Мартін Д., US, Скостарез Хайнріх Дж., US
 (73) БІОВІТРУМ АБ, SE
 (56) EP, A3, 0 222 313, 20 05 1987, кл. A61K 31/55
 US, A, 5 130 324, 14 07 1992, кл. A01N 43/40
 US, A, 3 943 253, 09 03 1976, кл. A01N 9/20
 US, A, 5 272 165, 21 12 1993, кл. A01N 43/40
 Chemische Berichte, vol 101, 1968, pages 1195-1199
 (57) 1 Аминогуанидинкарбоксилаты формулы I или II



где AG является

- (a) N-аминогуанидином,
 (b) N,N'-диаминогуанидином, или
 (c) N,N',N''-триаминогуанидином,
 где n является целым числом от 1 до 5,
 R¹ является
 (a) водородом,
 (b) фенилом,
 (c) C₁-C₅ алкилом или
 (d) C₁-C₅ алкилфенилом, и
 R² является

- (a) фенилом,
 (b) C₁-C₁₀ алкилом или
 (c) C₁-C₅ алкилфенилом, при следующих условиях
 (a) в формуле I, когда n равно 2 или 3, R¹ не является водородом,
 (b) в формуле I, когда n равно 1, R¹ не является водородом или метилом,
 (c) в формуле II, когда R² является этилом или фенилом, R¹ не является водородом, и
 (d) соединение не является N-аминогуанилглицином или N-аминогуанил-D,L-фенилаланином

2 Соединение по пункту 1, выбранное из [2-(аминоиминометил)гидразино]уксусной кислоты, ее моногидрата и ее фенилметилового эфира, моногидрохлорида,
 α-[2-

(аминоиминометил)гидразино]бензолпропановой кислоты моногидрата,
 [1-(аминоиминометил)гидразино]уксусной кислоты моногидробромида,
 N-(гидразиноиминометил)-β-аланина,
 N-(дигидразинометилен)глицина,
 [2-(гидразиноиминометил)гидразино]уксусной кислоты,

N-(дигидразинометилен)-β-аланина,
 N-(дигидразинометилен)-L-аланина,
 рацемической HN=C(NH₂)-NH-NH-CH(CH₃)-COOH,
 N-(дигидразинометилен)-d-аланина и
 N-(дигидразинометилен)валина

3 Соединение по п. 1, выбранное из [2-(аминоиминометил)гидразино]уксусной кислоты и ее моногидрохлорида,
 N-(дигидразинометилен) глицина,
 [2-(гидразиноиминометил)гидразино]уксусной кислоты и
 [1-(гидразиноиминометил)гидразино]уксусной кислоты

Данная заявка является частичным продолжением заявки США с серийным номером

08/344274, зарегистрированной 23 ноября 1994, находящейся в настоящее время на стадии рас-

(13) C2

(11) 54382

(19) UA

смотрения

Данное изобретение представляет новые соединения и новый способ лечения инсулиннезависимого сахарного диабета (ИНСД), осложнений диабета, происходящих в результате избыточного неферментативного гликозирования белков при инсулиннезависимом и инсулинзависимом сахарном диабете, нарушенной толерантности к глюкозе и ожирения

Инсулиннезависимый сахарный диабет, или ИНСД и диабет типа II являются синонимами. Больные ИНСД имеют необычайно высокие концентрации глюкозы в крови на голодный желудок и замедленное клеточное поглощение глюкозы после еды или после диагностического теста, известного как тест на толерантность к глюкозе. ИНСД диагностируется на основании общепринятых критериев (American Diabetes Association, Physician's Guide to Insulin-Dependent (Type I) Diabetes, 1988, American Diabetes Association, Physician's Guide Non-Insulin-Dependent (Type II) Diabetes, 1988)

Инсулинзависимый сахарный диабет, ИЗСД и диабет типа I являются синонимами. Больные ИЗСД имеют ненормально высокие концентрации глюкозы в крови на голодный желудок и замедленное клеточное поглощение глюкозы после приема пищи или после диагностического теста, известного как тест на толерантность к глюкозе. ИЗСД диагностируется на основе общепринятых критериев (American Diabetes Association, Physician's Guide to Insulin-Dependent (Type I) Diabetes, 1988)

Нарушенная толерантность к глюкозе появляется, когда степень метаболического клиренса глюкозы из крови меньше чем обычно существующая в основном у населения после того, как стандартная доза глюкозы была принята перорально или введена парентерально (American Diabetes Association, Physician's Guide to Non-Insulin-Dependent (Type II) Diabetes, 1988). Нарушенная толерантность к глюкозе может также наблюдаться при ИНСД, ИЗСД диабете беременных и ожирении. Нарушенная толерантность к глюкозе может также встречаться у лиц не отвечающим критериям для этих заболеваний. Нарушенная толерантность к глюкозе у лиц без диабета является фактором, предрасполагающим к развитию ИНСД.

Ожирение является состоянием, при котором происходит увеличение содержания жировой ткани в теле, приводя к избыточному весу тела выше норм, принятых для возраста, пола, роста и телосложения данного человека (Bray, Obesity, an Endocrine Perspective, p. 2303, Multihormonal Systems and Disorders (1989)). Принятые нормы определялись смертностью по данным страхования жизни и заболеваемостью в связи со строением тела. Чрезмерная смертность, которая наблюдается среди лиц с ожирением, происходит в результате заболеваний, к которым предрасполагает это состояние. Они включают рак, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания пищеварительной системы, респираторные заболевания и сахарный диабет.

У больных с хронической гипергликемией, та-

кой, которая присутствует при инсулиннезависимом сахарном диабете и инсулинзависимом диабете, глюкозозависимое перекрестное связывание белков происходит со скоростью свыше нормальной (Bunn, American Journal of Medicine, Vol. 70, p. 325, 1981), приводя к измененной структуре белков (Brownlee, Chapter 18, Diabetes Mellitus, p. 279, 1990). Избыточное неферментативное гликозирование белков способствует осложнениям при диабете и осложнениям при старении людей без диабета, таким как нейропатии, нефропатии, ретинопатия, гипертензия и атеросклероз (Brownlee, 1990, выше).

Гипергликемия определяется как концентрация глюкозы в крови, превышающая принятую норму для основного населения (American Diabetes Association, Physician's Guide to Non-Insulin-Dependent (Type II) Diabetes, 1988).

В то время как взаимоотношение между этими состояниями известно, было бы целесообразно иметь лекарственный препарат, которым можно лечить или предотвращать все из них.

В JP 54128523 (Chem. Abstr. 92 75899h сообщается о том, что 3-(1-(аминометил)гидразино)пропановая кислота является фунгицидом и инсектицидом. О синтезе N-(гидразиноминиметил)-глицина сообщается у Gante, J. Chem. Ber. 1968, 101, 1195. Некоторые алкилид-аминогуанидиновые производные описаны в патенте США 5272165, с названием "Подавление повышенного гликозирования белков в организме - применение 2-алкилиденаминогуанидиновых производных, используемых, например, для лечения сопутствующих диабету эффектов или, особенно, предотвращения окрашивания зубов". Аминогуанидиновые аналоги аргинина раскрыты в DE 4244539-A1 и WO 9104-023A. В патенте США 5132453 раскрыто, что N6-(гидразиноминиметил)-лизин применим в качестве ингибитора образования окиси азота и для лечения гипертензии. В EP-230-037-A раскрыты некоторые новые 2-замещенные гуанидиновые производные, обладающие противоишемической и кардиопротекторной активностью. В патенте США 3412105 раскрывается β-арил-N-гуанидино-(β-аланины или α-карбокси-β-аланины), как ингибиторы MAO и пролонгированные гипотензивные средства.

Данное изобретение, в частности, представляет

(I) Соединение формулы I или II



или



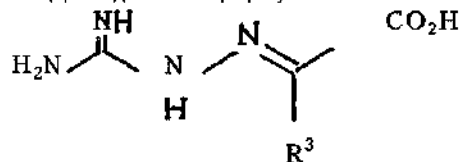
или их фармакологически приемлемые соли, где AG является

- N-аминогуанидин,
 - N, N'-диаминогуанидин или
 - N, N', N''-триаминогуанидин,
- где n является целым числом из 1 - 5, где R¹ является

- водородом,
- фенилом,

- с) C₁-C₅ алкилом или
 d) C₁-C₃ алкилфенилом и
 где R² является
 а) водородом,
 б) фенилом,
 с) C₁-C₁₀ алкилом или
 d) C₁-C₅ алкилфенилом
 при следующих условиях
 а) в формуле I, когда n равно 2, R¹ не является водородом,
 б) в формуле I, когда n равно 1, R¹ не является метилом,
 с) в формуле II, когда R² является этилом, R¹ не является водородом,
 d) в формуле II, когда R² является фенилом, R¹ не является водородом и
 е) в формуле I, когда n равно 3, R¹ не является водородом

2) способ лечения или профилактики инсулиннезависимого сахарного диабета у пациента, подверженного диабету или заболевшего ИНСД включающий системное введение количества, эффективного для лечения и предотвращения ИНСД соединения формулы III



где R³ является водородом, метилом, этилом, CH₂-фенилом или н-гексилем

Для общих формул I и II связывание фрагмента AG не является принципиальным, т.е. связь с примыкающим атомом углерода может находиться у любого одного атома азота фрагмента AG. Оставшиеся атомы азота фрагмента AG не замещены

Количество атомов углерода в содержащих углерод заместителях указывается префиксом "C_i-C_j", где i является наименьшим числом атомов углерода, а j является самым большим числом атомов углерода

Примеры алкильных групп, имеющих от 1 до 10 атомов углерода, включают, например, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, т-бутил, н-пентил, изоамил, н-гексил, н-гептил, н-октил, н-нонил, н-децил и другие их изомерные формы

Примеры фармацевтически приемлемых солей с присоединением кислоты включают ацетат, адипат, алгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, комфорсульфонат, циклопентан-пропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталенсульфонат, никотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, суцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат и ундеканат

Доза соединения по формуле I-III, которая должна применяться, находится между 0,1 и 100 мг/кг веса тела в сутки. Предпочтительная до-

за составляет 1 - 50 мг/кг/сут. Введение может быть пероральным, парентеральным, интраназальным, буккальным, сублингвальным, интаректальным или трансдермальным путем. Пероральный путь введения предпочтителен.

Новые соединения этого изобретения представлены общими формулами I и II. Известные соединения, заявляемые для использования при лечении ИНСД, представлены формулой III.

Из соединений этого изобретения, представленных общими формулами I и II, соединения, перечисленные в таблице 1, являются особенно предпочтительными, и предпочтительно их применение при лечении ИНСД и его осложнений.

В таблице 2 содержится перечень родственных соединений, которые не заявлены. Они включены, чтобы продемонстрировать удивительное действие заявляемых соединений путем демонстрации того, что эти соединения, которые близко родственны заявляемым соединениям, не считаются активными в самой высокой испытанной дозе.

В таблице 3 содержится список соединений в рамках общего объема, заключенного в общих формулах I и II, которые не проявляют активности в самых высоких испытанных дозах и, таким образом, составляют исключение, что видно по условиям пункта 1, формулы.

Таблица 4 содержит список новых соединений, конкретно заявляемых в изобретении. Методики их получения даны в разделе 4.

Таблица 5 содержит перечень известных соединений, которые заявлены в изобретении для применения при лечении ИНСД.

Таким образом, это изобретение представляет новые и известные соединения, обладающие неожиданными и удивительными противодиабетическими свойствами.

Введение соединений этого изобретения мышам ККАу в дозе, равной примерно 100 - 500 мг/кг/сут, приводит к частичному улучшению или полному устранению гипергликемии на этой модели инсулиннезависимого сахарного диабета у грызунов (конкретные соединения перечислены в таблицах 4 и 5, смотрите, Chang, Wyse, Copeland, Peterson, and Ledbetter, Diabetes 1985, p. 466, 1986). Мышки ККАу являются инсулинорезистентными (Chand, et al., выше), и обнаружение того, что уровень глюкозы в крови у голодающих мышей снижен у этих животных, указывает на то, что инсулиновая резистентность, наиболее вероятно, меньше после лечения заявляемыми соединениями. Мышки ККАу имеют избыточный вес по сравнению с нормальными, аутбредными мышами (Chand, et al., выше), и введение соединений этого изобретения приводит к потере веса.

Введение N-(дигидразинметипен)-глицина, предпочтительного соединения в этой серии, мышам ККАу с диабетом в течение 4 дней снижало уровень глюкозы в крови у не голодных животных (см. таблицу 6). Доза, равная 60 мг/кг/сутки, вызвала 35% снижение уровня глюкозы в крови, что было статистически значимо по сравнению с контролем. Более высокие дозы давали еще большее снижение концентраций глюкозы в крови. 3-Гуанидинпропионовая кислота в дозе

500мг/кг/сутки давала примерно такое же снижение концентрации глюкозы в крови, которое достигалось при дозе 60мг/кг/сутки N-(дигидразинметил)-глицина

Введение N-(дигидразинметил)-глицина мышам ККАу с диабетом в течение 4 дней снижало вес тела животных (см таблицу 6) Доза, равная 100мг/кг/сутки вызвала 4% снижение веса тела, что было статистически значимо по сравнению с контролем Более высокие дозы вызвали еще большее снижение избыточного веса тела у мышей ККАу 3-гуанидинпропионовая кислота в дозе 500мг/кг/сутки давала примерно такое же снижение веса тела у мышей ККАу, которое достигалось при помощи дозы 100мг/кг/сутки N-(дигидразинметил)-глицина

Введение N-(дигидразинметил)-глицина нормальным мышам C57BL в дозе 100мг/кг снижало концентрацию глюкозы в крови на голодный желудок у этих животных (таблица 7)

Введение N-(дигидразинметил)-глицина мышам ККАу с диабетом или нормальным мышам C57BL в дозе 100мг/кг приводит к улучшенной глюкозной толерантности, что демонстрируется более низкими уровнями глюкозы после инъекции стандартной дозы глюкозы для исследования (таблица 7)

Неферментативное гликозирование белков является первоначальной стадией в глюкозависимом перекрестном связывании белков (Brownlee, выше) Неферментативное гликозирование человеческого сывороточного альбумина снижается in vitro N-(дигидразинметил)-глицином, N-(гидразиниминометил)-глицином и [2-(аминоиминометил)гидразин]-уксусной кислоты моногидрохлоридом (таблица 8) Аминогуанидин, который, как было показано ранее, подавляет неферментативное гликозирование белков in vitro (Khatami, Suldan, David, Li and Rockey, Life Sciences, vol 43, p 1725 - 1731, 1988) и in vivo (Brownlee, выше) также эффективен и в этом исследовании (таблица 8) 3-Гуанидинпропионовая кислота не действовала на неферментативное гликозирование альбумина в этом исследовании

У пациентов с сахарным диабетом присутствует несколько метаболических нарушений, которые было бы целесообразно скорректировать ненормально повышенный уровень глюкозы в крови после приема пищи и на голодный желудок, замедленный клиренс глюкозы из кровотока (American Diabetes Association, Physicians Guide to Insulin-Dependent (Type I) Diabetes, 1988, American Diabetes Association, Physician's Guide to Non-Insulin-Dependent (Type II) Diabetes, 1988) и избыточное гликозирование белков, которое способствует развитию диабетических осложнений (Brownlee, выше) Кроме того, с инсулиннезависимым сахарным диабетом часто связано ожирение и оно отягощает нарушенный метаболизм глюкозы у этих больных (Horton and Jeanrenaud, Chapter 27, Obesity and Diabetes Mellitus, 1990) При оптимальном лечении инсулиннезависимого сахарного диабета должны корректироваться все эти нарушения Избыточное гликозирование белков, такое, которое может происходить при инсулиннезависимом сахарном диабете и инсулинзависимом

сахарном диабете, можно предотвратить путем блокирования химической реакции глюкозы и молекул белка (Brownlee, выше) и снижения ненормального повышения концентрации глюкозы в крови при диабетическом состоянии (Holman and Turner, Diabetic Medicine, 5 582 - 588, 1988, Benjamin and Sacks, Clin Chem, 40:15 683 - 687, 1994) Наиболее желательное лечение должно действовать двумя путями, так чтобы более полно снизить степень неферментативного гликозирования белков

Заявляемые соединения обладают способностью положительно воздействовать на многие метаболические дефекты, сопровождающие сахарный диабет, и предотвращать метаболические нарушения с помощью более чем одного механизма, что четко отличает их фармакологическое действие от действия других гуанидиновых соединений, которые ранее были заявлены в качестве средств лечения сахарного диабета Заявляемые соединения неожиданно превосходят аминоксидин, диаминоксидин, 3-гуанидинпропионовую кислоту и метформин при лечении инсулиннезависимого сахарного диабета, так как они проявляют более полный спектр желаемой активности и эффективны в более низких дозах

Заявляемые соединения представляют неожиданные преимущества при лечении сахарного диабета по сравнению с диаминоксидином и аминоксидином, так как заявляемые соединения действуют метаболически со снижением избыточных концентраций глюкозы в крови, а также блокированием неферментативного гликозирования белков Заявляемые соединения неожиданно превосходят аминоксидин и диаминоксидин при лечении нарушенной толерантности к глюкозе или ожирения, так как у аминоксидина и диаминоксидина отсутствует эффективность в этом отношении Аминоксидин и диаминоксидин подавляют неферментативное гликозирование белков in vitro и образование конечных продуктов усиленного гликозирования in vivo (Kumari, Umar, Bansal, and Sahid, Diabetes, 40, 1079 - 1084, 1991) На основании этого подавления неферментативного гликозирования белков, предположили, что аминоксидин будет полезен при лечении диабета (Brownlee, выше) Аминоксидин не действует на уровень глюкозы в крови у нормальных крыс или крыс, которым создали диабет с помощью инъекции аллоксана или стрептозотоцина (Kumari, Umar, Bansal, Sahid, выше, Yagihashi, Kamijo, Baba, Yagihashi, and Nagai, Diabetes, 41 47 - 52, 1992, Edelstein and Brownlee, Diabetologia, 35 95 - 97, 1992, Oxlund and Andreassen, Diabetologia, 35 19 - 25, 1992) Диаминоксидин не действует на уровень глюкозы в крови нормальных крыс и с диабетом, вызванным аллоксаном (Kumari, Umar, Bansal, Sahid, выше) Аминоксидин не влияет на вес тела нормальных крыс или крыс с диабетом (Kumari, Umar, Bansal, Sahid, выше, Yagihashi, Kamijo, Baba, Yagihashi, and Nagai, выше, Oxlund and Andreassen, Diabetologia, 35 19 - 25, 1992) или приводит к увеличению веса тела человека и крыс (Baylin, Horakova, and Beaven, Experientia, 31 562, 1975) Диаминоксидин не влияет на вес тела нормальных крыс и крыс с диабетом, вызванным

аллоксаном (Kumar, Umar, Bansal, Sahib, выше) Действие аминогуанидина или диаминогуанидина на толерантность к глюкозе еще нужно выявить

Заявляемые соединения неожиданно превосходят 3-гуанидинпропионовую кислоту при лечении сахарного диабета, так как последняя менее активна в отношении регуляции гипергликемии, и у нее отсутствует способность подавлять неферментативное гликозирование белков Заявляемые соединения неожиданно превосходят 3-гуанидинпропионовую кислоту при лечении нарушенной толерантности к глюкозе или ожирения благодаря большей активности этих соединений Ранее было показано, что 3-гуанидинпропионовая кислота снижает гипергликемию и избыточный вес тела и улучшает толерантность к глюкозе у грызунов с диабетом (Meglasson, Wilson, Yu, Robinson, Wyse, and de Souza, J Pharm And Exp Therapeutics, 266 1454 - 1462, 1933) Предпочтительное соединение в этом пункте, N-(дигидразинметилден)-глицин, активнее 3-гуанидинпропионовой кислоты по снижению ненормально повышенных уровней глюкозы в крови и веса тела у мышей ККАу Для снижения уровня глюкозы в крови у мышей ККАу на 20% необходимо 130мг/кг/сутки последнего соединения Сходное снижение уровня глюкозы в крови могло достигаться с помощью дозы, равной 30мг/кг/сутки, N-(дигидразинметилден)-глицина N-(дигидразинметилден)-глицин, введенный мышам ККАу в дозе 60мг/кг/сутки, был примерно также эффективен, как и 3-гуанидинпропионовая кислота в дозе 500мг/кг/сутки 3-Гуанидинпропионовая кислота улучшает толерантность к глюкозе у мышей ККАу с диабетом при введении с пищей в виде 1% примеси, которая должна поставлять дозу, равную примерно 1000мг/кг/сутки (патент США 5132324) Для сравнения, N-(дигидразинметилден)-глицин улучшал толерантность к глюкозе у нормальных мышей C57BL и мышей ККАу с диабетом при введении в дозе 100мг/кг/сутки В отношении снижения веса тела доза 100мг/кг/сутки N-(дигидразинметилден)-глицина была примерно также эффективна, как и 500мг/кг/сутки 3-гуанидинпропионовой кислоты 3-Гуанидинпропионовая кислота не подавляет неферментативное гликозирование альбумина *in vitro* в противоположность заявляемым соединениям

Заявляемые соединения неожиданно превосходят метформин при лечении сахарного диабета, непереносимости глюкозы, ожирения, так как последний менее активен при испытании на той же модели на животных, что и заявляемые соединения К тому же, в отношении его эффективности по снижению веса тела и предотвращению неферментативного гликозирования белков, данные, опубликованные для метформина являются противоречивыми и не демонстрируют стабильных результатов Как было показано ранее, метформин снижает гипергликемию у больных с инсулиннезависимым диабетом при введении в дозе 1000 - 3000мг/сутки и повышает скорость клиренса глюкозы у таких больных при введении в дозе 1500 - 2500мг/сутки (Baily, Diabetes Care, 15 755 - 772, 1992) Грызуны менее чувствительны к метформину, чем люди, и поэтому необходимы более высокие дозы, чтобы продемонстрировать глике-

мические эффекты (Baily, Flatt, Wilcock, and Day, Frontiers in Diabetes Research, pp 277 - 282, 1990, Penicaud, Hiter, Ferre, and Girard, Biochem J 262 881 - 885, 1989) Хроническое пероральное введение метформина снижает гипергликемию при введении новорожденным мышам с вызванным стрептозотоцином диабетом в дозе 100мг/кг/сутки (Rossetti, DeFronzo, Gherzi, Stein, et al, Metabolism, 39 425 - 435, 1990), мышам DBM в дозе 400мг/кг/сутки (Baily, Flatt, Wilcock, and Day, выше), крысам Zucker fa/fa в дозе 350мг/кг/сутки (Penicaud, Hiter, Ferre, and Girard, выше) и мышам ККАу в дозе 300мг/кг/сутки или более (Meglasson, Wilson, Yu, Robinson, de Souza, выше) Хроническое пероральное введение метформина не влияло на концентрацию глюкозы в крови у нормальных мышей, получающих 250мг/кг/сутки, у мышей с диабетом, вызванным стрептозотоцином, получающих 250мг/кг/сутки (Baily, Flatt, Wilcock, and Day, выше) или мышей ob/ob с диабетом, получающих 250мг/кг/сутки (Baily, Flatt, and Ewan, Arch Int Pharmacodyn, 282 233 - 239, 1986) Острое введение 264мг/кг метформина или его аналога буформина в дозе 132мг/кг не влияло на уровень глюкозы в крови у крыс (Tutwiler and Bridi, Diabetes, 27 868 - 876, 1978) Когда предпочтительное соединение по этой формуле, N-(дигидразинметилден)-глицин испытывали на мышах ККАу, он был более активен, чем метформин в отношении снижения ненормально повышенного уровня глюкозы в крови на этой модели Чтобы снизить уровень глюкозы в крови у мышей ККАу на 25% требовалось 300мг/кг/сутки метформина и (Meglasson, Wilson, Yu, Robinson, Wyse, and de Souza, выше) Сходное снижение уровня глюкозы в крови могло достигаться с помощью дозы 30 - 60мг/кг/сутки N-(дигидразинметилден)-глицина В отношении повышения толерантности к глюкозе, сообщалось, что метформин не влиял на толерантность к глюкозе у нормальных мышей, когда его давали в дозе 750мг/кг (Tutwiler and Bridi, выше) или у нормальных мышей, которым давали 50мг/кг (Baily, Flatt, Wilcock, and Day, выше) Когда его давали нормальным мышам или крысам с вызванным стрептозотоцином диабетом в дозе 250мг/кг толерантность к пероральному приему глюкозы повышалась (Baily, Flatt, Wilcock, and Day, выше) Для сравнения, N-(дигидразинметилден)-глицин повышал толерантность к глюкозе при введении нормальным мышам C57BL или мышам ККАу с диабетом в более низкой дозе, 100мг/кг В отношении снижения веса тела, было сообщено, что метформин вызывает потерю веса у больных инсулиннезависимым диабетом, лечившимся в течение одного года (Baily, выше) или не имеет значительного действия на вес тела больных инсулиннезависимым диабетом с ожирением, лечившихся в течение того же срока (Multi-centre Study, Diabetologia, 24 404 - 411, 1983) Метформин не вызывал потери веса у мышей ob/ob с диабетом при введении в дозе 240мг/кг/сутки или у мышей с вызванным стрептозотоцином диабетом при введении в дозе 60мг/кг/сутки (Lord, Atkins, and Baily, Diabetologia 25 108 - 113, 1983) Метформин вызывал статистически значимую потерю веса у мышей ККАу, леченных

1700 мг/кг/сутки этого соединения, но не оказывал этого действия, когда его давали в более низких дозах (Meglasson, Wilson, Yu, Robinson, Wyse, and de Souza, выше). Для сравнения, когда N-(дигидразинметил)-глицин вводили мышам ККАу в дозе 100 мг/кг/сутки, он был примерно также эффективен, как и метформин в дозе 1700 мг/кг/сутки в отношении получения потери веса у линии мышей с ожирением (Meglasson, Wilson, Yu, Robinson, Wyse, and de Souza, выше). Сообщалось, что метформин подавляет неферментативное гликозирование эритроцитных плазматических мембран в концентрациях, равных 0,5 и 5 микромолей на литр на основе его способности предотвращать снижение основных параметров плазматических мембран, при спектроскопии с использованием электронного парамагнитного резонанса, инкубированных с глюкозой *in vitro* (Freisleben, Ruckert, Wiernsperger, and Zimmer, *Biochemical Pharmacology*, 43 1185 - 1194, 1992). При высоких концентрациях, 50 и 100 микромолей на литр, метформин обладал обратным эффектом и давал очень низкий основной показатель. Следовательно, можно было ожидать, что то, что уменьшит или усилит ли метформин неферментативное гликозирование белков у пациентов с диабетом, должно зависеть от концентрации метформина в сыворотке лечившихся пациентов. У людей с диабетом, которые получали 1 грамм метформина перорально, среднее значение C_{max} концентрации в плазме составляет 3,24 микрограмм на миллилитр (или 25 микромолей на литр) (Tucker, Casey, Phillips, Connor, et al, *Br J Clin Pharmacol*, 2 235 - 246, 1981) и поэтому находится в промежутке между наивысшей концентрацией, которая, как показано, снижает неферментативное гликозирование эритроцитов, и самой низкой концентрацией, которая, как показано, стимулирует этот процесс. На основании опубликованных значений уровня метформина в плазме у пациентов с диабетом, нельзя сделать заключение, будет ли метформин подавлять неферментативное гликозирование белков или будет усиливать процесс тем же путем при назначении в качестве терапии для больных.

Основные методы получения соединений этого изобретения представлены на схемах 1 - 4. Конкретные примеры для ряда этих методик можно найти в экспериментальных методиках, представленных в описании предпочтительного осуществления. Путем применения других исходных материалов и реагентов могут быть получены разнообразные соединения этого изобретения. В следующих источниках изложены методики, касающиеся основных методов синтеза соединений этого изобретения.

Схема 1 Gante, *J Chem Ber* 1968, 101, 1195
Armarego, W L F., Kobayashi, T *J Chem Soc (C)* 1971, 238
Evans, D A., Britton, T C., Dorow, R L., Dellaria, J F *J Am Chem Soc* 1966, 108, 6395
Evans, D A., Britton, T C., Dorow, R L., Dellaria, J F *Tetrahedron* 1988, 44, 5525

Схема 3 Gut, J., Hesoun, D., Novacek, A *Coll Czech Chem Comm* 1966, 31, 2014
Miura, K., Ikeda, M., Kondo, T., Setogawa, K *Chem Abstr* 1962, 56 4767b
Pankaskie, M., Abdel-Monem, M M

J Pharm Sci 1980, 69, 1000

Схема 4 Lee, K., Kim, S., Um, H., *Synthesis* 1989, 638
Reddy, T I., Bhawal, B M., Rajappa, S *Tetrahedron* 1993, 49, 2101

Методы отбора *in vivo* и *in vitro*

Следующие экспериментальные процедуры являются конкретными примерами, в которых описывается получение ряда соединений этого изобретения.

ПРИМЕР 1 [2-(аминоиминометил)гидразин]-уксусная кислота

Этилгидразинацетата гидрохлорид (7,73г, 50 ммоль) омыляли с помощью нагревания в колбе с обратным холодильником в 100 мл 1N NaOH в течение 2 часов. Затем к горячему раствору добавляли сульфат 2-метил-2-тиопсевдомочевин (6,95г, 50 ммоль) и раствор нагревали в колбе с обратным холодильником дополнительно в течение 2 часов. Смесь концентрировали до ~1/2 объема, во время чего осаждалось более твердое вещество. Раствор охлаждали и фильтровали с получением 3,34г белого твердого вещества. Перекристаллизация из воды давала 2,41г (36%) [2-(аминоиминометил)гидразин]-уксусной кислоты в виде белого твердого вещества с высокой концентрацией Т пл 247 - 248°C (разл.), ^1H ЯМР (D_2O) δ 3,40 (s, 2H)

ПРИМЕР 2 Моногидрохлорид [2-(аминоиминометил)гидразин]-уксусной кислоты

К перемешиваемому раствору моногидрата монохлорида [(аминоиминометил)гидразон]-уксусной кислоты (10г, 60 ммоль) в метаноле (300 мл) добавляли 10% Pd-C (0,25г) и смесь гидрогенизировали при давлении 206,7 10^5 н/м^2 (30 фунт/дюйм²). Смесь фильтровали и растворитель выпаривали до сухости. Остаток перекристаллизовывали из EtOH с получением 4,2г (42%) вещества, названного в заголовке, в виде белого твердого вещества (т пл 163 - 165°C) ^1H ЯМР (D_2O) δ 3,68 (с, 2H)

ПРИМЕР 3 [2-(аминоиминометил)гидразин]-уксусной кислоты фенилметилового эфира моногидрохлорид

HCl (г) пропускали через суспензию [2-(аминоиминометил)гидразин]-уксусной кислоты (2,00г, 15,2 ммоль) в бензиловом спирте (30 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение примерно часа до тех пор пока все не перейдет в раствор. Неочищенный продукт осаждали путем добавления Et_2O . Это вещество перекристаллизовывали из MeOH/EtOAc с получением монохлорида фенилметилового эфира [2-(аминоиминометил)гидразин]-уксусной кислоты (3,20г, 82%) в виде твердого кристаллического вещества

Т пл 162 - 164°C

^1H ЯМР (CD_3OD) δ 3,69 (с, 2H), 5,24 (с, 2H), 7,34 - 7,42 (м, 5H)

ПРИМЕР 4 α -гидразинбензолпропановая кислота

Раствор ЛДА (50 мл 1,5M раствора в ТГФ) в 250 мл безводного ТГФ охлаждали до -78°C. К этому раствору по каплям добавляли раствор этилгидроциннамата (12,0 мл, 68,2 ммоль) в 250 мл безводного ТГФ. Раствор перемешивали при -78°C в течение 30 мин. Затем по каплям добавляли раствор ди-трет-бутилазикарбоксилата (18,64г,

81,8 ммоль) в 100мл безводного ТГФ. Через 10мин реакцию останавливали путем добавления 14мл НОАс и давая нагреться до комнатной температуры. Смесь разделяли между Et₂O и водой. Водный слой экстрагировали Et₂O (3 x 100мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (2 x 100мл) и рассолом (1 x 100мл), сушили сульфатом натрия и конденсировали. Неочищенный продукт подвергали хроматографии на двуокиси кремния (90/10 гексан/EtOAc) с получением 15,33г (55%) бис-БОК-защитного гидразинового эфира. Эфир собирали в 200мл CH₂Cl₂. К этому раствору добавляли 120мл тифторуксусной кислоты. Смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. После удаления растворителя неочищенный продукт собирали в 75мл 1N NaOH и нагревали в колбе с обратным холодильником в течение 2 часов. Раствор охлаждали, экстрагировали Et₂O, нейтрализовали, конденсировали до половины объема, охлаждали и фильтровали. Полученное коричневатое твердое вещество перемешивали в кипящем 1-PrOH в течение 5мин для удаления окрашенных примесей. Фильтрация и высушивание давали 3,35г (27%) α-гидразинбензолпропановой кислоты в виде белого твердого вещества.

Т пл 198 - 201°C (разл.) ¹H ЯМР (D₂O) δ 7,41 - 7,29 (м, 5H), 3,89 (дд, J = 7,6Гц, 1H), 3,23 - 3,08 (м, 2H).

ПРИМЕР 5 Моногидрат α-[2-(аминоиминометил)гидразин]бензолпропановой кислоты

Раствор α-гидразинбензолпропановой кислоты (3,00г, 16,7 ммоль) и сульфата 2-метил-2-тиопсевдомочевина (2,55г, 18,3 ммоль) в 17мл 1N NaOH нагревали до кипения в колбе с обратным холодильником в течение 2 часов. Смесь нейтрализовали 3N HCl и концентрировали до тех пор, пока не начиналось осаждение (примерно, 1/2 объема). Неочищенный продукт фильтровали и перекристаллизовывали из воды с получением 1,81г (49%) моногидрата α-[2-(аминоиминометил)гидразин]бензолпропановой кислоты.

Т пл 127 - 130°C (разл.) ¹H ЯМР (D₂O) δ 7,40 - 7,27 (м, 5H), 3,60 (дд, J = 8,6Гц, 1H), 3,04 (дд, J = 14,8Гц, 1H), 2,86 (дд, J = 14,8Гц, 1H).

2-[2-(Аминоиминометил)гидразин]пропановая кислота

Смесь 10,0г (55,4 ммоль) гидрохлорида 2-[(аминоиминометил)гидразин]пропановой кислоты (J Pharmaceut Sci 1980, 69, 1000 - 1004), 1,5г 10% паппадия на угле и 300мл дистиллированной воды встряхивали при давлении водорода 344,5 10³н/м² (50фунт/дюйм²) в течение 16 часов при 25°C. Смесь фильтровали. К фильтрату добавляли 75г сильно кислотной катионообменной смолы Dowex IR118Н в водородной форме. Смесь перемешивали 1 час и затем смесь фильтровали. Смола промывали три раза 150мл порциями дистиллированной воды. Объединенный фильтрат и промывные воды отбрасывали и смолу промывали пятью 200мл порциями 20% (объем/объем) пиридина в дистиллированной воде. Эти промывные воды объединяли и растворитель выпаривали при пониженном давлении (25°C, 1 торр). Полученный белый порошок растворяли в 30мл

кипящей в колбе с обратным холодильником дистиллированной воды и полученный раствор разбавляли 90мл горячего абсолютного спирта. Смесь давали охладиться до 25°C и через 24 часа осадок, который при этом образовывался, собирали фильтрованием. Твердое вещество сушили (20 торр/50°C/24 часа) с получением 3,8г вещества, названного в заголовке, в виде белого твердого вещества, т пл 239 - 241°C.

ПРИМЕР 6 Моногидробромид [1-(аминоиминометил)гидразин]уксусной кислоты

К перемешиваемой суспензии бикарбоната аминоганидина (100г, 734 ммоль) в воде (200мл) добавляли бромуксусную кислоту (100г, 720 ммоль). После первоначального вспенивания гомогенный раствор нагревали в колбе с обратным холодильником в течение ночи, охлаждали до комнатной температуры и растворитель выпаривали до сухости. Остаток суспендировали в EtOH (200мл) и диспергировали с помощью ультразвука. Твердое вещество отфильтровывали с получением 13,6г (9%) вещества, названного в заголовке, в виде белого твердого вещества (т пл 163 - 165°C). ¹H ЯМР (D₂O) δ 4,25 (с, 2H).

ПРИМЕР 7 3-[[имино[(1-метилэтилиден)гидразин]метил]амино]пропановая кислота

β-аланин (6,00г, 67,5 ммоль) растворяли в 67,5мл 1 N NaOH. К этому раствору добавляли гидройодид N-амино-5-метилизотиомочевина (15,89г, 67,5 ммоль). Смесь нагревали до кипения в колбе с обратным холодильником в течение 1,5 часов. Растворитель удаляли. Неочищенный продукт собирали в примерно 50мл воды и добавляли 50мл ацетона. Удаление растворителя давало оранжевое твердое вещество, которое подвергали хроматографии на двуокиси кремния (80/20 CHCl₃/MeOH, затем 60/40 CHCl₃/MeOH) с получением 5,88г (47%) 3-[[имино[(1-метилэтилиден)гидразин]метил]амино]пропановой кислоты в виде бледно-оранжевого твердого вещества. Т пл - 125°C (разл.) ¹H ЯМР (D₂O) δ 3,36 (т, J = 6Гц, 2H), 2,35 (т, J = 6Гц, 2H), 1,87 (с, 3H), 1,80 (с, 3H).

ПРИМЕР 8 M-(гидразиниминометил)-β-аланин 3-[[имино[(1-метилэтилиден)гидразин]метил]амино]пропановую кислоту (5,88г, 31,61 ммоль) растворяли в 125мл воды и нагревали при 60°C в течение 72час. Растворитель выпаривали и продукт перемешивали в смеси 4:1 EtOH и MeOH. Полученный бледно-оранжевый осадок отфильтровывали, промывали этанолом и сушили с получением 3,16г (68%) N-(гидразиниминометил)-β-аланина в виде бледно-оранжевого твердого вещества. Т пл 177 - 179°C. ¹H ЯМР (D₂O) δ 3,39 (т, J = 6Гц, 2H), 2,42 (т, J = 6Гц, 2H).

ПРИМЕР 9 N-(дигидразинметил)-1-аланин К суспензии L-аланина (10,0г, 0,11 моль) и триэтиламина (33,5мл, 0,24 моль) в EtOH (90мл) и H₂O (6мл) добавляли дисульфид углерода (7,2мл, 0,12 моль). После перемешивания в течение ночи к желтому раствору добавляли метилйодид (7,5мл, 0,12 моль). Смесь перемешивали в течение 1 часа и концентрировали до густой суспензии. Остаток растворяли в H₂O (25мл) и добавляли HCl до кислой реакции. Смесь экстрагировали Et₂O (3 x 100мл) и органическую фазу сушили

(MgSO₄) и концентрировали с получением 18,4г (93%) соответствующего дитиокарбамата в виде бледно-желтого твердого вещества с хорошей чистотой. Аналитически чистый образец получали путем перекристаллизации из Et₂O/гексана т пл 90 - 92°C, ¹H ЯМР (D₂O) δ 4,89 (кв, J = 7Гц, 1H), 2,59 (с, 3H), 1,52 (д, J = 7Гц, 3H).

К раствору дитиокарбамата (5,0г, 28 ммоль) в метилхлориде (50мл) при 0°C добавляли метилтрифторметансульфонат (3,5мл, 31 ммоль). Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 20 часов. Смесь концентрировали под пониженным давлением до получения бесцветного масла. Полученное масло растворяли в H₂O (5мл) и добавляли 1,0M NaOH (28 ммоль). Смесь экстрагировали EtOAc (3 x 100мл) и органическую фазу сушили (MgSO₄). После фильтрации растворитель удаляли под вакуумом с получением густого вязкого масла. Это масло растворяли в абсолютном EtOH (25мл) и добавляли безводный гидразин (4,4мл, 0,14 моля). Смесь перемешивали в течение 1,5 часа и твердое вещество (2,5), которое при этом образовывалось, собирали путем фильтрации. Белый порошок дополнительно очищали путем кристаллизации из H₂O/ИФК с получением 2,2г (49%) диамида гуанидина в виде белого порошка т пл 174 - 176°C (разд.), ¹H ЯМР (D₂O) δ 3,69 (кв, J = 7Гц, 1H), 1,20 (д, J = 7Гц, 3H).

ПРИМЕР 10 N-(дигидразинметил)-β-аланин

С помощью процедуры, аналогичной примененной для получения N-(дигидразинметил)-1-аланина, β-аланин превращали в N-(дигидразинметил)-β-аланин (т пл 192°C, разд.) ¹H ЯМР (D₂O) 3,40 (т, 2H, J = 7Гц), 2,48 (т, 2H, J = 7Гц).

ПРИМЕР 11 N-(дигидразинметил)-глицин

Раствор метилированного тиокарбогидрида (25,0г, 101 ммоль) и глицина (6,314г, 83,98 ммоль) в воде (50мл) и 12,5 N NaOH (8,89мл, 111 ммоль) перемешивали в атмосфере азота при 75 - 80°C в течение 3 часов. Раствор охлаждали на льду, в то время как он все еще находился в атмосфере азота, перед добавлением порциями абсолютного этанола (550мл 50мл порциями), перемешивая после каждого добавления до тех пор, пока не завершалось осаждение. Затем смесь перемешивали в течение 15 минут при 0°C перед фильтрованием. Собранное твердое вещество тщательно промывали абсолютным спиртом. Высушивание давало легкий розовый порошок (8,04г). Неочищенное твердое вещество растворяли в воде (30мл), фильтровали для удаления некоторого количества тонко измельченного нерастворимого вещества и затем разводили до объема, равного 250мл, абсолютным этанолом. Осаждение начиналось почти сразу же и ускорялось с помощью обработки ультразвуком в течение нескольких секунд. После стояния при комнатной температуре в течение 10мин смесь фильтровали с получением бледно-розового порошка (5,25г, 42%, т пл 200°C, разд.) ¹H ЯМР (D₂O) 3,78 (с).

ПРИМЕР 12 [2-гидразиниминометил]гидразинуксусная кислота

Этилгидразинацетата гидрохлорид (9,28г, 60 ммоль) омыляли путем нагревания в колбе с обратным холодильником в 120мл 1 N NaOH в течение

2 часов. К горячему раствору затем добавляли гидройодид N-амино-S-метилизотиомочевина (13,98г, 80 ммоль) и раствор нагревали в колбе с обратным холодильником дополнительно в течение 2 часов. Растворитель удаляли. Неочищенный продукт растворяли в метаноле и фильтровали для удаления NaCl. Фильтрат конденсировали и сушили при высоком вакууме. Остаток затем перемешивали со 150мл MeOH в течение ночи. Полученное белое твердое вещество отфильтровывали. Это твердое вещество затем кипятили в колбе с обратным холодильником в 100мл MeOH в течение 2 часов для удаления загрязняющих примесей. Затем смесь охлаждали и фильтровали. Полученное твердое вещество сушили под вакуумом с получением 2,14г (24%) [2-гидразиниминометил]гидразинуксусной кислоты в виде не совсем белого твердого вещества. Т пл 201 - 203°C (разд.) ¹H ЯМР (D₂O) δ 3,39 (с, 2H).

ПРИМЕР 13 N-(дигидразинметил)-D-аланин

К суспензии D-аланина (1,8г, 20 ммоль) и триэтиламина (6,1мл, 44 ммоль) в EtOH (15мл) и H₂O (1мл) добавляли дисульфид углерода (1,3мл, 22 ммоль). После перемешивания в течение ночи к желтому раствору добавляли метилиодид (1,4мл, 22 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1 часа и концентрировали до густой взвеси. Остаток растворяли в H₂O и добавляли концентрированную HCl до кислой реакции раствора. Смесь экстрагировали метил-т-бутиловым эфиром (3 x 50мл) и органическую фазу сушили (MgSO₄) и концентрировали с получением желтого масла, которое с помощью обработки ультразвуком и добавления небольшого количества гексана превращалось в твердое вещество. При дальнейшем высушивании получали 2,9г желтого твердого вещества. Продукт дополнительно очищали путем перекристаллизации (EtO₂/гексан) с получением 1,67г (47%) соединения, идентифицированного как соединение А из таблицы 9, в виде кремового твердого вещества т пл 89 - 91°C, ¹H ЯМР (D₂O) δ 4,67 (ср, 1H), 2,39 (с, 3H), 1,32 (д, J = 7,0Гц, 3H).

К раствору дитиокарбамата соединения А из таблицы 9 (15,1г, 84,3 ммоль) в метилхлориде (170мл) при 0°C добавляли метилтрифторметансульфонат (10,5мл, 92,7 ммоль). Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 20 часов. Смесь концентрировали при пониженном давлении до бесцветного масла. Полученное масло растворяли в H₂O (40мл) и добавляли 1,0M NaOH (84,3 ммоль). Смесь экстрагировали EtOAc (3 x 200мл) и органическую фазу сушили (MgSO₄). После фильтрации растворитель удаляли под вакуумом с получением густого вязкого масла. Масло растворяли в абсолютном EtOH (85мл) и добавляли безводный гидразин (13,2мл, 0,42 моля). Смесь перемешивали в течение 1,5 часов и образовавшееся твердое вещество (7,5г) собирали фильтрованием. Белый порошок дополнительно очищали путем перекристаллизации из H₂O/ИФК с получением 6,48г (48%) соединения, названного в заголовке, в виде белого порошка т пл 175 - 177°C, ¹H ЯМР (D₂O) δ 3,69 (кв, J = 7,0Гц, 1H), 1,20 (д, J = 7Гц, 3H).

ПРИМЕР 14 N-(дигидразинметил)-валин

К суспензии L-валина (5,0г, 42,7 ммоль) и три-

этиламина (13,1мл, 93,9 ммоль) в EtOH (30мл) и H₂O (2мл) добавляли дисульфид углерода (2, мл, 47,0 ммоль). После перемешивания в течение ночи к желтому раствору добавляли метилиодид (2,9мл, 47,0 ммоль). Микстуру перемешивали в течение 2 часов и концентрировали до густой взвеси. Остаток растворяли в H₂O (10мл) и добавляли концентрированную HCl до кислой реакции раствора. Смесь экстрагировали Et₂O (3 x 100мл) и органическую фазу сушили (MgSO₄) и концентрировали с получением желтого масла, которое после внесения затравки давало желтое твердое вещество. Твердое вещество суспендировали в гексане и фильтровали с получением 7,7г соединения В из таблицы 9, в виде не совсем белого твердого вещества. Фильтрат охлаждали до 0°C с получением второй порции, равной 0,27г соединения В из таблицы 9 (7,97г всего, 90%) в виде белого твердого вещества т.пл 76 - 78°C, ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 5,30 (м, 1H), 2,40 (м, 1H), 1,08 (д, J = 7,0Гц, 3H), 1,04 (д, J = 7,0Гц, 3H).

К раствору соединения В из таблицы 9 (8,0г, 38,6 ммоль) в метилхлориде (60мл) при 0°C добавляли метилтрифторметансульфонат (4,8мл, 42,5ммоль). Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 20 часов. Смесь концентрировали под пониженным давлением до бесцветного масла. Полученное масло растворяли в H₂O (10мл) и добавляли 1,0M NaOH (38,6мл). Смесь экстрагировали EtOAc (3 x 100мл) и органическую фазу сушили (MgSO₄). После фильтрации растворитель удаляли под вакуумом с получением густого вязкого масла. Масло растворяли в изопропиловом спирте (150мл) и добавляли моногидрат гидразина (9,4мл, 0,19 моль). Смесь перемешивали в течение 2 часов и добавляли ТГФ, что давало в результате более фильтруемое твердое вещество. Фильтрация давала 2,4г (33%) соединения, указанного в заголовке, в виде слегка гигроскопичного белого твердого вещества т.пл 112 - 116°C, ¹H ЯМР (D₂O) δ 3,70 (д, J = 5,0Гц, 1H), 2,20 (м, 1H), 0,97 (д, J = 7,0Гц, 3H), 0,94 (д, J = 7,0Гц, 3H).

ПРИМЕР 15 [1-(аминогидразонметил)гидразин]уксусная кислота

(Пожалуйста, обратитесь к схеме 5)

ПОЛУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЯ 9

К перемешиваемой суспензии гидрохлорида этилгидразинацетата (5,0г, 32,34 ммоль) и N-метилморфолина (3,26г, 32,34 ммоль) добавляли при 0°C твердый N-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимид (8,06г, 32,34 ммоль). Смеси давали нагреться до комнатной температуры в течение ночи и растворитель удаляли под вакуумом. Остаток суспендировали между EtOAc/H₂O, слои встряхивали, органические вещества отделяли и сушили над Na₂SO₄. Растворитель удаляли и остаток хроматографировали с помощью тонкослойной хроматографии на SiO₂ (элюент гексан/EtOAc) с получением 5,7г (70%) вещества заголовка в виде белого твердого вещества, т.пл 95 - 97°C. Остаток при последующих реакциях очищали путем перекристаллизации из EtOAc/гексана с получением вещества, названного в заголовке со слегка более низким выходом. ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,27 (т, J = 7,0Гц, 3H), 3,86 (с, 2H), 4,19 (кв, J = 7,0Гц, 2H),

5,13 (с, 2H), 6,77 (уш с, 1H), 7,33 (м, 5H)

ПОЛУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЯ 10

К перемешиваемой суспензии препарата 9 (3,0г, 11,89 ммоль) в EtOH (30мл) при комнатной температуре добавляли водный раствор NaOH (1N, 11,89мл). К смеси дополнительно добавляли H₂O (10мл) и перемешивали в течение 1 часа (смесь становилась гомогенным раствором, а затем осаждалось твердое вещество). Затем добавляли водный раствор HCl (1 N, 11,89мл), этанол удаляли под вакуумом и водный раствор экстрагировали с помощью EtOAc (2 x 100мл). Органические слои объединяли, сушили над Na₂SO₄ и растворитель удаляли с получением 2,31г (87%) вещества заголовка в виде белого твердого вещества т.пл 131 - 133°C ¹H ЯМР (CD₃OD) δ 3,59 (с, 2H), 5,15 (с, 2H), 7,37 (м, 5H).

ПОЛУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЯ 11

К перемешиваемой суспензии препарата 10 (25,44г, 112,7 ммоль) в EtOAc (500мл) добавляли триметилсилилизотиоцианат (14,79г, 112,7 ммоль) и смесь нагревали при легком нагревании (80°C) в колбе с обратным холодильником в течение ночи. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры и промывали H₂O (2 x 100мл). Органический слой отделяли, сушили над Na₂SO₄ и растворитель выпаривали до сухости. Маслянистый остаток растворяли в CH₂Cl₂ и оставляли стоять при комнатной температуре на 3 минуты, на срок, во время которого образуется твердое вещество. Твердое вещество отфильтровывали, промывали CH₂Cl₂ (100мл) и сушили под вакуумом. Твердое вещество суспендировали в горячем EtOAc (300мл), чтобы растворить какое-то количество серы, связанной с побочными продуктами, и растирали с гексаном (200мл) с получением 17,1г вещества заголовка (53%) в виде белого твердого вещества т.пл 148 - 149°C ¹H ЯМР (CD₃OD) δ 5,20 (с, 2H), 7,30 (м, 5H) оставшиеся CH₂ не наблюдаются.

ПОЛУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЯ 12

К перемешиваемому раствору препарата 11 (5,0г, 17,64 ммоль) в EtOH (15 мл) при комнатной температуре добавляли метилиодид (2,73г, 19,41 ммоль) и полученный раствор перемешивали в течение ночи. Растворитель удаляли под вакуумом с получением 7,50г (количеств) вещества заголовка в виде желтой пены. ¹H ЯМР (CD₃OD) δ 2,69 (ушир, с, 8 H), 2,84 (ушир с, 0,4H), 4,40 - 4,70 (м, 2H), 5,31 (ушир с, 2H), 7,46 (м, 5H).

ПОЛУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЯ 13

К энергично перемешиваемому раствору препарата 12 (25,5г, 60 ммоль) в H₂O (100мл) при комнатной температуре медленно добавляли гидразина гидрат (6,06г, 120 ммоль), до тех пор, пока не будет добавлена 1/2 К образовавшейся твердой массе добавляли H₂O (10мл) и твердое вещество разбивали механически с помощью шпателя. Затем добавляли оставшийся гидразин и раствор энергично перемешивали в течение 1 часа. Гетерогенную смесь обрабатывали ультразвуком и перемешивание продолжали до тех пор, пока не образовывалась густая масса. Добавляли EtOH (50мл), твердое вещество отфильтровывали, промывали EtOH и сушили под вакуумом с получением 9,24г (55%) вещества, названного в

заголовке, в виде белого твердого вещества, т. пл 168 - 170°C ^1H ЯМР (D_2O) δ 3,86 (ушир с, 1H), 4,21 (ушир с, 1H), 5,17 (с, 2H), 7,39 (с 5H)

[1-(гидразиниметил)гидразин]уксусная кислота

К раствору препарата 13 (9,20г, 32,71 ммоль) в $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (400мл, ~2,1 объем/объем) добавляли 10% Pd-C (1,0г) и смесь гидрогенизировали при 206,7 $10^3\text{H}/\text{M}^2$ (30фунтов/дюйм 2) в течение 4 часов. Катализатор отфильтровывали через диатомовую землю и снова добавляли 10% Pd-C (1,0г). Смесь гидрогенизировали при 206,7 $10^3\text{H}/\text{M}^2$ (30фунтов/дюйм 2) в течение 2,5 часов и определяли завершение гидрогенизации с помощью ТСХ (элюент $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HCO}_2\text{H}$ 85/14/1). Смесь фильтровали через диатомовую землю и растворитель удаляли до ~50мл, и в это время осаждалось твердое вещество. Твердое вещество отфильтровывали, промывали минимальным количеством H_2O и сушили под вакуумом с получением 3,60г (75%) соединения, названного в заголовке, в виде не совсем белого твердого вещества. Т. пл 196 - 198°C. Вторую порцию получали путем концентрации фильтрата до образования твердого вещества. Фильтрование давало дополнительно 0,90г (19%, общий выход 94%) вещества, имеющего идентичную температуру плавления. ^1H ЯМР (D_2O) δ 4,06 (с, 2H)

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИСПЫТАНИЕ

Соединения этого изобретения были испытаны на их способность снижать уровень глюкозы в крови и вес тела следующим образом.

Мыши ККАу служат моделями ИНСД и ожирения на грызунах (Chang, Wyse, Copeland, Peterson and Ledbetter, 1986). Образец крови до лечения получали из ретроорбитального синуса, и мышей распределяли на группы по 6 животных, так что средний уровень глюкозы в крови до лечения был в среднем одинаковым во всех группах. Испытуемые соединения смешивали с пищей до концентрации 0,5%, и мышам давали потреблять пищу по желанию. Контрольные мыши получали питание без добавок. В день 0 мышей взвешивали и давали контрольную пищу или пищу с добавкой испытуемых соединений. Через 3 дня после потребления контрольной пищи или пищи с добавками испытуемых соединений получали образец крови для определения концентрации глюкозы, и животных взвешивали для определения потери веса. Потребление пищи определяли путем взвешивания корма, предоставленного в начале испытания, и остатка корма в конце испытания. Потребление корма рассчитывали путем вычитания веса остатка из веса предоставленного корма. Потребление лекарства рассчитывали путем умножения потребления пищи на 0,5%. С использованием этого метода определено, что прием лекарства составил примерно 500мг/кг/сутки. Данные по уровню глюкозы в крови представлены в виде средней концентрации глюкозы в крови в испытуемой группе, деленной на средний уровень глюкозы в крови в контрольной группе (лечившаяся/контрольная или Л/К). Соединения, дающие в результате Л/К значения, равные или менее 0,90 считаются активными противогликемическими средствами. Данные по потере веса выражены в

виде процента изменения веса тела. Соединения, дающие в результате снижение на 1% или более по сравнению с контролем веса тела через три дня, считаются активными средствами против ожирения.

ТАБЛИЦА 1

Родственные соединения этого изобретения	
5	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ <p>Acetic acid, [2-(аминиметил)гидразин]уксусная кислота</p>
10	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} + \text{HCl}$ <p>Acetic acid, [2-(аминиметил)гидразин]уксусная кислота, моногидрохлорид</p>
15	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ <p>Glycine, N-(гидразиниметил)-глицин</p>
20	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} + 0,5 \text{ HCl}$ <p>Glycine, N-(гидразиниметил)-гидрохлорид (2:1)</p>
25	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{N}(\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH})-\text{NH}_2$ <p>N-(Dihydrazinomethylene) glycine N-(дигидразинметил)-глицин</p>
30	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ <p>Acetic acid, [2-(гидразиниметил)гидразин]уксусная кислота</p>
35	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{N}(\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH})-\text{NH}_2$ <p>[1-(гидразиниметил)гидразин]уксусная кислота</p>

ТАБЛИЦА 2

Родственные неактивные соединения, которые не заявлены	
5	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{N}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} + 0,5 \text{ H}_2\text{SO}_4$ <p>Acetic acid, [(аминиметил)метилгидразон] сульфат (2:1) [1-(аминиметил)гидразон]уксусная кислота, сульфат (2:1)</p>
10	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{N}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ <p>Acetic acid, [(аминиметил)метилгидразон]уксусная кислота</p>
15	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{N}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ <p>Acetic acid, [(аминиметил)метилгидразон]уксусная кислота</p>
	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{N}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ <p>Acetic acid, [(аминиметил)метилгидразон]уксусная кислота</p>
	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{N}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ <p>Acetic acid, [(аминиметил)метилгидразон]уксусная кислота</p>

ТАБЛИЦА 3

Реактивные включения к объекту изобретения

5	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Propanoic acid, 3-[1-(aminomethyl)hydrazono]
10	<chem>CC(=O)OCC(=N)N</chem>	3-[1-(аминоминнометил)-гидразин]- Пропановая кислота,
15	<chem>CC(=O)OCC(=N)N</chem>	Butanoic acid, 2-[2-(aminomethyl)hydrazono]
20	<chem>CC(=O)OCC(=N)N</chem>	2-[2-(аминоминнометил)-гидразин]- Бутановая кислота,
25	<chem>CC(=O)OCC(=N)N</chem>	Butanoic acid, 4-[hydrazinomethylamino]
30	<chem>CC(=O)OCC(=N)N</chem>	4-[гидразиниминнометил]- Бутановая кислота,

ТАБЛИЦА 4

Конкретно заявляемые соединения этого изобретения

5	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Acetic acid, 2-(aminomethyl)hydrazono
10	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	[2-(аминоминнометил)гидразин]- уксусная кислота, Acetic acid, 1-(aminomethyl)hydrazono monohydrochloride
15	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	[2-(аминоминнометил)гидразин]- уксусная кислота, моногидрохлорид
20	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Acetic acid, 2-(aminomethyl)hydrazono, phenylmethyl ester, monohydrochloride
25	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	[2-(аминоминнометил)гидразин]- уксусная кислота, бензилметилэфир, моногидрохлорид
30	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Benzenepropanoic acid alpha-(2-(aminomethyl)hydrazono) monohydrate
35	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	альфа-[2-(аминоминнометил)гидразин]- бензойлпропановая кислота, моногидрат
40	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Acetic acid, 1-(aminomethyl)hydrazono, monohydrobromide
45	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	[1-(аминоминнометил)гидразин]- уксусная кислота, моногидробромид
50	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	B-Alanine N-(hydrazinomethyl)- N-(гидразиниминнометил)- β-аланин,

ТАБЛИЦА 4 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

5	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	N-(Dihydrazinomethylamino)glycine N-дигидразиниминнометил-глицин
10	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Acetic acid, 2-(hydrazinomethyl)hydrazono
15	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Acetic acid, 2-(гидразиниминнометил)- уксусная кислота,
20	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	B-Alanine N-(dihydrazinomethylamino)- N-(дигидразиниминнометил)- β-аланин,
25	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	L-Alanine N-(dihydrazinomethylamino)- N-(дигидразиниминнометил)- L-аланин,
30	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	N-(dihydrazinomethylamino)-D-alanine N-(дигидразиниминнометил)-D-аланин
35	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	N-(dihydrazinomethylamino)-valine N-(дигидразиниминнометил)- валин

ТАБЛИЦА 5

известные соединения, указанные для лечения: HCl

5	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Acetic acid (aminomethyl hydrazono) monohydrochloride, monohydrate
10	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	[1-(аминоминнометил)гидразин]- уксусная кислота, моногидробромид
15	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Propanoic acid, 2-(aminomethyl)hydrazono, monohydrochloride
20	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	2-[2-(аминоминнометил)гидразин]- пропановая кислота, моногидробромид
25	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Butanoic acid, 2-(aminomethyl)hydrazono monohydrochloride
30	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	2-[2-(аминоминнометил)гидразин]- бутановая кислота, моногидробромид
35	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Glycine, N-(hydrazinomethyl)- hydrochloride (2:1) N-(гидразиниминнометил)- глицин, гидрохлорид
40	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Benzenepropanoic acid α-(aminomethyl)hydrazono
45	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	α-[2-(аминоминнометил)гидразин]- бензойлпропановая кислота,
50	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	Octanoic acid, 2-(aminomethyl)hydrazono monohydrochloride
55	<chem>NC(=N)NCC(=O)O</chem>	α-[2-(аминоминнометил)гидразин]- октановая кислота, моногидробромид

ТАБЛИЦА 6

Доза-ответ в отношении гипергликемии и ожирения у мышей ККАу с помощью перорального введения N-(дигидразинметил)-глицина

Мышей ККАу лечили N-(дигидразинметил)-глицином, как описано выше, за исключением того, что соединение примешивали к корму в количестве 0,03, 0,06, 0,10, 0,20, 0,30 и 0,40%, так чтобы суточные дозы составили примерно 30, 60, 100, 300 и 400 мг/кг. Контрольные мыши получали корм без добавок. Для сравнения с N-(дигидразинметил)-глицином давали 3-гуанидинпропионовую кислоту (3-ГПК) в виде 0,5% примеси к корму (примерная доза 500 мг/кг/сутки). Данные представлены в виде процентного изменения концентрации глюкозы в крови и веса тела на 3-й день по сравнению с 1-ым днем испытания. Средние значения \pm СКО для $n = 6$ мышей/группу. Статистическое значение определяли с помощью анализа дисперсии с использованием программного обеспечения JMP 3.0.2 (SAS Institute) *, $P < 0,05$ при сравнении с нулем, \square значительно меньше, чем 3-ГПК ($P < 0,05$).

Добавка	% Изменения уровня глюкозы в крови в	% Изменения веса тела
Нет (0)	- 5,8 \pm 7,1	- 0,71 \pm 0,65
N-(дигидразинметил)-глицин 0,03%	- 13,5 \pm 10,5	- 0,92 \pm 0,35
N-(дигидразинметил)-глицин 0,06%	- 34,9 \pm 17,1*	- 1,51 \pm 2,11
N-(дигидразинметил)-глицин 0,10%	- 45,2 \pm 6,4*	- 4,04 \pm 0,76*
N-(дигидразинметил)-глицин 0,2%	- 69,9 \pm 3,2*, \square	- 8,22 \pm 1,05*
N-(дигидразинметил)-глицин 0,3%	- 70,4 \pm 1,5*, \square	- 9,94 \pm 1,62*, \square
N-(дигидразинметил)-глицин 0,4%	- 70,3 \pm 3,9*, \square	- 10,3 \pm 0,97*, \square
0,5% 3-ГПК	- 38,4 \pm 4,4*	- 5,4 \pm 0,81*

*, $P < 0,05$ по сравнению с нулем

\square , значительно меньше, чем 3-ГПК ($P < 0,05$)

ТАБЛИЦА 7

Улучшение толерантности к глюкозе при внутрибрюшинном введении

Толерантность к глюкозе определяли у мышей без диабета C57BL и мышей с диабетом ККАу. Животным вводили перорально через зонд дистиллированную воду (контроль) или 100 мг/кг N-(дигидразинметил)-глицина, затем их не кормили в течение 16 - 17 часов. Образцы крови для определения концентрации глюкозы получали из ретроорбитального синуса. Образцы отбирали непосредственно перед введением 2 г/кг глюкозы в/в (время = 0) и через 30, 60 и 90 минут после инъекции. Уровень глюкозы в крови определяли используя автоанализатор на глюкозу. Данные выражали как среднее значение \pm СКО для группы из 5 - 6 мышей. Статистическое значение определяли с помощью анализа дисперсии с использованием программного обеспечения JMP 3.0.2 (SAS Institute) *, $P < 0,05$ при сравнении с контролем.

Линия мышей	Группа	Время (мин)	Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
C57BL	Контрольная	0	143 \pm 8
		30	233 \pm 14
		60	240 \pm 8
		90	226 \pm 9
	N-(дигидразинметил)-глицина	0	114 \pm 9*
ККАу	Контрольная	30	174 \pm 17*
		60	153 \pm 7*
		90	161 \pm 19*
		0	188 \pm 43
	N-(дигидразинметил)-глицина	30	467 \pm 10
		60	469 \pm 20
		90	486 \pm 26
		0	115 \pm 16
		($P = 0,12$ при сравнении с контр.)	
		30	383 \pm 38*

60	396 \pm 63
90	392 \pm 67

ТАБЛИЦА 8

Подавление неферментативного гликозирования белков

Неферментативное гликозирование белков определяли, используя общепринятые методы (Dolhofer and Wieland, 1979; Khatami, Suldani, David, Li and Rocky, 1988). Включение ^{14}C -D-глюкозы в человеческий сывороточный альбумин определяли путем растворения человеческого сывороточного альбумина (Sigma Chemical Co.), ^{14}C -D-глюкозы и глюкозы в физиологическом растворе соли и инкубирования при 37°C в течение 8 дней. Испытуемые соединения добавляли к раствору в концентрации 19,1 мМ. Гликозирование альбумина определяли путем осаждения белка с помощью 1 объема 12% трихлоруксусной кислоты, центрифугирования и промывания осадка дважды 6% трихлоруксусной кислотой с центрифугированием после каждого промывания. Промытый осадок солюбилизировали, добавляли сцинтиллирующее вещество, и включение радиомеченной глюкозы определяли путем подсчета сцинтилляций в жидкости. Данные выражены в процентах ^{14}C -D-глюкозы, включенной в альбумин (среднее из 2 измерений). Статистическое значение определяли с помощью анализа дисперсии с использованием программного обеспечения JMP 3.0/2 (SAS Institute).

Добавленное вещество	% включенной ^{14}C -D-глюкозы
Контроль	1,50
Аминогуанидин	0,96 ($P < 0,05$ при сравнении с контролем)
3-Гуанидинпропионовая кислота	1,52

N-(дигидразинметилен)-
глицин

N-(дигидразинметилен)-
глицин

Моногидрохлорид уксус-
ной кислоты

0,81 (P < 0,05 при
сравнении с контро-
лем)

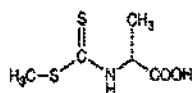
1,21 (P < 0,05 при
сравнении с контро-
лем)

1,29 (P < 0,10 при
сравнении с контро-
лем)

ТАБЛИЦА 9

Промежуточные соединения

5

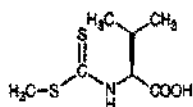


Compound A

Соединение А

10

15



Compound B

Соединение В

СХЕМА 1

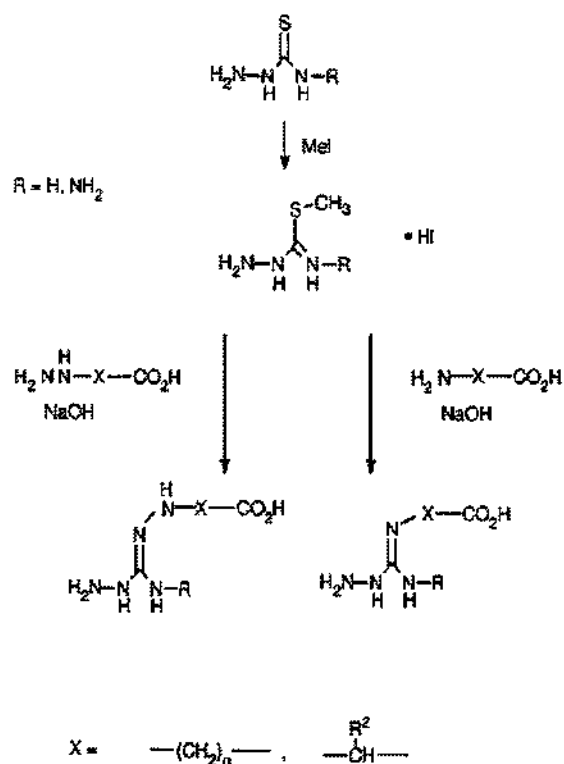


СХЕМА 2

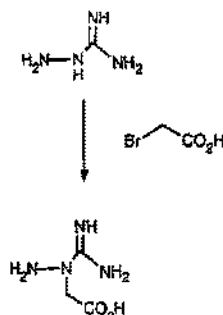


СХЕМА 3

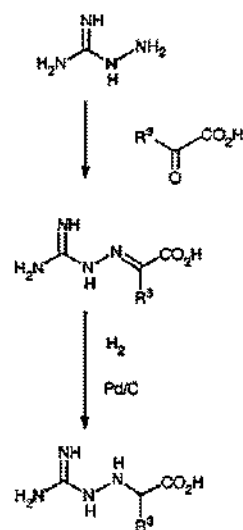


СХЕМА 4

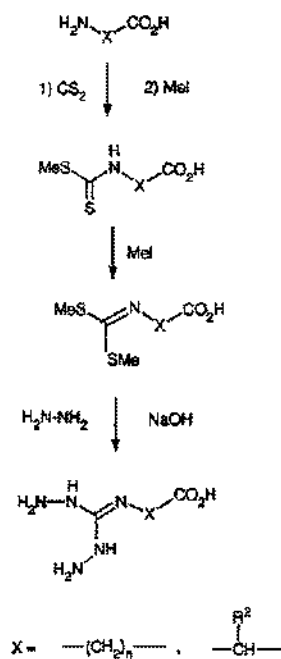


СХЕМА 5

