



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 974 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 1572/91

(22) A bejelentés napja: 1991. 05. 10.

(30) Elsőbbségi adatok:

P 40 15 255.3 1990. 05. 12. DE

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 31/16

A 61 P 9/10

A 61 P 37/06

(40) A közzététel napja: 1991. 12. 30.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 05. 29.

(72) Feltalálók:

dr. Baader, Ekkehard, Königstein/Taunus (DE)

dr. Burghard, Harald, Schmitt (DE)

dr. Günzler-Pukall, Volkmar,

Marburg-Cappel (DE)

(73) Szabadalmas:

Hoechst AG, Frankfurt/Main (DE)

(74) Képvisező:

Topor Gáborné, DANUBIA Szabadalmi és

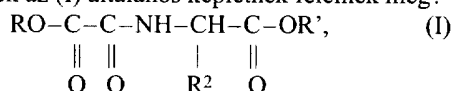
Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) Eljárás hatóanyagként oxalil-aminosav-származékokat tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás oxalil-aminosav-származékokat tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására.

A vegyületek az (I) általános képletnek felelnek meg:



amelyben

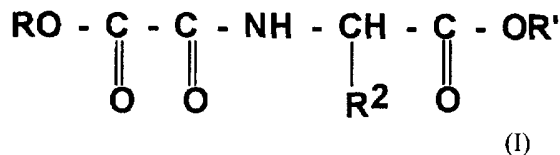
R jelentése hidrogénatom, 1–6 szénatomos alkilcsoport vagy fémkation,

R' jelentése hidrogénatom, 1–6 szénatomos alkilcsoport vagy fémkation és

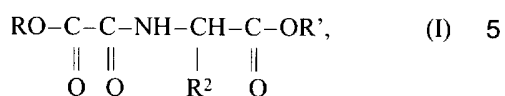
R² jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport.

A gyógyszert úgy állítják elő, hogy egy ismert módon előállított (I) általános képletű oxalil-aminosav-

származékokat – az (I) általános képletben R, R' és R² jelentése a fenti – a gyógyszergyártásban szokásos hordozó- és egyéb segédanyagokkal összekeverik és gyógyszerkészítménnyé alakítják. A vegyületek a prolin- és a lizin-hidroxiláz enzimek inhibitorai.



A találmány oxalil-aminosav-származékokat tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására vonatkozik. Az oxalil-aminosav-származékok az (I) általános képletnek felelnek meg



amelyben

R jelentése hidrogénatom, 1–6 szénatomos alkilcsoport vagy fémkation,

R' jelentése hidrogénatom, 1–6 szénatomos alkilcsoport vagy fémkation és

R² jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport.

A fenti vegyületek a 2 010 601 számú francia szabadalmi leírásból ismertek mint gyógyászatiilag hatásos vegyületek intermedierjei, de gyógyszerkénti alkalmazásukat a technika állása nem ismerteti.

A fenti vegyületek, valamint lényegében tiszta D és L formáik és e vegyületek fiziológiailag elviselhető sóik a prolin- és a lizin-hidroxiláz enzimek inhibitorai.

A találmány szerinti eljárásra jellemző, hogy egy ismert módon előállított (I) általános képletű oxalil-aminosav-származékot – az (I) általános képletben R, R' és R² jelentése a fenti – a gyógyszergyártásban szokásos hordozó- és egyéb segédanyagokkal összekeverünk és gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

Az (I) általános képletű vegyületek előállítása ismert, például a 2 010 601 számú francia szabadalmi leírásból. A legegyszerűbb előállítási mód, ha 1–3 egyenérték aminosav-észter-hidrogén-halogenidet, előnyösen hidrokloridot és 1–5 egyenérték bázist, így karbonátot vagy hidrogén-karbonátot, például nátrium- vagy kálium-karbonátot vagy nátrium- vagy kálium-hidrogén-karbonátot, vagy tercier amint, így trietil-amint, tributil-amint, etil-diizopropil-amint, vagy heterociklusos amint, így N-alkilmorfolint, piridint, kinolint vagy dialkilamilint reagáltatunk egymással. Több bázist egyszerre is alkalmazhatunk. A reakció-hőmérséklet –30 °C és 150 °C közötti, előnyösen 20 °C és 100 °C közötti. Adott esetben oldószeres közegben is lefolytathatjuk a reagáltatást. Oldószerként az alábbiakat alkalmazhatjuk: dietil-éter, dimetoxi-etán vagy tetrahydrofurán, klórozott szénhidrogének, így diklór-metán, kloroform, tri- vagy tetraclór-etán, benzol, toluol, vagy poláros oldószerek, például dimetilformamid, alkoholok, így metanol vagy etanol, vagy dimetil-szulfoxid. Utána –78 °C és 100 °C közötti, előnyösen –20 °C és +20 °C közötti hőmérsékleten lassan 1–3 egyenérték oxálsav-észter-kloridot adunk az elegyhez. Adott esetben itt is a fent megnevezett oldószerek valamelyikét használhatjuk. A reakció végét például vékonyréteg-kromatográfias módszerrel állapíthatjuk meg.

A reakcióelegy feldolgozása például extrahálással vagy (például kovasavgélen végzett) kromatográfias eljárással történhet. Az elkülönített terméket átkristályosíthatjuk.

Az R és/vagy R' helyén alkálifématomot, például nátrium- vagy káliumatomot tartalmazó I általános képletű vegyületeket az R és/vagy R' helyén (1)–4 szénatomos alkoxicsoportot tartalmazó (I) általános képletű ve-

gyületekből elszappanosítással állíthatjuk elő például oly módon, hogy az észtert kis szénatomszámú alkoholban, így metanolban vagy etanolban, vagy valamely éterben, például dimetoxi-etánban vagy tetrahydrofuránban, adott esetben víz jelenlétében nátrium- vagy kálium-hidroxiddal kezeljük. A kapott só alkálifém-kationját az oldat megsavanyítása után ioncserélő gyantán a szokásos módon tetszőleges kationra cserélhetjük. Ehhez a savat kationcserélő gyantával (például polisztirol/divinilbenzol bázisú ioncserélő, mint amilyen az Amberlite CG-150 vagy Dowex-CCR-2) töltött oszlopon keresztülcselezünk. A kationcserélő gyanta a kívánt kationt, például primer, szekunder vagy tercier aminből felszabaduló ammóniumiont tartalmazza kötött formában. A kívánt sót az eluátum bepárlása útján különítjük el. Primer, szekunder vagy tercier amintól leszármaztatható savakat úgy is előállíthatjuk, hogy a szabad sav alkoholos oldatához a megfelelő amin ekvimoláris mennyiségét adjuk, majd az oldószert elpárologtassuk.

A vegyületek lényegében enantiomer-tiszta D vagy L formáját a racemátból az irodalomból ismert módon állíthatjuk elő, például frakcionált kristályosítással vagy enzimes feldolgozással. Egy másik lehetőség abban áll, hogy az enantiomer-tiszta vegyületet közvetlenül a megfelelő D vagy L formájú kiindulási anyagokból szintetizáljuk.

Az (I) általános képletű vegyületek a prolil-hidroxilázt visszafordítható módon gátolják, így szelektív gátlást fejtenek ki a kollagénre fajlagos hidroxilező reakcióra is, amelynek során proteinben kötött prolin a prolil-hidroxiláz enzim révén hidroxileződik. E reakció elnyomása eredményeként működésképtelen, alulhidroxilezett kollagénmolekula képződik, amelyet a sejt csak kis mennyiségben tud kijuttatni a sejten kívüli térbe. Emellett az alulhidroxilezett kollagén nem képes beépülni a kollagénmátrixba és könnyen proteolitikus bomlást szenved. E hatások következményeképpen a sejten kívüli terekben lerakódott kollagén össz mennyisége csökken. Ezért a prolil-hidroxiláz inhibitorai alkalmas eszközök az olyan megbetegedések terápiájában, amelyek kórképéhez a kollagén lerakódásai lényegesen hozzájárulnak. Ide tartoznak például a tüdő, máj és bőr (szkleroderma) fibrózai, valamint az ateroszklerózis.

Ismert továbbá, hogy a prolil-hidroxiláz ismert inhibitorokkal (például α, α -dipiridillel) végzett gátlása a makrofágok Clq-bioszintézisét is gátolja [W. Müller és munkatársai, FEBS Lett., 90, 218. oldaltól kezdve (1978)]. Ez a komplementaktivitás klasszikus útjának a kieséséhez vezet; a prolil-hidroxiláz inhibitorai ezért immunszuppresszor hatással is rendelkeznek, például immunkomplex betegségek esetén.

Az (I) általános képletű vegyületek tehát fibroszuppresszorként, immunszuppresszorként és antiateroszklerotikumként alkalmazhatók.

Az antifibrotikus hatást a szén-tetrakloriddal kiváltott májfibrozis modelljén tanulmányozhatjuk. Patkányokat hetente kétszer szén-tetrakloriddal (1 ml/kg, olívaolajban oldva) kezelünk. A vizsgálni kívánt vegyületet, fiziológiailag elviselhető oldószerben oldva egyszer, adott esetben kétszer naponta adjuk po. vagy intra-

peritoneálisan. A májfibrózis mértékét hisztológiai módszerrel megállapítjuk, és a májban lévő kollagén mennyiségét hidroxiprolinos meghatározással [Kivirikko és munkatársai, *Anal. Biochem.*, 19, 249 (1967)] meghatározzuk. A fibrogenézis aktivitását a szérumban lévő kollagénfragmensek és prokollagén-peptidek radioimmunológiai meghatározásával mérhetjük. Ebben a modellben az (I) általános képletű vegyületek 1–100 mg/kg dózisban mutatnak hatást. Egy másik modell a hatás felmérésére a bleomicinnel kiváltott tüdőfibrózis [Kelley és munkatársai, *J. Lab. Clin. Med.*, 96, 954 (1980)]. Az (I) általános képletű vegyületeknek a granulációs szövetre kifejtett hatása a vattacsomóval előidézett granuloma segítségével mérhető fel [Meier és munkatársai, *Experimentia*, 6, 469 (1950)].

Az alábbiakban a találmányt példákkal közelebbről ismertetjük.

Példák

Az 1–5. példákban szereplő vegyületek előállításának általános előírása

Egy egyenértéknyi aminosav-észter-hidrokloridot, két egyenértéknyi trietil-amint és 2 egyenértéknyi N,N-dimetil-amino-piridint szobahőmérsékleten, nitrogéngáz légkör alatt diklór-metánban oldunk, majd 0–10 °C-on lassan hozzácepegtetjük egy egyenértéknyi oxálsav-észter-klorid diklór-metános oldatát. Az elegyet szobahőmérsékleten 12 órán át keverjük, utána telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal extraháljuk. A szerves fázist elválasztjuk, NaCl-oldattal mossuk, magnézium-sulfáttal szárítjuk és végül bepároljuk. A nyersterméket kromatografáljuk.

1. példa

(N-Oxalil)-L-alanin-dimetil-észter

$R=R'=CH_3$; $R^2=CH_3$

5 g L-alanin-metil-észter-hidrokloridból és 3,3 ml oxálsav-metil-észter-kloridból 6 g cím szerinti vegyületet nyerünk olaj alakjában (kromatogr. EA/CH₃OH 5:1).

2. példa

(N-Oxalil)-L-fenil-alanin-dimetil-észter

$R=R'=CH_3$; $R^2=CH_2C_6H_5$

5 g L-fenil-alanin-metil-észter-hidrokloridból és 2,2 ml oxálsav-metil-észter-kloridból 6,5 g cím szerinti vegyületet nyerünk olaj alakjában (kromatogr. EA/CH₃OH 5:1).

3. példa

(N-Oxalil)-L-glicin-dimetil-észter

$R=R'=CH_3$; $R^2=H$

15 g L-glicin-metil-észter-hidrokloridból és 11 ml oxálsav-monometil-észter-kloridból 23 g cím szerinti vegyületet nyerünk (kromatogr. EA), olvadáspont: 49 °C.

4. példa

(N-Oxalil)-L-valin-dimetil-észter

$R=R'=CH_3$; $R^2=-CH(CH_3)_2$

2 g L-valin-metil-észter-hidrokloridból és 2,8 g oxálsav-monometil-észter-kloridból 2 g cím szerinti ve-

gyületet nyerünk olaj alakjában (kromatogr. CH/EA 1:1).

5. példa

(N-Oxalil)-L-cisztein-dimetil-észter

$R=R'=CH_3$; $R^2=CH_2SH$

2 g L-cisztein-metil-észter-hidrokloridból és 3,9 g oxálsav-monometil-észter-kloridból 1,5 g cím szerinti vegyületet nyerünk olaj alakjában (kromatogr. CH/EA 1:1).

Az 1–5. példákban szereplő vegyületek előállításának általános előírása

Az 1–5. példák szerinti vegyületek egy egyenértékű két szobahőmérsékleten 2 egyenértékű 0,1 N alkoholos nátrium-hidroxid-oldatban oldjuk. Az oldatot szobahőmérsékleten 12 órán át keverjük, majd bepároljuk. A maradékot toluollal kétszer újra bepároljuk, pentánal többszörösen mossuk, majd nagyvákuumban szárítjuk.

6. példa

(N-Oxalil)-L-alanin-dikáliumsó

$R=R'=K$; $R^1=H$; $R^2=H_3$

Az 1. példa szerinti vegyület 300 mg-ját 32,5 ml 0,1 N etanos kálium-hidroxid-oldattal reagáltatjuk. Hozam: 370 mg fehér kristályok, olvadáspont: >300 °C.

7. példa

(N-Oxalil)-L-fenil-alanin-dinátriumsó

$R=R'=Na$; $R^2=CH_2C_6H_5$

A 2. példa szerinti vegyület 420 mg-ját 32,5 ml 0,1 N metanos nátrium-hidroxid-oldattal reagáltatjuk. Hozam: 440 mg fehér kristályok, olvadáspont: >300 °C.

8. példa

(N-Oxalil)-L-glicin-dikáliumsó

$R=R'=K$; $R^2=H$

A 3. példa szerinti vegyület 5,5 g-ját 314 ml 0,1 N metanos kálium-hidroxid-oldattal reagáltatjuk. Hozam: 5,4 g fehér kristályok, olvadáspont: >300 °C.

9. példa

(N-Oxalil)-L-valin-dinátriumsó

$R=R'=Na$; $R^2=CH(CH_3)_2$

A 4. példa szerinti vegyület 300 mg-ját 14 ml 0,1 N etanos nátrium-hidroxid-oldattal reagáltatjuk. Hozam: 235 mg fehér kristályok, olvadáspont: >300 °C.

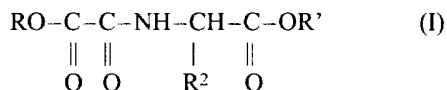
10. példa

(N-Oxalil)-L-cisztein-dinátriumsó

$R=R'=Na$; $R^2=CH_2SH$

Az 5. példa szerinti vegyület 300 mg-ját 13,7 ml 0,1 N metanos nátrium-hidroxid-oldattal reagáltatjuk. Hozam: 300 mg fehér kristályok, olvadáspont: >300 °C.

Az alábbiakban az 1–10. példák szerinti vegyületeket táblázatban foglaljuk össze.



1. táblázat

Példa	R	R'	R ¹	R ²	Olvadáspont/olaj
1.	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	olaj
2.	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ C ₆ H ₅	olaj
3.	CH ₃	CH ₃	H	H	49 °C
4.	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₃) ₂	olaj
5.	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ SH	olaj
6.	K	K	H	CH ₃	>300 °C
7.	Na	Na	H	CH ₂ C ₆ H ₅	>300 °C
8.	K	K	H	H	>300 °C
9.	Na	Na	H	CH(CH ₃) ₂	>300 °C
10.	Na	Na	H	CH ₂ SH	>300 °C

Az (I) általános képletű vegyületek enzimgátló hatását B. Peterkofsky és R. DiBlasio módszerével [Anal. Biochem., 66, 279–286 (1975)] enzimtesztel határoztuk meg. A teszt szerint alulhidroxilezett kollagén prolil-hidroxilázsal vas(II)ionok, α-ketoglutarát és aszkorbát jelenlétében enzimesen hidroxilezünk, és az (I) általános képletű vegyületeknek azt a koncentrációját határozzuk meg, amely az enzimaktivitást 80%-kal csökkenti (K_i-érték). A 2. táblázatban a 6. és 8. példa szerinti vegyület gátlóértékét adjuk meg.

2. táblázat (sók)

Vegyület	K _i [mmol]
6. példa szerinti	0,04
8. példa szerinti	0,04

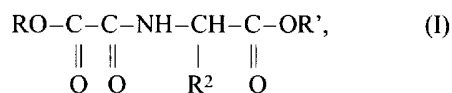
A gátló hatást sejt- vagy szövetkultúrában is mérhetjük. Ehhez fibroblasztokat vagy egyéb, kollagén termelő sejteket, illetve kalváriákat vagy egyéb, kollagén termelő szerkeket használhatunk. A 3. táblázatban két (I) általános képletű vegyület kalváriatenyésztésben mért gátló hatását, azt a koncentrációt adjuk meg, amely ¹⁴C-prolinnal végzett metabolás jelzés mellett a hidroxiprolin/prolin arányt 50%-kal csökkenti (IC₅₀).

3. táblázat (észterek)

Vegyület	IC ₅₀ [mmol]
1. példa szerinti	0,35
3. példa szerinti	0,002

SZABADALMI IGÉNYPONT

Eljárás (I) általános képletű oxalil-aminosav-származékokat tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására



amelyek képletében

R jelentése hidrogénatom, 1–6 szénatomos alkilcsoport vagy fémkation,

R' jelentése hidrogénatom, 1–6 szénatomos alkilcsoport vagy fémkation és

R² jelentése hidrogénatom vagy 1–6 szénatomos alkilcsoport,

azzal jellemezve, hogy egy ismert módon előállított (I) általános képletű oxalil-aminosav-származékok – az (I) általános képletben R, R' és R² jelentése a fenti – a gyógyszergyártásban szokásos hordozó- és egyéb segédanyagokkal összekeverünk és gyógyszerkészítményé alakítunk.