



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) 174852

(13) B

(51) Int Cl⁵ C 07 K 5/02, C 07 D 213/81, 401/12,
A 61 K 31/44, 37/64

Styret for det industrielle rettsvern

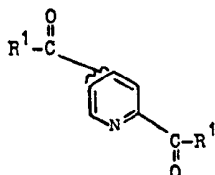
(21) Søknadsnr	880557	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	09.02.88	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	09.02.88	(30) Prioritet	10.02.87, DE, 3703962
(41) Alm. tilgj.	11.08.88		
(44) Utlegningsdato	11.04.94		

(71) Patentsøker Hoechst AG, D-65926 Frankfurt am Main, DE
(72) Oppfinner Dietrich Brocks, Wiesbaden, DE
Harald Burghard, Schmitten, DE
Volkmar Günzler, Marburg-Cappel, DE
Hartmut Hanauske-Abel, Dexheim, DE
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) Benevnelse **Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive pyridin 2,4- og 2,5-dikarboksytsyrederivater**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag Pyridin-2,4- og -2,5-dikarboksytsyrederivater av formel (I)



(I)

hvor

R¹ står for over N-terminalen bundet α-aminosyre eller α-aminosyrealkylester eller α-aminosyreamid eller α-aminosyrealkyl- eller -dialkylamid, hvorved de nevnte alkylrestene oppviser 1 til 4 C-atomer og eventuelt er monosubstituert med fenyl og hvorved C₃- og C₄-alkylrestene også kan være forgrenede eller

R¹ står for N-terminalt bundet di- eller tripeptid, er beskrevet. Det er videre angitt en fremgangsmåte for fremstilling av disse forbindelsene, samt avendelse av forbindelsene, spesielt i legemidler for påvirkning av stoffskifte for kollagen og kollagenlignende stoffer, henholdsvis biosyntesen av Cl_q.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremstilling av terapeutisk aktive pyridin-2,4- og 2,5-dikarboksytsyrederivater.

5 Forbindelser som inhiberer prolin- og lysinhydroksylasen bevirker en meget effektiv hemning av kollagenbiosyntesen ved påvirkning av de kollagen-spesifikke hydroksyleringsreaksjonene. Under deres forløp hydroksyleres proteinbundet prolin ved enzymet prolin- henholdsvis lysinhydroksylase. Dersom denne reaksjonen hindres ved hjelp av inhibitorer, så oppstår
10 et ikke-funksjonsdyktig, underhydroksylert kollagenmolekyl som bare kan avgis av cellen i liten mengde i det ekstracellulære rommet. Det underhydroksylerte kollagenet kan videre ikke bygges inn i kollagenmatriksen og nedbrytes meget lett proteolytisk. Som en følge av denne effekten reduseres
15 den samlede mengden av det ekstracellulært lagrede kollagenet.

Det er kjent at inhiberingen av prolinhydroksylase ved hjelp av kjente inhibitorer, som α,α' -dipyridyl, fører til en
20 hemning av $C1_q$ -biosyntesen av makrofager (W. Müller et al., FEBS Lett. 90 (1978), 218; Immunobiology 155 (1978) 47). Dette medfører et utfall av den klassiske vegen for komplementaktivering. Inhibitorer for prolinhydroksylasen virker følgelig også som immunsuppressiva, f.eks. ved immunkomplekssykdommer.

25 Det er kjent at prolinhydroksylase hemmes effektivt av pyridin-2,4- og 2,5-dikarboksytsyre (K. Mayama et al., Eur. J. Biochem. 138 (1984) 239-245). Disse forbindelsene er imidlertid bare virksomme som hemmende stoffer i meget høye konsentrasjoner i cellekulturen (V. Günsler et al. Collagen og Re. Research 3, 71 1983).

30 I DE-A 34 32 094 beskrives pyridin-2,4- og -2,5-dikarboksyldiestere med 1-6 C-atomer i esteralkyldelen som legemiddel for inhibering av prolin- og lysinhydroksylasen.

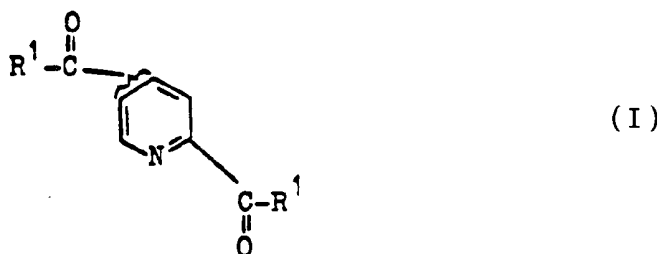
Disse lavalkylerte diesterne har imidlertid den ulempen at de for fort nedbrytes i organismen til syrer og ikke når virkestedet i cellen i tilstrekkelig høy konsentrasjon, og er følgelig mindre egnet for en eventuell administrering som legemiddel.

Overraskende er det nå funnet at α -aminosyre-, α -aminosyre-ester, di- eller tripeptid-derivatene av pyridin-2,4- og -2,5-dikarboksylsyre er utmerkede hemmestoffer for kollagenbiosyntesen i dyremodell.

Det egentlige virksomme stoffet, pyridin-2,4- eller 2,5-dikarboksylsyre oppstår først ved hydrolyse av α -aminosyre-, α -aminosyreester-, di- eller tripeptid-derivatene i cellen. α -aminosyre-, α -aminosyreester-, di- eller tripeptid-derivatene kan på grunn av deres høyere lipofili og det faktum at de under transporten overraskende bare hydrolyseres meget langsomt, transporteres inn i cellene. Først her settes det egentlige virkestoffet, pyridin-2,4- eller -2,5-dikarboksylsyre, fri.

Oppfinnelsen vedrører følgelig fremstilling av:

Pyridin-2,4- eller -2,5-dikarboksylsyrederivater av formel I



hvor

R^1 er $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^2)-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^3$,

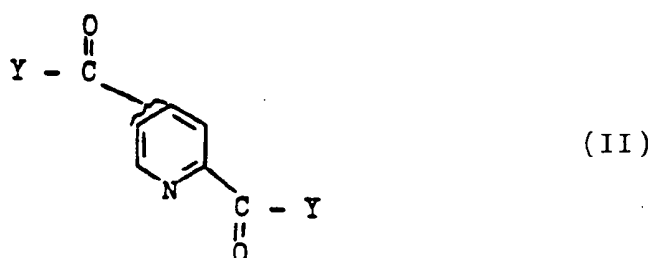
hvor

R^2 er laverealkyl som eventuelt er substituert med fenyl eller 3-indolyl og

R^3 er laverealkyl eller benzyl,

samt deres fysiologisk tålbare salter.

Pyridin-2,4- eller -2,5-dikarboksylsyrederivatene av formel I fremstilles ifølge oppfinnelsen ved at man omsetter en
5 forbindelse av formel II,



med en forbindelse av formel III



hvorved R^1 har de ved formel I angitte betydningene og Y står for halogen eller hydroksy eller danner sammen med karbonylgruppen en aktiv ester eller et anhydrid og hvorved
20 for det tilfellet at R^1 er et over N-terminalen bundet di- eller tripeptid, de tilstedeværende frie karboksyfunksjonene eventuelt er beskyttede og hvorved disse eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgruppene etter omsetningen avspaltes hydrolytisk eller hydrogenolytisk under dannelse av den frie
25 karboksyfunksjonen, og reaksjonsproduktene overføres generelt til fysiologisk tålbare salter.

I det følgende beskrives fremstillingen av forbindelser av formel I og fremstillingen av de for dette formålet påkrevde
30 utgangsstoffene nærmere - så fremt de ikke er handelsvare.

Som temporære karboksylbeskyttelsesgrupper er esterbeskyttelsesgrupper egnede, disse finner også anvendelse innen peptidsyntesen (kfr. f.eks. Kontakte Merck 3/79, side 15 og
35 19 ff). Ofte anvender man metyl-, benzyl- eller tert.-butylestere, videre ONbz1, OMbz1, OPic. Avspaltningen foregår avhengig av beskyttelsesgruppene ved sur eller alkalisk

hydrolyse eller ved hydrering i nærvær av en overgangsmetall-katalysator (Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", bind E5, side 496-504, fjerde utgave, 1985).

5 Fremstillingen av forbindelser med formel I foregår enklest ved at begge komponentene, pyridinderivatet av formel II og α -aminosyre henholdsvis α -aminosyrederivatet av formel III blandes i ekvimolare mengder eller med et inntil 5-gangers
10 overskudd av III, og omsettes ved temperaturer mellom -30 til 150°C , fortrinnsvis ved 20 til 100°C inntil reaksjonen er avsluttet. Avslutningen av reaksjonen kan bestemmes ved
tynnsljikt-skromatografi (DC-kontroll). En variant av denne fremgangsmåten består i at man arbeider i egnede oppløsnings-
15 midler, som dietyleter eller dimetoksyetan eller tetrahydrofuran, klorerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, tri- eller tetrakloretylen, benzen, toluen eller også polare
oppløsningsmidler som dimetylformamid eller aceton eller dimetylsulfoksyd. Også her kan det anvendes et overskudd av
20 α -aminosyre, henholdsvis α -aminosyrederivat av formel III, som kan utgjøre inntil den 5-dobbelte mengden. Reaksjonstemperaturen ligger mellom romtemperatur og kokepunktet for
oppløsningsmidlet, hvorved temperaturer i området fra romtemperatur til 130°C er spesielt foretrukne.

25 Eventuelt kan omsetningen også foregå i nærvær av baser. Som ytterligere baser kommer uorganiske syrefangere som karbonater eller hydrogenkarbonater, f.eks. natrium- eller kaliumkarbonat eller natrium- eller kaliumhydrogenkarbonat, eller organiske syrefangere som tertiære aminer, som
30 trietylamin, tributylamin, etyldiisopropylamin eller heterocykliske aminer som N-alkylmorfolin, pyridin, kinolin eller dialkylanilin i betraktning.

Fortrinnsvis foregår omsetningen av forbindelsene av formel
35 II med α -aminosyrene henholdsvis α -aminosyrederivatene av formel III under tilsats av et vannavspaltende middel som dialkylkarbodiimid, hvorved alkylrestene kan oppvise 1 til 8

C-atomer, som i tilfelle C₃-C₈-forbindelser også kan være forgrenede eller cykliske; fortrinnsvis anvendes dicykloheksylkarbodiimid. En tilsvarende fremgangsmåte er beskrevet i Houben-Weyl, bind XV/2, side 103-11, "Methoden der Organischen Chemie", 4. opplag, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.

Eventuelt kan opparbeidelsen av produktene eksempelvis foregå ved ekstraksjon eller ved kromatografi, f.eks. over kieselgel. Det isolerte produktet kan omkrystalliseres og eventuelt omsettes med en egnet syre til et fysiologisk tålbart salt. Som egnede syrer kommer eksempelvis i betraktning: mineral-syrer, som saltsyre og bromhydrogensyre, samt svovel-, fosfor-, salpeter- eller perklorsyre eller organiske syrer som maursyre, eddiksyre, propionsyre, ravsyre, glykolsyre, melkesyre, eplesyre, vinsyre, sitronsyre, maleinsyre, fumarsyre, fenyleddiksyre, benzosyre, metansulfonsyre, toluensulfonsyre, oksalsyre, 4-aminobenzosyre, naftalin-1,5-disulfon- eller askorbinsyre.

Utgangsforbindelsene av formel II oppnås eksempelvis ved omsetning av pyridin-2,4- eller -2,5-dikarboksylsyre (II, Y=hydroksy) til det tilsvarende pyridin-2,4- eller -2,5-dikarboksylsyrehalogenidet, fortrinnsvis -kloridet (II, Y=halogen) (ved fremgangsmåter som er kjente fra litteraturen, f.eks. "Organikum, Organisch Chemisches Grundpraktikum", 15. opplag, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1976, side 595 ff), som deretter omsettes med en egnet alkohol, f.eks. paranitrobenzylalkohol til den tilsvarende aktiv-esteren (II, Y=aktivester). Tilsvarende kan pyridin-2,4- eller -2,5-dikarboksylsyre også først under tilsats av en egnet karboksylsyre eller karboksylsyreester som klormaur-syreetyler overføres til et blandes anhydrid (II, Y=anhydrid), som deretter omsettes med α -aminosyrener eller α -aminosyrederivatene til produktene med formel I. En tilsvarende fremgangsmåte er f.eks. beskrevet i Houben-Weyl,

"Methoden der Organischen Chemie", bind XV/2, side 169-183, fjerde opplag, 1974, Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Forbindelsene av formel I har verdifulle farmakologiske egenskaper og viser spesielt virksomhet som hemmere for prolin- og lysinhydroksylasen, som fibrosuppressivum og immunsuppressivum.

Aktiviteten av fibrogenasen kan bestemmes ved radioimmunologisk bestemmelse av det N-terminale propeptidet av kollagen type III eller det N- henholdsvis C-terminale tverrbindingsdomenet for kollagen type IV (7s-kollagen henholdsvis type-IV-kollagen-NC₁) i serum.

For dette formålet ble hydroksyprolin-, prokollagen-III-peptid-, 7s-kollagen- og type-IV-kollagen-NC₁-konsentrasjonen i leveren hos

a) ubehandlede rotter (kontrolldyr)

b) rotter som har tilført karbontetraklorid (CCl₄-kontroll-
dyr)

c) rotter som først var tilført CCl₄ og deretter en forbindelse fremstilt ifølge oppfinnelsen

målt (denne forsøksmetoden er beskrevet av Rouiller, C., "Experimental toxic injury of the liver"; i "The Liver", C. Rouiller, bind 2, side 335-476, New York, Academic Press, 1964).

Den farmakologiske virksomheten av stoffene fremstilt ifølge oppfinnelsen ble undersøkt; det viste seg derved en tydelig hemning av prolin- og lysinhydroksylasen.

Forbindelsene av formel I kan finne anvendelse som medikamenter i form av farmasøytiske preparater som inneholder disse, eventuelt sammen med farmasøytisk tålbare bærere. Forbindelsene kan anvendes som helbredelsesmidler, f.eks. i form av farmasøytiske preparater som inneholder disse forbindelsene i blanding med en for enteral, perkutan eller

parenteral tilførsel egnet farmasøytisk, organisk eller uorganisk bærer, som f.eks. vann, gummi arabikum, gelatin, melkesukker, stivelse, magnesiumstearat, talk, vegetabiliske oljer, polyalkylenglykoler, vaseliner osv.

5

De farmasøytiske preparatene kan foreligge i fast form, f.eks. som tabletter, drasjéer, suppositorier eller kapsler; i halvfast form, f.eks. som salver, eller i flytende form, f.eks. som oppløsninger, suspensjoner eller emulsjoner. Eventuelt er de steriliserte og/eller inneholder hjelpe-

10

stoffer, som konserverings-, stabilisering-, fukte- eller emulgeringsmidler, salter for endring av det osmotiske trykket eller buffere. De kan også inneholde andre terapeutiske virksomme stoffer.

15

I det følgende skal oppfinnelsen beskrives nærmere ved hjelp av eksempler:

Eksempler

20

1. Pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-metoksykarbonyletyl)amid
1,02 g pyridin-2,4-dikarboksylsyre-di-(4-nitrofenyl)ester oppløses i 25 ml tørr dimetylformamid og blandes med 0,69 g alaninmetylesterhydroklorid og 1,15 ml trietylamin. Det etteromrøres i to timer ved romtemperatur og får stå over natten. Reaksjonsblandingen opptas i dietyleter og vaskes fem

25

ganger med vann. Den organiske fasen tørkes med natriumsulfat og befris for oppløsningsmiddel. Resten kromatograferes over kiselgel med eddikester som elueringsmiddel. Den oljeformige resten utkrystalliseres med pentan/eter.

30

Smeltepunkt 96°C; utbytte 80 mg.

2. Pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-benzyløksykarbonyl-2-fenyl-etyl)amid

35

2,5 g pyridin-2,4-dikarboksylsyre-di-(4-nitrofenyl)ester oppløses i 70 ml tørr dimetylformamid og blandes med 3,56 g fenylalaninbenzylesterhydroklorid og 7,0 ml trietylamin. Det etteromrøres i tre timer ved romtemperatur og får stå over

natten. Reaksjonsblandingen opptas i dietyleter og vaskes fem ganger med vann. Produktet utkrystalliseres ved utristing og frasuges.

Smeltepunkt 104°C; utbytte 3,46 g.

5 3. Pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-3-metylbutyl)-amid

1,02 g pyridin-2,4-dikarboksylsyre-di-(4-nitrofenyl)ester
oppløses i 50 ml tørr dimetylformamid og blandes med 2,9 g
10 leucinbenzylestertosylat og 2 ml trietylamin. Det etterom-
røres i tre timer ved romtemperatur og får stå over natten.
Reaksjonsblandingen opptas i dietyleter og vaskes fem ganger
med vann. Den organiske fasen tørkes med natriumsulfat og
befris for oppløsningsmiddel. Resten kromatograferes over
15 kiselgel med eddikester som elueringsmiddel. Den oljeformige
resten utkrystalliseres med pentan/eter.

Smeltepunkt 82°C; utbytte 1,14 mg.

20 4. Pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-etyl)amid

0,87 g pyridin-2,4-dikarboksylsyre-di-(4-nitrofenyl)ester
oppløses i 30 ml tørr dimetylformamid og blandes med 1,5 g
alaninbenzylestertosylat og 1 ml trietylamin. Det etterom-
røres i to timer ved romtemperatur og får stå over natten.
25 Reaksjonsblandingen opptas i dietyleter og vaskes fem ganger
med vann. Den organiske fasen tørkes med natriumsulfat og
befris for oppløsningsmiddel. Resten kromatograferes over
kiselgel med toluen/eddikester i forhold 4:1 som eluerings-
middel. Den oljeformige resten utrøres med eter og frasuges.

30 Smeltepunkt 103°C; utbytte 0,5 g.

5. Pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-2-(3-indolyl)-etyl)-amid

1,02 g pyridin-2,4-dikarboksylsyre-di(4-nitrofenyl)ester
35 oppløses i 30 ml tørr dimetylformamid og blandes med 1,4 g
tryptofanbenzylester og 0,45 ml trietylamin. Det etteromrøres
i tre timer ved romtemperatur og får stå over natten.

Reaksjonsblandingen kromatograferes over kiselgel med en 4:1-blanding av toluen og eddikester som elueringsmiddel. Resten utrøres med diisopropyleter og frasuges.

Smeltepunkt 81°C; utbytte 0,9 g.

5

6. Pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-metoksykarbonyl-3-metylbutyl)-amid

10

1,5 g pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis-(4-nitrofenyl)ester omsettes analogt eksempel 1 med 1,3 g leucinmetylesterhydroklorid. Reaksjonsblandingen opparbeides som beskrevet i eksempel 1 og kromatograferes over kiselgel med en 4:1-blanding av toluen/eddikester. Etter fjernelse av oppløsningsmidlet utrøres resten med petroleumseter og frasuges. Smeltepunkt 94°C; utbytte 1,0 g.

15

7. Pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-3-metylpropyl)amid

20

1,02 g pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis-(4-nitrofenyl)ester omsettes analogt eksempel 1 med 1,97 g L-leucinbenzylester-toluen-4-sulfonat og opparbeides. Produktet kromatograferes over kiselgel med en 2:1-blanding av toluen og eddikester. Etter fjernelse av oppløsningsmidlet utrøres produktet med diisopropyleter og avsuges. Smeltepunkt 76°C; utbytte 0,38 g.

25

8. Pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-2-fenyletyl)-amid

30

1,02 g pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis-(4-nitrofenyl)ester omsettes analogt eksempel 1 med 1,5 g fenylalaninbenzylesterhydroklorid og opparbeides. Produktet kromatograferes over kiselgel med en 4:1-blanding av toluen og eddikester. Etter fjernelse av oppløsningsmidlet utrøres produktet med dietyleter, frasuges og omkrystalliseres fra litt eddikester. Smeltepunkt 142°C; utbytte 0,9 g.

35

9. Pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-2-(3-indolyl)-etyl)-amid

1,02 g pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis-(4-nitrofenyl)ester omsettes analogt eksempel 1 med 1,4 g tryptofanbenzylester.

5 Reaksjonsblandingen opptas for opparbeidelse i dietyleter og vaskes flere ganger med vann. Den organiske fasen tørkes, befris for oppløsningsmiddel og kromatograferes en gang over kiselgel med en 1,5:1-blanding av toluen og eddikester og deretter ytterligere en gang over kiselgel med en 1:1-
10 blanding av cykloheksan og eddikester.

Smeltepunkt 92°C; utbytte 0,3 g.

15

20

25

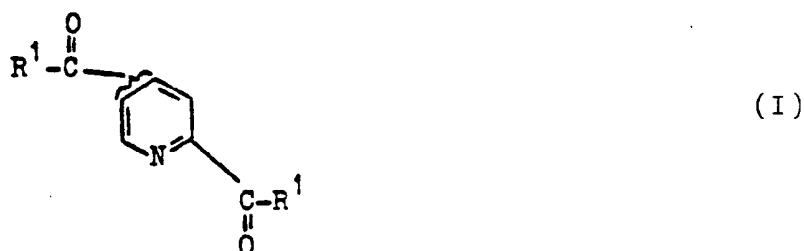
30

35

P a t e n t k r a v

1.

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive
 5 pyridin-2,4- og -2,5-dikarboksylsyrederivater av formel (I)



10 hvor

R¹ er -NH-CH(R²)-C(=O)-O-R³,

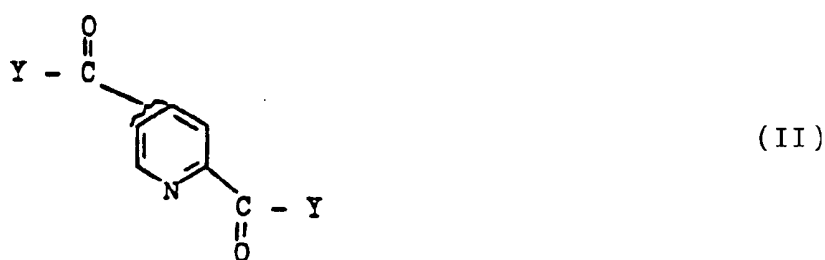
15 hvor

R² er laverealkyl som eventuelt er substituert med fenyl
 eller 3-indolyl og

R³ er laverealkyl eller benzyl,

samt deres fysiologisk tålbare salter,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d at man omsetter en
 forbindelse av formel (II)



med en forbindelse av formel (III)



35 hvorved R¹ har de ved formel (I) angitte betydningene og Y
 står for halogen eller hydroksy eller danner sammen med
 karbonylgruppen en aktiv ester eller et anhydrid og hvorved
 for det tilfellet at R¹ er et over N-terminalen bundet di-
 eller tripeptid, de tilstedeværende frie karboksyfunksjonene

eventuelt er beskyttede og hvorved disse eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgruppene etter omsetningen avspaltes hydrolytisk eller hydrogenolytisk under dannelse av den frie karboksyfunksjonen,

5 og reaksjonsproduktene overføres generelt til fysiologisk tålbare salter.

2.

10 Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-metoksykarbonyletyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

3.

15 Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-2-fenyletyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

20 4.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-3-metylbutyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

25 5.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyletyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.
30

6.

35 Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-2-(3-indolyl)-etyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

7.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,4-dikarboksylsyre-bis(1-metoksykarbonyl-3-metyl-butyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

8.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-3-metylpropyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

9.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-2-fenyletyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

10.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av pyridin-2,5-dikarboksylsyre-bis(1-benzyloksykarbonyl-2-(3-indolyl)-etyl)amid, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.