(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 35 352 T2** 2007.08.23

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 979 817 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 35 352.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP98/01300**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 910 975.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/043954**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.03.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **08.10.1998**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.02.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **26.07.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.08.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C07D 207/16*** (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
C12N 9/99 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
7478097 27.03.1997 JP

(73) Patentinhaber:
Santen Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, JP

(74) Vertreter:
Grosse, Bockhorni, Schumacher, 80687 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
MITA, Ltd., Shiro Santen Pharmaceutical Co., Osaka-shi Osaka 533-8651, JP; HORIUCHI, Ltd., Masato Santen Pharmaceutical Co., Osaka-shi Osaka 533-8651, JP; BAN, Ltd., Masakazu Santen Pharmaceutical Co., Osaka-shi Osaka 533-8651, JP; FUJIMURA, Ltd., Kenichi Santen Pharmaceutical Co., Osaka-shi Osaka 533-8651, JP; SUHARA, Ltd., Hiroshi Santen Pharmaceutical Co., Osaka-shi Osaka 533-8651, JP

(54) Bezeichnung: **INHIBITOREN DER LEUKOTRIEN A4 HYDROLASE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft Leukotrien-A_4-Hydrolase-Inhibitoren, die Mercaptoacylprolin-Derivate als Wirkstoffe enthalten, und stellt insbesondere als therapeutische Mittel für entzündliche Erkrankungen wie rheumatische Erkrankungen nützliche Arzneimittel bereit.

Stand der Technik

[0002] Leukotrien-A_4-(anschließend als LTA_4 abgekürzt)Hydrolase, die eine Epoxidhydrolase ist, ist ein metallhaltiges Enzym, das in seinem aktiven Zentrum Zink benötigt.

[0003] LTA_4-Hydrolase spielt eine katalysatorartige Rolle bei der biochemischen Umwandlung von LTA_4 in Leukotrien B_4 (anschließend abgekürzt als LTB_4), das eine stark entzündungsfördernde Substanz ist.

[0004] LTB_4 ist ein Arachidonsäuremetabolit, der auf dem 5-Lipoxygenase-Weg produziert und in verschiedenen Zellen, einschließlich beispielsweise Mastzellen, neutrophilen Zellen, Monocyten und Makrophagen, biosynthetisiert wird und eine Rolle als bedeutender Vermittler bei Entzündungen spielt. LTB_4 löst Chemotaxis, Aggregation und Degranulation von Leukocyten und die Ansammlung polymorph kerniger Leukocyten aus und beschleunigt die Blutgefäßdurchlässigkeit und Ödembildung. Aus diesem Grund ist mitgeteilt worden, dass besonders hohe LTB_4-Spiegel an verletzten Stellen bei entzündlichen Erkrankungen wie rheumatischen Erkrankungen (J. Clin. Invest., 66, 1166-1170 [1980]), Psoriasis (Br. J. Pharmacol., 83, 313-317 [1984]), entzündlichen Darmerkrankungen (Gastroenterology, 86, 453-460 [1984]) und Gicht (Lancet, 2, 1122-1124 [1982]) und im Sputum bei der cystischen Fibrose (Lancet, 342, 465-469 [1993]) nachgewiesen wurden.

[0005] Dementsprechend wird erwartet, dass Verbindungen, welche die LTA_4-Hydrolase inhibieren, die Produktion von LTB_4 verhindern und therapeutische Wirkungen auf entzündliche Erkrankungen wie rheumatische Erkrankungen aufweisen.

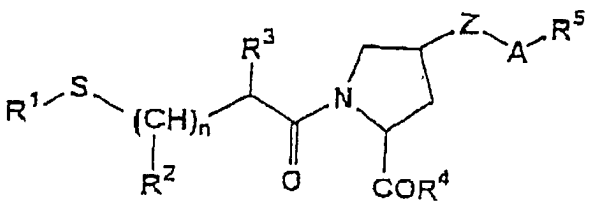
[0006] Mercaptoacylprolin-Derivate, die erfindungsgemäße Wirkstoffe sind, sind mitgeteilt im US-Patent Nr. 4 316 906 und in J. Med. Chem., 31, 875-885 (1988) als blutdrucksenkende Mittel mit inhibierenden Wirkungen auf ACE. Es wird dort jedoch nichts über inhibierende Effekte von Verbindungen mit einem Substituenten in 4-Position des Prolingerüstes dieser Mercaptoacylprolin-Derivate auf die LTA_4-Hydrolase mitgeteilt. Verbindungen mit einer (niederen Cycloalkylphenyl-)Alkylgruppe in 4-Position des Prolingerüstes sind neue Verbindungen, die in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden sind.

[0007] Wie weiter oben erwähnt, sind Mercaptoacylprolin-Derivate dafür bekannt, dass sie inhibierende Wirkungen auf ACE haben und als blutdrucksenkende Mittel nützlich sind. Es ist jedoch ein sehr interessanter Gegenstand, neue medizinische Verwendungen dieser Verbindungen aufzufinden.

[0008] Von den Erfindern ist geforscht worden, um neue medizinische Verwendungen der bekannten Mercaptoacylprolin-Derivate und von neu synthetisierten Mercaptoacylprolin-Derivaten zu finden. Im Ergebnis davon wurde festgestellt, dass diese Verbindungen ausgezeichnete inhibierende Wirkungen auf die LTA_4-Hydrolase haben.

Beschreibung der Erfindung

[0009] Die Erfindung betrifft die Verwendung von Verbindungen mit der folgenden allgemeinen Formel [I] oder Salzen davon als Wirkstoffe bei der Herstellung eines therapeutischen Mittels für entzündliche Erkrankungen oder eines therapeutischen Mittels für rheumatische Erkrankungen:

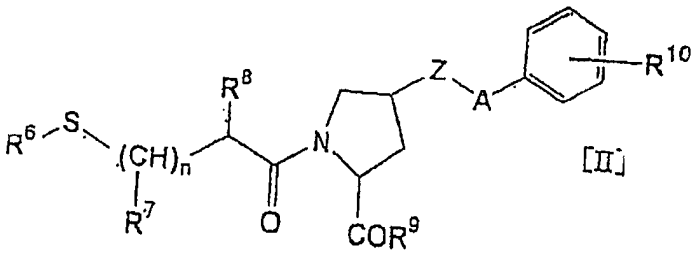


[I]

– worin R^1 ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkylgruppe, eine Phenyl-niedere Alkylgruppe, eine niedere

Alkanoylgruppe oder eine Benzoylgruppe bedeutet und jeder Phenylring der Phenyl-niederen Alkylgruppe und der Benzoylgruppe durch eine niedere Alkylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe oder ein Halogenatom substituiert sein kann,
– R^2 und R^3 jeweils ein Wasserstoffatom oder eine niedere Alkylgruppe bedeuten,
– R^4 eine Hydroxylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe, eine Phenyl-niedere Alkoxygruppe, eine Aminogruppe, eine niedere Alkylaminogruppe oder eine Phenylniedere Alkylaminogruppe,
– R^5 eine Phenylgruppe oder eine Naphthylgruppe, wobei die Phenylgruppe und die Naphthylgruppe jeweils durch eine niedere Alkylgruppe, eine niedere Cycloalkylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe, eine niedere Alkylthiogruppe oder ein Halogenatom substituiert sein kann,
– Z ein Schwefel- oder Sauerstoffatom,
– A eine niedere Alkylengruppe und
– n 0, 1 oder 2 bedeutet.

[0010] Die Erfindung betrifft auch die Verbindungen mit der Formel [II]



[II]

– worin R^6 ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkylgruppe, eine Phenyl-niedere Alkylgruppe, eine niedere Alkanoylgruppe oder eine Benzoylgruppe bedeutet und jeder Phenylring der Phenyl-niederen Alkylgruppe und der Benzoylgruppe durch eine niedere Alkylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe oder ein Halogenatom substituiert sein kann,
– R^7 und R^8 jeweils ein Wasserstoffatom oder eine niedere Alkylgruppe bedeuten,
– R^9 eine Hydroxylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe, eine Phenyl-niedere Alkoxygruppe, eine Aminogruppe, eine niedere Alkylaminogruppe oder eine Phenylniedere Alkylaminogruppe,
– R^{10} eine niedere Cycloalkylgruppe,
– Z ein Schwefel- oder Sauerstoffatom,
– A eine niedere Alkylengruppe und
– n 0, 1 oder 2 bedeutet, wobei dieselben Definitionen anschließend benutzt werden.

[0011] Die zuvor definierten Gruppen werden anschließend näher beschrieben. Niederes Alkyl bedeutet geradkettiges oder verzweigtes niederes Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen wie Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Hexyl oder Isobutyl. Niederes Alkanoyl bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkanoyl mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen wie Acetyl, Propionyl, Butyryl, Hexanoyl, Isobutyryl oder Pivaloyl. Niederes Alkoxy bedeutet geradkettiges oder verzweigtes niederes Alkoxy mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen wie Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Butoxy oder Hexyloxy. Niederes Cycloalkyl bedeutet cyclisches niederes Cycloalkyl mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen wie Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl oder Cyclooctyl. Halogenatom bedeutet Fluor, Chlor, Brom und Iod. Niederes Alkylen bedeutet geradkettiges oder verzweigtes niederes Alkylen mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen wie Methylen, Ethylen, Propylen oder Butylen.

[0012] Bevorzugte Beispiele für diese Verbindungen umfassen Folgende.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [I], worin R^1 ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkanoylgruppe oder eine Benzoylgruppe und besonders bevorzugt ein Wasserstoffatom bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [I], worin R^2 ein Wasserstoffatom oder eine niedere Alkylgruppe und besonders bevorzugt ein Wasserstoffatom bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [I], worin R^3 ein Wasserstoffatom oder eine niedere Alkylgruppe und besonders bevorzugt die Methylgruppe bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [I], worin R^4 eine Hydroxylgruppe oder eine niedere Alkoxygruppe und besonders bevorzugt die Hydroxylgruppe bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [I], worin R^5 eine Phenylgruppe oder eine Naphthylgruppe, die durch eine niedere Alkylgruppe, eine niedere Cycloalkylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe oder eine niedere Alkylthiogruppe substituiert sein kann, noch bevorzugter eine Phenylgruppe, die durch eine

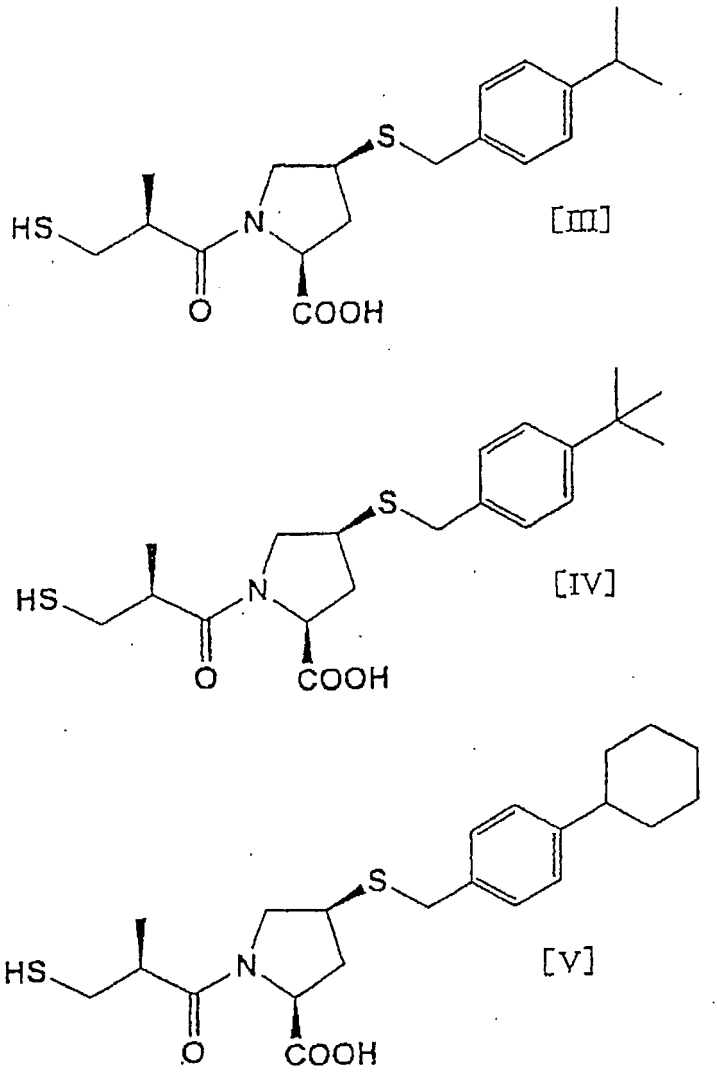
niedere Alkylgruppe oder eine niedere Cycloalkylgruppe substituiert sein kann, und besonders bevorzugt eine Phenylgruppe, die durch eine Isopropylgruppe, eine tert.-Butylgruppe oder eine Cyclohexylgruppe substituiert sein kann, bedeutet, und deren Salze.

– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [I], worin Z ein Schwefel- oder Sauerstoffatom und besonders bevorzugt ein Schwefelatom bedeutet, und deren Salze.

– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [I], worin A eine niedere Alkylengruppe und besonders bevorzugt eine Methylengruppe bedeutet, und deren Salze.

– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [I], worin n 0, 1 oder 2 und besonders bevorzugt 1 bedeutet, und deren Salze.

[0013] Spezielle Beispiele für besonders bevorzugte Verbindungen sind (4S)-4-(4-Isopropylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin, (4S)-4-(4-tert.-Butylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin und (4S)-4-(4-Cyclohexylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin, die repräsentiert werden von den folgenden Formeln [III], [IV] bzw. [V], und deren Salze.



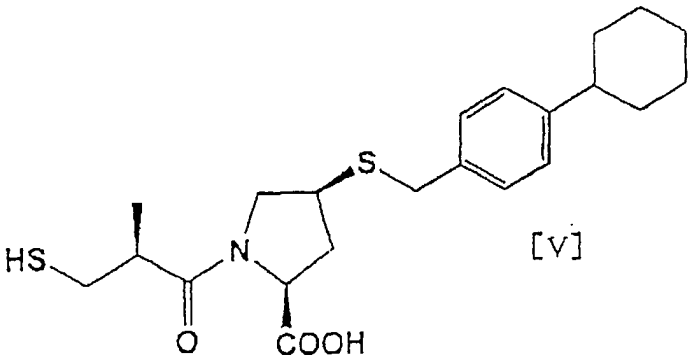
[0014] Von den von der obigen allgemeinen Formel [II] repräsentierten neuen Verbindungen werden folgende Verbindungen als bevorzugte Verbindungen exemplifiziert.

– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [II], worin R^6 ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkanoylgruppe oder eine Benzoylgruppe und besonders bevorzugt ein Wasserstoffatom bedeutet, und deren Salze.

– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [II], worin R^7 ein Wasserstoffatom oder eine niedere Alkylgruppe und besonders bevorzugt ein Wasserstoffatom bedeutet, und deren Salze.

– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [II], worin R^8 ein Wasserstoffatom oder eine niedere Alkylgruppe und besonders bevorzugt die Methylgruppe bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [II], worin R^9 eine Hydroxylgruppe oder eine niedere Alkoxygruppe und besonders bevorzugt die Hydroxylgruppe bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [II], worin R^{10} eine niedere Cycloalkylgruppe und besonders bevorzugt eine Cyclohexylgruppe bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [II], worin Z ein Schwefel- oder Sauerstoffatom und besonders bevorzugt ein Schwefelatom bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [II], worin A eine niedere Alkylengruppe und besonders bevorzugt die Methylengruppe bedeutet, und deren Salze.
– Verbindungen mit der obigen allgemeinen Formel [II], worin n 0, 1 oder 2 und besonders bevorzugt 1 bedeutet, und deren Salze.

[0015] Ein spezielles Beispiel für eine besonders bevorzugte Verbindung ist (4S)-4-(4-Cyclohexylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin, das von der folgenden Formel [V] repräsentiert wird, und dessen Salze.



[V]

[0016] Diese Salze können beliebige pharmazeutisch verträgliche Salze sein. Beispiele dafür sind Hydrochloride, Sulfate, Phosphate, Lactate, Maleate, Fumarate, Oxalate, Methansulfonate und p-Toluolsulfonate. Zusätzlich dazu umfassen die zuvor genannten Verbindungen Diastereoisomere und optische Isomere, wobei alle davon im Erfindungsumfang enthalten sind. Weiterhin können die obigen Verbindungen in Form von beispielsweise Solvaten, beispielsweise Hydraten, und Addukten mit Ethanol vorliegen.

[0017] Zur Untersuchung der Nützlichkeit der Mercaptoacylprolin-Derivate mit der allgemeinen Formel [I] (anschließend als erfindungsgemäße Verbindungen bezeichnet) wurden Untersuchungen zu den Wirkungen der erfindungsgemäßen Verbindungen auf die LTA_4-Hydrolase durchgeführt. Die Einzelheiten dazu werden in den weiter unten beschriebenen pharmakologischen Versuchen erläutert. Als Ergebnis der Untersuchungen der erfindungsgemäßen Verbindungen unter Verwendung von LTA_4 als Substrat und Messung der LTA_4-Menge, die sich durch die enzymatische Reaktion gebildet hat, als Anzeige, zeigten die erfindungsgemäßen Verbindungen eine hohe inhibierende Wirkung auf die LTA_4-Hydrolase. Dementsprechend wird erwartet, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen für die Behandlung verschiedener Erkrankungen, an welchen LTA_4 beteiligt ist, insbesondere entzündlichen Erkrankungen wie rheumatischen Erkrankungen, Psoriasis, entzündlichen Darmerkrankungen, Gicht und cystische Fibrose nützlich sein werden.

[0018] Die Ergebnisse der pharmakologischen Versuche sind solche, welche ausschließlich Verbindungen betreffen, in welchen R^1 ein Wasserstoffatom und R^4 eine Hydroxylgruppe bedeutet, so genannte aktive Verbindungen unter den Verbindungen mit der allgemeinen Formel [I]. Diese Verbindungen können jedoch selbstverständlich auch in Form von Prodrugs verabreicht werden. Dementsprechend ist es selbstverständlich, dass Verbindungen, in welchen R^1 eine Gruppe bedeutet, die in breitem Umfang als Schutzgruppe für eine Mercaptogruppe verwendet wird, das heißt eine niedere Alkylgruppe, eine Phenyl-niedere Alkylgruppe, eine niedere Alkanoylgruppe oder eine Benzoylgruppe, auch im Erfindungsumfang enthalten sind. Zusätzlich dazu wird ein Verfahren zur Umwandlung einer Carboxylgruppe in einen Ester oder ein Amid, um Prodrugs zu bilden, auch in breitem Umfang angewendet. Verbindungen, in welchen R^4 eine niedere Alkoxygruppe, eine Phenyl-niedere Alkoxygruppe, eine Aminogruppe, eine niedere Alkylaminogruppe oder eine Phenylniedere Alkylaminogruppe bedeutet, sind ebenfalls im Erfindungsumfang enthalten.

[0019] Die erfindungsgemäße Verbindung kann oral oder parenteral verabreicht werden. Beispiele für Darreichungsformen sind Tabletten, Kapseln, Körnchen, Pulver und Injektionen. Die erfindungsgemäße Verbindung kann durch herkömmliche Verfahren zu Präparaten formuliert werden. So lassen sich beispielsweise orale Präparate wie Tabletten, Kapseln, Körnchen und Pulver durch den wahlweisen Zusatz von Verdünnungsmitteln wie Lactose, kristalline Cellulose, Stärke und Pflanzenöl, Gleitmitteln wie Magnesiumstearat und Talk, Bindemitteln wie Hydroxypropylcellulose und Polyvinylpyrrolidon, einem Sprengmittel wie Calciumcarboxymethylcellulose oder einer niedrig substituierten Hydroxypropylmethylcellulose, einem Beschichtungsmittel wie Hydroxypropylmethylcellulose, Makrogol bzw. einem Siliconharz oder einem einen Gelatinefilm bildenden Mittel herstellen.

[0020] Die Dosierung der erfindungsgemäßen Verbindung kann geeigneterweise beispielsweise je nach Symptom, Alter und Darreichungsform gewählt werden. Bei einem oralen Präparat kann die erfindungsgemäße Verbindung einmal bis mehrmals täglich mit einer Tagesdosis von 0,1 bis 5000 mg und vorzugsweise 1 bis 1000 mg verabreicht werden.

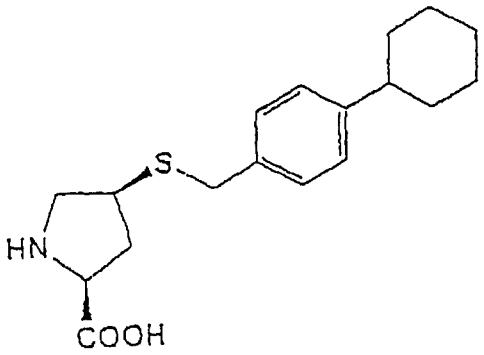
Beste Ausführungsform der Erfindung

[0021] Anschließend werden Beispiele für erfindungsgemäße Präparate und Ergebnisse erfindungsgemäßer pharmakologischer Versuche gegeben. Durch diese Beispiele soll der Erfindungsumfang nicht beschränkt werden, sondern sie sollen die Erfindung näher erläutern.

Herstellung von Verbindungen

Bezugsbeispiel 1

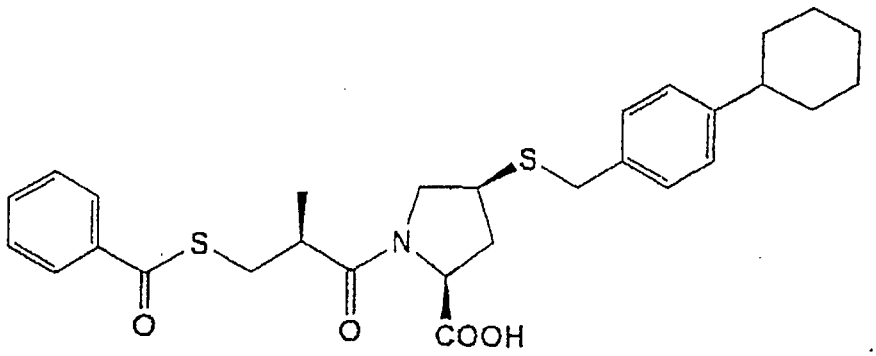
(4S)-4-(4-Cyclohexylbenzylthio)-L-prolin (Bezugsverbindung Nr. 1)



[0022] Zu (4S)-4-Mercapto-L-prolin-hydrochlorid (300 mg) wurde eine wässrige 2 N Natriumhydroxidlösung (1,6 ml) gegeben und das Gemisch bei 0 °C gerührt. Dazu wurde eine Lösung von 4-Cyclohexylbenzylchlorid (340 mg) in einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol (5 ml)/Chloroform (1 ml) zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Unterdruck aufkonzentriert, und die ausgeschiedenen Kristalle wurden abfiltriert. Die Kristalle wurden nacheinander mit Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen, wobei sie 470 mg (91 %) der Titelverbindung ergaben.
Fp. 208,9 bis 210,3 °C.

Beispiel 1

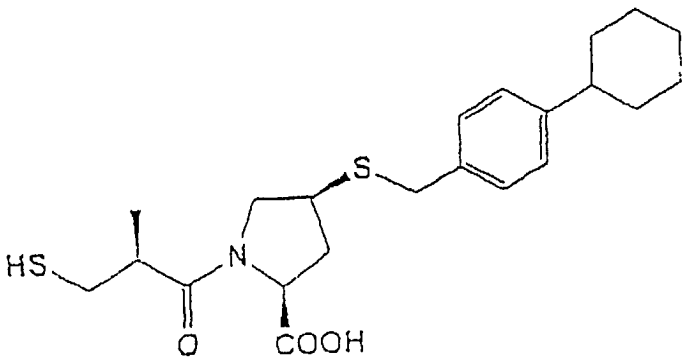
1-[(2S)-3-Benzoylthio-2-methylpropionyl]-(4S)-4-(4-cyclohexylbenzylthio)-L-prolin (Verbindung Nr. 1)



[0023] Dimethylformamid (4,5 ml) wurde zu (4S)-4-(4-Hexylbenzylthio)-L-prolin (430 mg) zugegeben und das Gemisch auf 0 °C abgekühlt. Zu dem Gemisch wurden nacheinander Triethylamin (0,21 ml) und 4-Nitrophenyl-(2S)-3-(benzoylthio)-2-methylpropionat zugegeben, und das erhaltene Gemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurde 10%ige Zitronensäure zugegeben und das Ganze mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Schicht wurde mit Wasser gewaschen und eine gesättigte wässrige Natriumchloridlösung allmählich zugegeben und über Natriumsulfat getrocknet. Der durch Aufkonzentrieren unter Unterdruck erhaltene Rückstand wurde durch Silicagel-Säulenchromatographie gereinigt, wobei 580 mg (81 %) der Titelverbindung als amorphe Substanz erhalten wurden.
$[\alpha]_D^{20}$ – 73,4° (c = 0,5, Methanol)
IR (Film, cm^{-1}) 2924, 1744, 1659, 1447, 1207, 915, 755, 689

Beispiel 2

(4S)-4-(4-Cyclohexylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin (Verbindung Nr. 2)



[0024] Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde 28%iges wässriges Ammoniak (9 ml) zu 1-[(2S)-3-Benzoylthio-2-methylpropionyl]-(4S)-(4-cyclohexylbenzylthio)-L-prolin (500 mg) zugegeben und das Gemisch eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurde Ethylacetat zugegeben und das Ganze mit Wasser extrahiert. Die wässrige Schicht wurde auf 0 °C abgekühlt, 6 N Salzsäure zugegeben, um den pH-Wert auf 2 einzustellen, und das Ganze mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Schicht wurde mit einer gesättigten wässrigen Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der durch Aufkonzentrieren unter Unterdruck erhaltene Rückstand wurde durch Silicagel-Säulenchromatographie gereinigt, was 340 mg (87 %) der Titelverbindung als amorphe Substanz ergab.
$[\alpha]_D^{20}$ – 50,4° (c = 0,5, Methanol)
IR (Film, cm^{-1}) 2924, 1736, 1641, 1612, 1463, 1446, 756.

[0025] (4S)-4-Mercapto-L-prolin-hydrochlorid und 4-Nitrophenyl-(2S)-3-(benzoylthio)-2-methylpropionat, die als Ausgangsmaterialien bei der zuvor beschriebenen Herstellung von Verbindungen verwendet worden waren, sind in J. Org. Chem., 46, 4182-4187 (1981) bzw. in der offengelegten japanischen Patentveröffentlichung 301840/1996 beschrieben.

Pharmakologischer Versuch

[0026] Von Izumi et al. ist ein Verfahren zur Messung der LTA_4-Hydrolaseaktivität durch Messung der LTB_4-Menge, die von der enzymatischen Reaktion unter Verwendung von LTA_4 als Substrat produziert wird, mitgeteilt worden (Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 139-145 [1986]). Die Wirkungen der erfindungsgemäßen Verbindungen auf die LTA_4-Hydrolase wurden entsprechend dem in der Literatur beschriebenen Verfahren untersucht.

Experimentelles Verfahren

[0027] Das in diesem pharmakologischen Versuch verwendete Enzympräparat wurde herbestellt, indem es aus der Lunge von Meerschweinchen ohne Reinigung gemäß dem Verfahren von Izumi et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 139-145 [1986]) und dem Verfahren von Evans et al. (Biochem. Biophys. Acta, 840, 43-50 [1985]) extrahiert wurde. Das experimentelle Verfahren war Folgendes:
Es wurden die Lungen von Hartley-Meerschweinchen (Körpergewicht 330 g) entnommen. Die Lungen wurden in einem Phosphorsäurepuffer (50 mM, pH 7,4, enthielt 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA] und 1 mM Dithiothreitol [DTT]) mit dem dreifachen Gewicht von demjenigen der Lungen unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenisat wurde 20 Minuten lang bei niedriger Geschwindigkeit (800 g) und 20 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit (10000 g) zentrifugiert und 60 Minuten lang ultrazentrifugiert (100000 g), um den Überstand zu ergeben. Der Überstand wurde durch tropfenweise Zugabe einer gesättigten wässrigen Ammoniumsulfatlösung (pH 7,0 bis 7,2, enthielt 1 mM DTT) unter Eiskühlung auf eine 40%ige Sättigung gebracht und 20 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit (10000 g) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf eine 70%ige Sättigung durch tropfenweise Zugabe einer gesättigten wässrigen Ammoniumsulfatlösung (pH 7,0 bis 7,2, enthielt 1 mM DTT) gebracht und 20 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit (10000 g) zentrifugiert. Der erhaltene Zentrifugenrückstand wurde in 2 ml Tris-Essigsäure-Puffer (20 mM, pH 7,8, enthielt 1 mM DTT) gelöst und in 2 Litern der Lösung dialysiert, um das Enzympräparat zu ergeben.

[0028] Das verwendete LTA_4, das das Substrat war, wurde durch Hydrolysieren des LTA_4-Methylesters hergestellt und in Ethanol gelöst.

[0029] Zur Untersuchung der Wirkungen der Testverbindungen auf das Enzympräparat wurden Reaktionen unter den folgenden Bedingungen unter Verwendung von Lösungsmittelgemischen, die aus den in Tabelle 1 angegebenen Zusammensetzungen bestanden, durchgeführt.

Tabelle 1

HEPES-Puffer	50 mM, pH 7,8
Enzympräparat	0,4 bis 0,6 mg Protein
LTA_4	63 µM
Wässrige DTT-Lösung	3 mM
Testverbindungen	10^{-8} bis 10^{-3} M

[0030] Diese Lösung (50 µl) wurde eine Minute lang bei 37 °C inkubiert. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 100 µl eines Lösungsmittelgemischs aus Acetonitril-Ethanol-Essigsäure (150 : 50 : 3, Volumenverhältnis) unter Eiskühlung zugegeben. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei –20 °C stehen gelassen und fünf Minuten lang mit hoher Geschwindigkeit (10000 g) zentrifugiert, wobei sich ein Überstand ergab. Die LTB_4-Menge, die im Überstand produziert worden war, wurde durch Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitschromatographie gemessen.

[0031] Der Grad der inhibierenden Wirkung jeder Testverbindung auf die LTA_4-Hydrolase wird durch die Inhibitionsrate angegeben, die mit folgender Gleichung berechnet wird.

$$\text{Inhibitionsrate (\%)} = \frac{A-B}{A} \cdot 100$$

A: LTB_4-Menge, die sich ohne die Testverbindung gebildet hat
B: LTB_4-Menge, die sich in Gegenwart der Testverbindung gebildet hat

Ergebnisse

[0032] Die Versuchsergebnisse, die unter Verwendung der folgenden Verbindungen als repräsentative Beispiele für die Testverbindung erhalten worden waren, sind in Tabelle 2 mitgeteilt.
Verbindung a: 1-[(2S)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-(4S)-4-(2-methylbenzylthio)-L-prolin.
Verbindung b: (4S)-4-(4-Isopropylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin.
Verbindung c: (4S)-4-(4-Isopropylphenethylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin.
Verbindung d: (4R)-4-(4-Isopropylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin.
Verbindung e: (4R)-4-(4-Isopropylbenzyloxy)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin.
Verbindung f: (4S)-4-(4-tert.-Butylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin.
Verbindung g: 1-[(2S)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-(4S)-4-[4-(methylthio)benzylthio]-L-prolin.
Verbindung h: (4S)-4-(4-Cyclohexylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin.

[0033] Die Ergebnisse sind als die Konzentration der Verbindungen angegeben, die erforderlich waren, um die LTA_4-Hydrolase-Aktivität um 50 % zu senken, das heißt IC_{50}.

Tabelle 2

	IC_{50} (M)
Verbindung a	$8{,}4 \cdot 10^{-7}$
Verbindung b	$5{,}2 \cdot 10^{-8}$
Verbindung c	$7{,}9 \cdot 10^{-7}$
Verbindung d	$2{,}9 \cdot 10^{-7}$
Verbindung e	$8{,}0 \cdot 10^{-7}$
Verbindung f	$3{,}1 \cdot 10^{-8}$
Verbindung g	$1{,}2 \cdot 10^{-7}$
Verbindung h	$3{,}4 \cdot 10^{-8}$

[0034] Wie Tabelle 2 zu entnehmen, ist festgestellt worden, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen bei niedriger Konzentration die LTA_4-Hydrolase-Aktivität beträchtlich hemmen.

[0035] Da dieser pharmakologische Versuch zeigt, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine ausgezeichnete inhibierende Wirkung auf die LTA_4-Hydrolase haben, wird von den Erfindungen erwartet, dass sie insbesondere therapeutische Mittel für entzündliche Erkrankungen wie rheumatische Erkrankungen, Psoriasis, entzündliche Darmerkrankungen, Gicht und cystische Fibrose, an welchen LTB_4 beteiligt ist, sein werden.

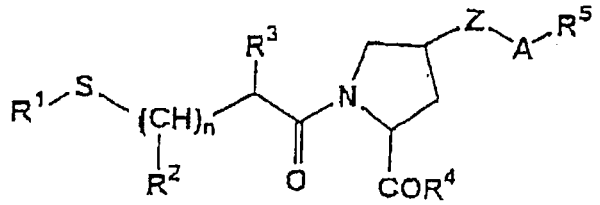
Industrielle Verwendbarkeit

[0036] Die Erfindung betrifft Leukotrien-A_4-Hydrolase-Inhibitoren, die Mercaptoacylprolin-Derivate als Wirkstoff enthalten, und sie stellt insbesondere therapeutische Mittel für entzündliche Erkrankungen wie rheumatische Erkrankungen, Psoriasis, entzündliche Darmerkrankungen, Gicht und cystische Fibrose, am welchen

LTB_4 beteiligt ist, bereit.

Patentansprüche

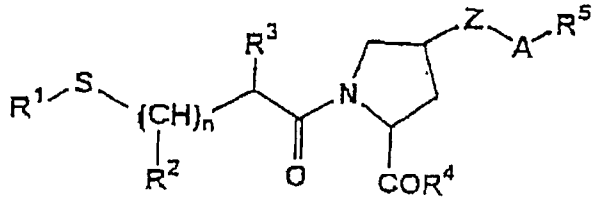
1. Verwendung einer Verbindung mit der allgemeinen Formel [I]



[I]

– worin R^1 ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkylgruppe mit 1 bis 6 C-Atomen, eine Phenyl-niedere Alkylgruppe, wobei die niedere Alkylgruppe wie zuvor definiert ist, eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkanoylgruppe mit 2 bis 6 C-Atomen oder eine Benzoylgruppe bedeutet, wobei jeder Phenylring der Phenyl-niederen Alkylgruppe und der Benzoylgruppe durch eine wie zuvor definierte niedere Alkylgruppe, eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkoxygruppe mit 1 bis 6 C-Atomen oder ein Halogenatom substituiert sein kann,
– R^2 und R^3 jeweils ein Wasserstoffatom oder eine niedere Alkylgruppe wie zuvor definiert bedeuten,
– R^4 eine Hydroxylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe, eine Phenyl-niedere Alkoxygruppe, eine Aminogruppe, eine niedere Alkylaminogruppe oder eine Phenyl-niedere Alkylaminogruppe, wobei die niedere Alkyl- oder Alkoxygruppe wie zuvor definiert ist,
– R^5 eine Phenylgruppe oder eine Naphthylgruppe, wobei die Phenylgruppe und die Naphthylgruppe jeweils durch eine niedere Alkylgruppe, eine niedere Cycloalkylgruppe mit 3 bis 8 C-Atomen, eine niedere Alkoxygruppe, eine niedere Alkylthiogruppe oder ein Halogenatom substituiert sein kann und die niedere Alkyl- oder Alkoxygruppe wie zuvor definiert ist,
– Z ein Schwefel- oder Sauerstoffatom,
– A eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkylengruppe mit 1 bis 6 C-Atomen und
– n 0, 1 oder 2 bedeutet,
oder eines Salzes davon als Wirkstoff zur Herstellung eines therapeutischen Mittels für entzündliche oder rheumatische Erkrankungen.

2. Verwendung einer Verbindung mit der allgemeinen Formel [I]



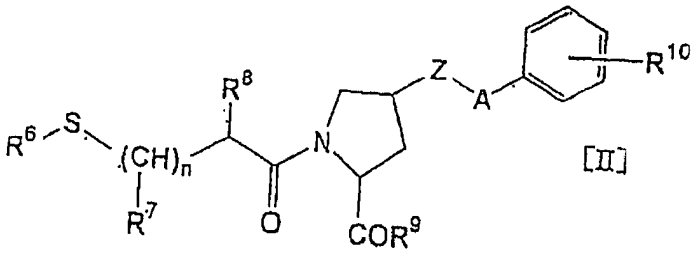
[I]

– worin R^1 ein Wasserstoffatom oder eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkanoylgruppe mit 2 bis 6 C-Atomen oder eine Benzoylgruppe bedeutet,
– R^2 und R^3 jeweils ein Wasserstoffatom oder eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkylgruppe mit 1 bis 6 C-Atomen bedeuten,
– R^4 eine Hydroxylgruppe oder eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkoxygruppe mit 1 bis 6 C-Atomen,
– R^5 eine Phenylgruppe oder eine Naphthylgruppe, wobei die Phenylgruppe durch eine niedere Alkylgruppe wie zuvor definiert, eine niedere Cycloalkylgruppe mit 3 bis 8 C-Atomen, eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkoxygruppe mit 1 bis 6 C-Atomen oder eine niedere Alkylthiogruppe substituiert sein kann und die Alkylgruppe wie weiter oben definiert ist,
– Z ein Schwefel- oder Sauerstoffatom,
– A eine niedere Alkylengruppe und
– n 1 bedeutet,
oder eines Salzes davon als Wirkstoff nach Anspruch 1 zur Herstellung eines therapeutischen Mittels für entzündliche oder rheumatische Erkrankungen.

3. Leukotrien-A4-Hydrolase-Inhibitor, der (4S)-4-(4-Isopropylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpro-

pionyl]-L-prolin, (4S)-4-(4-tert.-Butylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin oder (4S)-4-(4-Cyclohexylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin oder ein Salz davon als Wirkstoff enthält.

4. Verbindung mit der allgemeinen Formel [II]



[II]

– worin R^6 ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkylgruppe mit 1 bis 6 C-Atomen, eine Phenyl-niedere Alkylgruppe, wobei die niedere Alkylgruppe wie weiter oben definiert ist, eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkanoylgruppe mit 2 bis 6 C-Atomen oder eine Benzoylgruppe bedeutet, wobei jeder Phenylring der Phenyl-niederen Alkylgruppe und der Benzoylgruppe durch eine niedere Alkylgruppe wie weiter oben definiert, eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkoxygruppe mit 1 bis 6 C-Atomen oder ein Halogenatom substituiert sein kann,
– R^7 und R^8 jeweils ein Wasserstoffatom oder eine niedere Alkylgruppe wie weiter oben definiert bedeuten,
– R^9 eine Hydroxylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe, eine Phenyl-niedere Alkoxygruppe, eine Aminogruppe, eine niedere Alkylaminogruppe oder eine Phenyl-niedere Alkylaminogruppe, wobei die niedere Alkyl- oder Alkoxygruppe wie weiter oben definiert ist,
– R^{10} eine niedere C_3- bis C_8-Cycloalkylgruppe,
– Z ein Schwefel- oder Sauerstoffatom,
– A eine geradkettige oder verzweigte niedere Alkylengruppe mit 1 bis 6 C-Atomen und
– n 0, 1 oder 2 bedeutet,
oder ein Salz davon.

5. (4S)-4-(4-Cyclohexylbenzylthio)-1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin oder ein Salz davon.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen