

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

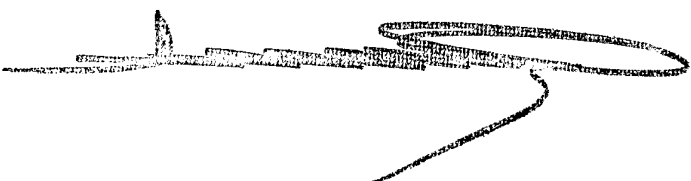
N.º 97 642

REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMO INGREDIENTE ACTIVO DERIVADOS DE OXALIL-AMINOÁCIDOS".

INVENTORES: Dr. Ekkehard Baader, Dr. Harald Burghard e Dr. Volkmar Günzler-Pukall.

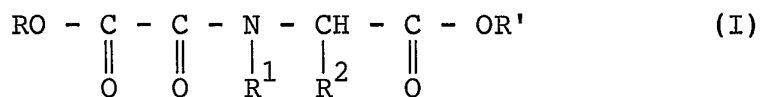
Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. República Federal da Alemanha em 12 de Maio de 1990, sob o nº P 40 15 255.3.



Descrição referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Ekkehard Baader, Dr. Harald Burghard e Dr. Volkm_umar Günzler-Pukall, residentes na República Federal Alemã) para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMO INGREDIENTE ACTIVO DERIVADOS DE OXALIL-AMINOÁCIDOS".

D E S C R I Ç Ã O

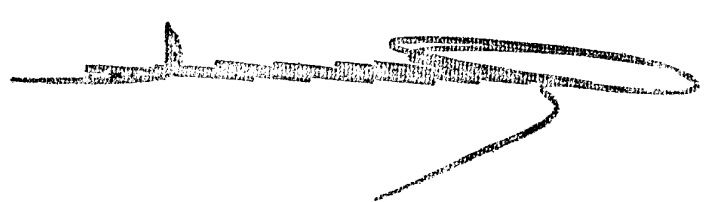
Os derivados de axalil-aminoácidos são conhecidos e descritos, por exemplo, nas Especificações FR-A 20 10 601 e JP 43/10614 ou em Biochemistry, 27 (8), 2934-2943 (1988). Uma utilização destes compostos como medicamento, porém, ainda não foi descrita no estado da técnica.



na qual

R e R' são iguais ou diferentes e representam C₁-C₆-alquilo ou hidrogênio,

R¹ representa hidrogênio ou C₁-C₄-alquilo,



R^2 representa hidrogênio, C_1-C_6 -alquilo, C_1-C_3 -alcoxi, carboxilo, C_1-C_6 -alcoxicarbonilo, arilo, SH, NH_2 ou halogênio, estando os radicais alquilo não substituídos ou estando substituídos por arilo, OH, SH ou NH_2 , ou R^1 e R^2 formam em conjunto uma cadeia de C_2-C_4 -alquilenos assim como os compostos nas suas formas D e L preponderantemente puras, assim como os seus sais fisiologicamente aceitáveis, são excelentes inibidores da prolino- e lisino-hidroxilase.

A invenção refere-se, portanto, à utilização dos compostos acima citados como medicamentos, especialmente como medicamentos para influenciar o metabolismo de colágeno e de substâncias semelhantes ao colágeno ou a biossíntese de Clq.

É também, portanto, um objecto da presente invenção um medicamento contendo os compostos acima citados com excipientes farmacêuticos aceitáveis.

A invenção refere-se, especialmente, à utilização de compostos da fórmula I, nos quais

R e R' são iguais ou diferentes e representam C_1-C_3 -alquilo, Na ou K,

R^1 representa hidrogênio, metilo ou etilo,

R^2 representa hidrogênio ou C_1-C_4 -alquilo, onde o radical alquilo não está substituído ou está substituído por fenilo ou SH, ou

R^1 e R^2 formam em conjunto uma cadeia C_2 - ou C_3 -alquilênica.

Excepcionalmente preferida é a utilização de compostos da fórmula I, nos quais

R e R' são iguais e representam metilo, etilo, Na ou K

R^1 representa hidrogênio ou metilo,

R^2 representa hidrogênio, C_1-C_3 -alquilo, benzilo ou tiometilo,

ou

R^1 e R^2 formam em conjunto uma cadeia etilênica.



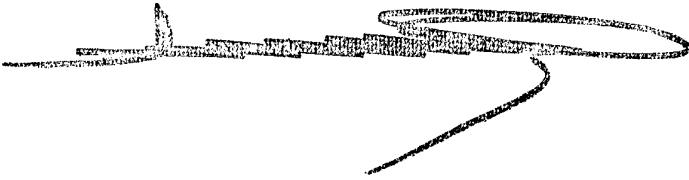
As cadeias alquílicas com 3 e mais átomos de carbono tanto podem ter a cadeia linear como também ramificada. Por arilo são entendidos hidrocarbonetos aromáticos, especialmente fenilo e naftilo. Por halogéneo são entendidos flúor, cloro, bromo e iodo, especialmente cloro e bromo.

A obtenção dos compostos da fórmula I é conhecida e descrita, por exemplo, em FR-A 20 10 601. Ela é conseguida, da maneira mais simples, reunindo 1-3 equivalentes de halogenidrato de éster de aminoácido, de preferência cloridrato, e 1-5 equivalentes de uma base como, por exemplo, carbonatos ou hidrogenocarbonatos, como carbonato de sódio ou de potássio ou hidrogenocarbonato de sódio ou de potássio, ou aminas terciárias, tal como trietilamina, tributilamina, etildiisopropilamina ou aminas heterocíclicas, tal como N-alquilmorfolina, piridina, quinolina ou dialquilanilinas.

Eventualmente também podem ser usadas várias bases simultaneamente. As temperaturas da reacção correspondem a -30°C até 150°C , de preferência a 20 até 100°C . Eventualmente também se pode trabalhar num dissolvente como éter dietílico ou dimetoxietano ou tetrahidrofurano, hidrocloreto clorados como cloreto de metileno, clorofórmio, tri- ou tetracloretileno, benzeno, tolueno e também dissolventes polares como dimetilformamida, acetona, álcoois como metanol ou etanol ou sulfóxido de dimetilo. Em seguida adicionam-se, a temperaturas entre -78°C e 100°C , de preferência entre -20°C e $+20^{\circ}\text{C}$, lentamente, 1-3 equivalentes de cloreto de éster de ácido oxálico. Eventualmente aqui também se pode trabalhar com um dissolvente como acima citado. O termo da reacção pode ser determinado, por exemplo, por meio de cromatografia de camada fina.

Eventualmente o processamento dos produtos pode ser realizado, por exemplo, por extracção ou por cromatografia, por exemplo através de gel de sílica. O produto isolado pode ser recristalizado.

Os compostos da fórmula I com R e/ou R'=metal

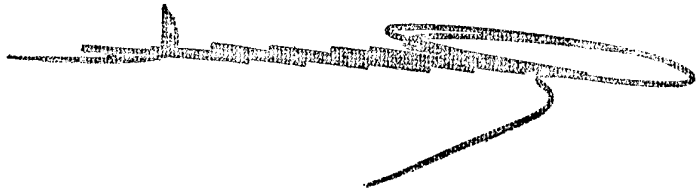


alcalino como, por exemplo, Na ou K, podem ser saponificados a partir dos compostos da fórmula I correspondentes com R e/ou $R' = C_1 - C_4$ -alcoxi, em meio alcalino, aos sais correspondentes, por exemplo, com NaOH ou KOH em um álcool de baixo peso molecular, como metanol ou etanol, ou em éteres como dimetoxietano ou tetrahydrofurano, eventualmente na presença de água. Nos sais obtidos o cátion de metal alcalino pode ser substituído, da maneira usual, em permutadores de iões, por quaisquer cátions. Para esta finalidade passam-se os ácidos, por exemplo, através de uma coluna contendo um permutador de cátions como, por exemplo, baseado em poliestireno/divinilbenzeno (^(R)Amberlite CG150 ou ^(R)Dowex-CCR-2). O permutador de cátions está carregado com o cátion desejado, por exemplo, com iões de amônio, que derivam de uma amina primária, secundária ou terciária. Obtém-se o sal desejado para evaporação do eluído.

Os sais de amônio dos ácidos que derivam de uma amina primária, secundária ou terciária, também podem ser obtidos adicionando aos ácidos livres em uma solução alcoólica uma quantidade equimolar de amina correspondente e evaporando o dissolvente.

A obtenção dos compostos D ou L, preponderantemente isentos de enantiômeros, a partir dos racematos é realizada, igualmente, por processos conhecidos na literatura, por exemplo pela cristalização fracionada ou por processamento enzimático. Outra possibilidade consiste na síntese directa do composto, isento de enantiômeros, a partir de precursores D ou L correspondentes (compostos de partida).

As substâncias de acordo com a invenção são eficazes como substâncias inibidoras reversíveis da prolilhidroxilase. Dessa forma, elas provocam uma inibição selectiva da reacção de hidroxilação, específica do colagénio, durante cujo curso a prolina, ligada à proteína, é hidroxilada pelo enzima prolilhidroxilase. No impedimento desta reacção por meio de um inibidor forma-se uma molécula de colagénio subhidroxilada, in-

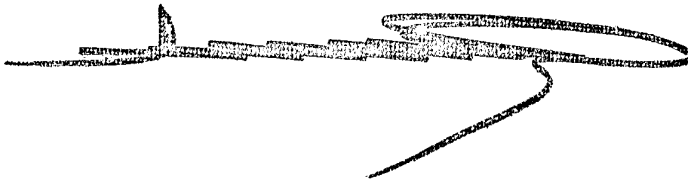


capaz de função, que somente pode ser fornecida pela célula em reduzida quantidade ao espaço extracelular. O colagénio subhidroxilado, além disso, não pode ser incorporado na matriz de colagénio e é facilmente decomposto proteoliticamente. Como consequência destes efeitos diminui ao todo a quantidade do colagénio depositado de forma extracelular. Os inibidores da prolilhidroxilase, portanto, são agentes auxiliares adequados na terapia de doenças nas quais o depósito de colagénio contribui decisivamente para o quadro clínico. Pertencem ao mesmo, entre outros, fibroses do pulmão, fígado e pele (escleroderma), assim como a aterosclerose.

Além disso, é conhecido que a inibição da prolilhidroxilase por meio de inibidores conhecidos, como alfa, alfa-dipiridilo, conduz a uma inibição da biossíntese de Clq de macrófagos (W. Müller et al., FEBS Lett. 90, 218 e seguintes (1978)). Desta forma, não ocorre a via clássica da activação complementar; os inibidores da prolilhidroxilase, portanto, também agem como imunossuppressivos, por exemplo, em caso de doenças imunológicas complexas.

As substâncias, de acordo com a invenção, podem ser, portanto, usadas como fibrossuppressivos, imunossuppressivos e antiateroscleróticos.

O efeito antifibrótico pode ser determinado no exemplo da fibrose do fígado induzida por tetracloreto de carbono. Para esta finalidade tratam-se ratos duas vezes por semana com CCl_4 (1 ml/kg) - dissolvido em azeite. A substância a ser examinada é administrada diariamente, eventualmente até duas vezes por dia, por via oral ou intraperitoneal - dissolvida num dissolvente aceitável adequado. A extensão da fibrose do fígado é determinada histologicamente e a fracção de colagénio no fígado é analisada por meio da determinação de hidroxiprolina - como é descrito por Kivirikko et al. (Anal. Biochem. 19, 249 e seguintes (1967)). A actividade da fibrogénese pode ser determinada por meio de determinação radioimunológica de fragmentos de co



lagênio e de péptidos de procolagênio no soro. Os compostos de acordo com a invenção são eficazes, neste exemplo, numa concentração de 1-100 mg/kg. Um outro exemplo para a avaliação do efeito antibiótico é a fibrose do pulmão induzida por bleomicina, como é descrito por Kelley et al. (J. Lab. Clin. Med. 96, 954 (1980)). Para a avaliação do efeito dos compostos de acordo com a invenção pode ser usado o exemplo do granuloma de chumaço de algodão, como é descrito por Meier et al, Experimentia 6, 469 (1950). A seguir a invenção é descrita mais pormenorizadamente por meio de exemplos.

Exemplos

Processo geral para a obtenção dos compostos dos exemplos 1-6.

Colocam-se previamente num recipiente um equivalente do cloridrato do éster de aminoácido, dois equivalentes de trietilamina e dois equivalentes de N,N-dimetilaminopiridina, à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto, em cloreto de metileno. Em seguida adiciona-se, a 0°C - 10°C, lentamente, gota a gota, um equivalente de cloreto de metileno. Agita-se durante 12 horas à temperatura ambiente, adiciona-se solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e extrai-se. Separa-se a fase orgânica, lava-se com solução de cloreto de sódio, seca-se com sulfato de magnésio e evapora-se. O produto bruto é cromatografado.

Exemplo 1

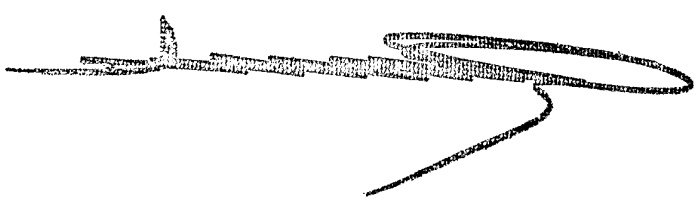
Éster dimetílico de (N-oxalil)-L-alanina

$R = R' = CH_3$; $R^1 = H$; $R^2 = CH_3$

5 g do cloridrato de éster metílico de L-alanina e 3,3 ml de cloreto de éster metílico de ácido oxálico fornecem 6 g do exemplo 1 como óleo

(Crom.: EE/CH₃OH 5/1).

Exemplo 2



Éster dimetílico de (N-oxalil)-L-fenilalanina

$R = R' = \text{CH}_3$; $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

5 g do cloridrato de éster metílico de L-fenilalanina e 2,2 ml de cloreto de éster metílico de ácido oxálico fornecem 6,5 g do exemplo 2 como óleo

(Crom.: EE/CH₃OH 5/1).

Exemplo 3

Éster dimetílico de (N-oxalil)-L-glicina

$R = R' = \text{CH}_3$; $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{H}$

15 g de cloridrato de éster metílico de L-glicina e 11 ml de cloreto de éster monometílico de ácido oxálico fornecem 23 g do exemplo 3; ponto de fusão 49°C;

(Crom.: EE).

Exemplo 4

Éster dimetílico de (N-oxalil)-L-prolina

$R = R' = \text{CH}_3$; $R^1 = \text{CH}_2\text{-CH}_2 = R^2$

2 g do cloridrato de éster metílico de L-prolina e 2,9 g de cloreto de éster monometílico de ácido oxálico fornecem 1,5 g como óleo (Crom.: EE).

Exemplo 5

Éster metílico de (N-oxalil)-L-valina

$R = R' = \text{CH}_3$; $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$

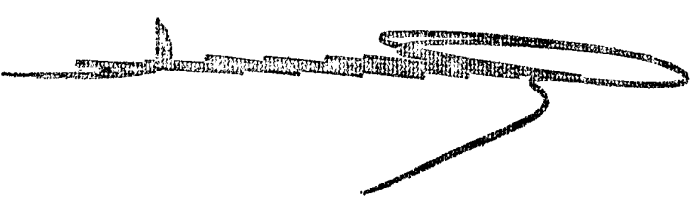
2 g do cloridrato de éster metílico de L-valina e 2,8 g de cloreto de éster monometílico de ácido oxálico fornecem 2 g como óleo (Crom.: CH/EE 1/1).

Exemplo 6

Éster dimetílico de (N-oxalil)-L-cisteína

$R = R' = \text{CH}_3$; $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{CH}_2\text{SH}$

2 g do cloridrato de éster metílico de L-cisteína e 3,9 g de



cloreto de éster monometílico de ácido oxálico fornecem 1,5 g como óleo (Crom.: CH/EE 1/1).

Exemplo 7

Éster dietílico de (N-oxalil)-sarcosina

$R = R' = C_2H_5$; $R^1 = CH_3$; $R^2 = H$

Colocam-se previamente 2 g de cloridrato de éster etílico de sarcosina em 50 ml de etanol e adiciona-se, à temperatura ambiente, gota a gota, uma solução de 3,5 ml (2 equivalentes) de éster dietílico de ácido oxálico e 1,8 ml de trietilamina em 25 ml de etanol. Agita-se durante 5 horas a 50°C, depois aquece-se durante 2 horas ao refluxo. Arrefece-se a solução e evapora-se até à secura. Retoma-se o resíduo em cloreto de metileno, lava-se uma vez com água, seca-se a fase orgânica sobre sulfato de magnésio e evapora-se.

O produto bruto é cromatografado (EE/CH 1/1)

Rendimento: 0,35 g.

Processo geral para a obtenção dos compostos 8-14.

Dissolve-se um equivalente dos compostos dos exemplos 1-7 à temperatura ambiente, em 2 equivalentes de um hidróxido alcalino em solução alcoólica 0,1 N. Agita-se durante 12 horas à temperatura ambiente e evapora-se até à secura. O resíduo é submetido duas vezes a vapores de tolueno, lavado várias vezes com pentano e seco sob vácuo.

Exemplo 8

Sal dipotássio de (N-oxalil)-l-alanina

$R = R' = K$; $R^1 = H$; $R^2 = CH_3$

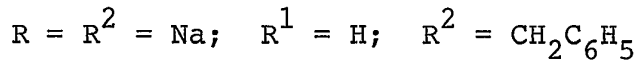
Fazem-se reagir 300 mg do composto do exemplo 1 com 32,5 ml de hidróxido de potássio etanólico 0,1 N.

Rendimento: 370 mg de cristais brancos, ponto de fusão >300°C.



Exemplo 9

Sal dissódico de (N-oxalil)-L-fenilalanina

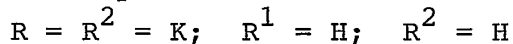


Fazem-se reagir 420 mg do composto do exemplo 2 com 32,5 ml de hidróxido de sódio metanólico 0,1 N.

Rendimento: 440 mg de cristais brancos, ponto de fusão: $>300^\circ\text{C}$.

Exemplo 10

Sal dipotássico de (N-oxalil)-L-glicina

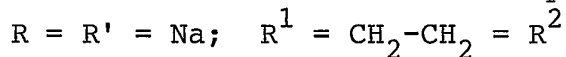


Fazem-se reagir 5,5 g do composto do exemplo 3 com 314 ml de hidróxido de potássio metanólico 0,1 N.

Rendimento: 5,4 g de cristais brancos, ponto de fusão: $>300^\circ\text{C}$.

Exemplo 11

Sal dissódico de (N-oxalil)-L-prolina

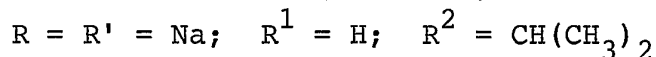


Fazem-se reagir 300 mg do composto do exemplo 4 com 1,5 ml de hidróxido de sódio etanólico 0,1 N.

Rendimento: 290 g de cristais brancos, ponto de fusão: $>300^\circ\text{C}$.

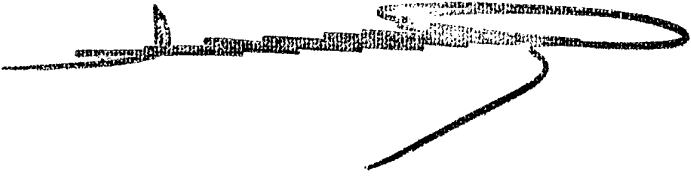
Exemplo 12

Sal dissódico de (N-oxalil)-L-valina



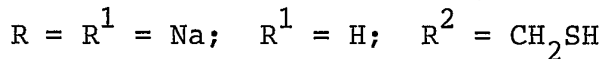
Fazem-se reagir 300 mg do composto do exemplo 5 com 14 ml de hidróxido de sódio etanólico 0,1 N.

Rendimento: 235 mg de cristais brancos, ponto de fusão: $>300^\circ\text{C}$.



Exemplo 13

Sal dissódico de (N-oxalil)-L-cisteína

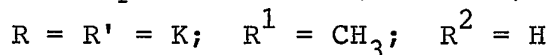


Fazem-se reagir 300 mg do composto do exemplo 6 com 13,7 ml de hidróxido de sódio metanólico 0,1 N.

Rendimento: 300 g de cristais brancos, ponto de fusão: >300°C.

Exmeplo 14

Sal dipotássico de (N-oxalil)-sarcosina



Fazem-se reagir 120 mg do composto do exemplo 7 com 11,4 ml de hidróxido de potássio etanólico 0,1 N.

Rendimento: 130 mg de cristais brancos, ponto de fusão: >300°C.

A seguir os compostos dos exemplos 1-14 estão reunidos em forma de tabela (Tabela 1).

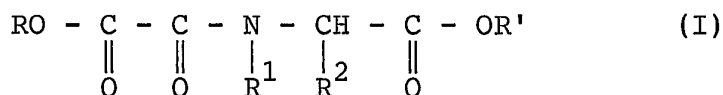


Tabela 1

<u>Exem</u> <u>plo</u>	R	R'	R ¹	R ²	Ponto de fusão/Óleo
1	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	óleo
2	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ C ₆ H ₅	óleo
3	CH ₃	CH ₃	H	H	49°C
4	CH ₃	CH ₃	CH ₂	CH ₂	óleo
5	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₃) ₂	óleo
6	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ SH	óleo
7	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃	H	óleo
8	K	K	H	CH ₃	>300°C
9	Na	Na	H	CH ₂ C ₆ H ₅	>300°C

Tabela 1 (continuação)

Exem plo	R	R'	R ¹	R ²	Ponto de Fusão/Óleo
10	K	K	H	H	> 300°C
11	Na	Na	CH ₂ -----CH ₂		> 300°C
12	Na	Na	H	CH(CH ₃) ₂	> 300°C
13	Na	Na	H	CH ₂ SH	> 300°C
14	K	K	CH ₃	H	> 300°C

O efeito da inibição dos compostos de acordo com a invenção foi determinado num teste de enzima analogamente ao método de B. Peterkofsky e R. DiBlasio, Anal. Biochem. 66, 279-286 (1975). Neste teste o colagénio subhidroxilado é hidroxilado enzimaticamente com propilhidroxilase na presença de iões de ferro (II), alfa-cetoglutarato e ascorbato e é determinada a concentração do composto de acordo com a invenção adicionado, a qual conduz a uma inibição de 80% da actividade do enzima (o valor é referido como Ki).

Na tabela 2 constam os resultados com os compostos dos exemplos 8 a 10.

Tabela 2 (Sais):

Composto	Ki [mM]
Exemplo 8	0,04
Exemplo 10	0,01

O efeito inibidor também pode ser determinado em culturas de células ou tecidos. Para esta finalidade podem ser usados fibroblastos ou outras células ou "calvaria" que produzem colagénio, ou outros órgãos que produzem colagénio. Na tabela 3 encontra-se o efeito inibidor de substâncias de acordo com a invenção na cultura de "calvaria". É citada a concentração que conduz a uma diminuição de 50% do quociente de hidroxiprolina/prolina na marcação metabólica com ¹⁴C-prolina (IC₅₀).

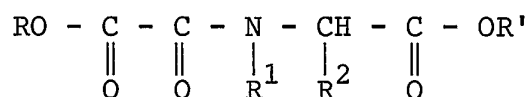
Tabela 3 (Éster):

Composto	IC ₅₀ [mM]
Exemplo 1	0,35
Exemplo 3	0,002

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo para a preparação de composições farmacêuticas para influenciar o metabolismo de colagênio e de substâncias semelhantes ao colagênio, ou da biossíntese de Clq, caracterizado por se incorporar como ingrediente activo um composto da fórmula I



na qual

R e R' são iguais ou diferentes e representam C₁-C₆-alquilo ou hidrogênio

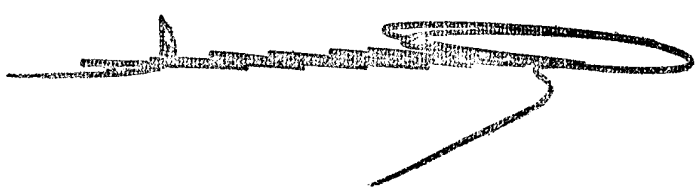
R¹ representa hidrogênio ou C₁-C₆-alquilo,

R² representa hidrogênio, C₁-C₆-alquilo, C₁-C₃-alcoxi, carboxilo, C₁-C₆-alcoxicarbonilo, arilo, SH, NH₂ ou halogênio, estando os radicais alquilo não substituídos ou estando substituídos com arilo, OH, SH ou NH₂.

ou

R¹ e R² representam em conjunto uma cadeia de C₂-C₄-alquilenos

- assim como os compostos nas suas formas D e L, preponderantemente
- te puras, assim como os seus sais fisiologicamente aceitáveis.



- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por R e R' serem iguais ou diferentes e representarem C₁-C₃-alquilo, Na ou K,

R¹ representar hidrogênio, metilo ou etilo,

R² representar hidrogênio ou C₁-C₄-alquilo, estando o radical alquilo não substituído ou estando substituindo com fenilo ou SH

ou

R¹ e R² formam juntos uma cadeia de C₂- ou C₃-alquilenos.

- 3ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por R e R' serem iguais e representarem metilo, etilo, Na ou K,

R¹ representar hidrogênio ou metilo,

R² representar hidrogênio, C₁-C₃-alquilo, benzilo ou tiometilo,

ou

R¹ e R² formarem juntos uma cadeia etilênica.

- 4ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, caracterizado por se obterem composições eficazes para a inibição dos enzimas prolinohidroxilase ou lisinohidroxilase.

- 5ª -

- 13 -

- 5ª -

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, caracterizado por se obterem composições eficazes para a aplicação como fibrossupressivos e imunossupressivos

- 6ª -


Processo para a preparação de uma composição farmacêutica contendo um composto tal como é definido em uma ou mais das reivindicações 1 a 5, caracterizado por se incorporarem ainda excipientes farmacêuticos aceitáveis.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente alemão apresentado em 12 de Maio de 1990, sob o nº. P 40 15 255.3.

Lisboa, 10 de Maio de 1991

DR. J. J. SILVA, ADVOGADO GERAL DO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL

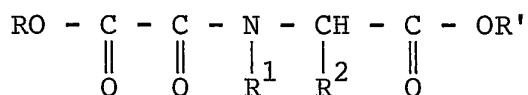




R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CON-
TENDO COMO INGREDIENTE ACTIVO DERIVADOS DE OXALIL-AMINOÁCIDOS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de composições farmacêuticas para influenciar o metabolismo de colagénio e de substâncias semelhantes ao colagénio, ou da biossíntese de Clq, o qual compreende a adição de um composto da fórmula I



assim como dos compostos na sua forma D e L, preponderantemente pura, assim como dos seus sais fisiologicamente aceitáveis, eventualmente em combinação com excipientes.