

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 4/00

A61K 38/00

A61P 9/10 A61P 11/00

A61P 11/06 A61P 17/06

A61P 19/02 A61P 37/06

[12]发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 91104323.3

[45]授权公告日 2001 年 10 月 17 日

[11]授权公告号 CN 1073115C

[22]申请日 1991.6.28
[21]申请号 91104323.3
[30]优先权
[32]1990.6.29 [33]GB [31]9014546.7
[73]专利权人 藤泽药品工业株式会社
地址 日本大阪府大阪市
[72]发明人 高濑茂弘 烟中洋 江崎正美
辻井荣作 冈本正则 重松伸治
奥原正国
审查员 贾书瑾

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成 曹恒兴

权利要求书 6 页 说明书 19 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 WS7622A 单硫酸酯的二碱金属盐的制备方法

[57]摘要

本发明涉及具有人白细胞弹性蛋白酶抑制活性的新的 WS7622A 单硫酸酯 或二硫酸酯及其可药用盐、其制备方法、含有这些化合物的药物组合物及其使用方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种制备 WS 7622A 二硫酸酯的二碱金属盐的方法, 该方法包括: 在有或没有碱存在下, 使 WS 7622A 或其盐硫酸化, 得到 WS 7622A 二硫酸酯的二碱金属盐.

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述的 WS 7622A 二硫酸酯的二碱金属盐是具有下列物化性质的 WS 7622A 二硫酸酯的二钠盐:

外观: 无色晶体

溶解性: 溶于水、甲醇

不溶于氯仿、正己烷

熔点 : 257-263 °C (分解)

旋光率 : $[\alpha]_D^{25} + 37.5^\circ$ (C=1.0, 甲醇)

分子式 : $C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2Na_2$

元素分析 :

计算值 ($C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2Na_2 \cdot 6H_2O$):

C 44.30, H 5.77, N 9.89, S 5.03, Na 3.61 %

实测值: C 44.98, H 5.90, N 10.06, S 5.00, Na 3.98 %

分子量 : FAB-MS m/z 1188 $(M+Na)^+$

薄层层析 :

固定相	展开剂	R _f 值
硅胶	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O (65 : 25 : 4)	0.11
	正丁醇-乙酸-水 (4 : 2 : 1)	0.29

95.11.19

红外吸收光谱:

ν KBr 3360, 2960, 1735, 1660, 1640, 1530,
 max 1500, 1380, 1250, 1200, 1060, 1030,
 940, 890 cm^{-1}

 ^1H 核磁共振谱:(400MHz, D_2O) δ

7.50	(1H, s)
7.27	(1H, s)
7.33-7.24	(3H, m)
6.94	(1H, q, $J=7\text{Hz}$)
6.85	(2H, br d, $J=8\text{Hz}$)
5.53	(1H, m)
5.37	(1H, m)
4.80	(1H, br s)
4.63-4.57	(2H, m)
4.53	(1H, m)
4.06	(1H, m)
3.99	(1H, d, $J=10\text{Hz}$)
3.56	(1H, br d, $J=14\text{Hz}$)
3.46	(1H, m)
2.97	(3H, s)
2.97-2.88	(2H, m)
2.72	(1H, m)
2.59	(1H, m)
2.51-2.38	(2H, m)
2.09-1.91	(4H, m)
1.82-1.60	(3H, m)
1.77	(3H, d, $J=7\text{Hz}$)
1.50	(3H, d, $J=6.5\text{Hz}$)
1.40	(1H, m)
1.11	(6H, d, $J=7\text{Hz}$)
0.99	(3H, d, $J=6.5\text{Hz}$)
0.97	(3H, d, $J=6.5\text{Hz}$)

95.11.19

^{13}C 核磁共振谱:

(100MHz, D_2O) δ

183.6	(s)		
177.9	(s)		
177.7	(s)		
174.8	(s)		
173.8	(s)		
173.3	(s)		
172.4	(s)		
167.8	(s)		
161.5	(s)		
145.5	(s)		
144.9	(s)		
139.6	(d)		
139.0	(s)		
137.0	(s)		
136.0	(s)		
132.3	(d)	x	2
131.0	(d)	x	2
129.6	(d)		
127.4	(d)		
125.9	(d)		
77.4	(d)		
75.1	(d)		
63.8	(d)		
62.7	(d)		
59.1	(d)		
55.9	(d)		
54.9	(d)		
51.9	(d)		
41.9	(t)		
37.2	(d)		
36.9	(t)		
34.1	(q)		
32.3	(d)		

31.9	(t)
31.8	(t)
31.2	(t)
27.5	(t)
23.7	(t)
21.7	(q)
21.4	(q) x 2
21.3	(q)
21.1	(q)
15.5	(q)

氨基酸分析：

检测出苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸、 NH_3 和对茚三酮呈阳性的一些未知组分；

3. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的 WS 7622A 二硫酸酯的二碱金属盐是具有下列物化性质的 WS 7622A 二硫酸酯的二钾盐：

外观：无色无定形粉末

溶解性：溶于水、甲醇

不溶于氯仿、正己烷

熔点：230-237°C (分解)

旋光率： $[\alpha]_D^{23} + 34^\circ$ (C=1.0, 甲醇)

分子式： $\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_{19}\text{S}_2\text{K}_2$

元素分析：

计算值 ($\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_{19}\text{S}_2\text{K}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$):

C 43.21, H 5.63, N 9.65, S 4.91, K 5.99 %

实测值：C 43.96, H 5.44, N 9.97, S 5.09, K 4.49 %

分子量：FAB-MS m/z 1236 (M+K)⁺

薄层层析：

95.11.19

固定相	展开剂	R f 值
硅胶	CHCl ₃ - CH ₃ OH - H ₂ O (65 : 25 : 4)	0.13

红外吸收光谱：

KBr	3360, 2960, 1735, 1660, 1640, 1530,
v	1500, 1405, 1380, 1250, 1200, 1050,
max	1030, 940, 890 cm ⁻¹

¹H 核磁共振谱：

(400MHz, D ₂ O) δ	
7.52	(1H, s)
7.28	(1H, s)
7.34-7.25	(3H, m)
6.96	(1H, q, J=7Hz)
6.87	(2H, br d, J=8Hz)
5.56	(1H, m)
5.40	(1H, m)
4.84	(1H, br s)
4.70-4.55	(3H, m)
4.10	(1H, m)
4.03	(1H, m)
3.60	(1H, br d, J=14Hz)
3.50	(1H, m)
3.00	(3H, s)
3.00-2.85	(2H, m)
2.76	(1H, m)
2.62	(1H, m)
2.55-2.40	(2H, m)
2.12-1.95	(4H, m)
1.90-1.65	(3H, m)
1.79	(3H, d, J=7Hz)
1.53	(3H, d, J=6.5Hz)

95.11.19

1.45	(1H, m)
1.14	(6H, d, J=7Hz)
1.02	(3H, d, J=6.5Hz)
1.00	(3H, d, J=6.5Hz)

氨基酸分析：

检测出苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸、 NH_3 和对茚三酮呈阳性的—些未知组分。

说明书

WS 7622A 二硫酸酯的二碱金属盐的制备方法

本发明涉及新的 WS 7622A 单硫酸酯或二硫酸酯。

更具体地说，本发明涉及具有人白细胞弹性蛋白酶抑制活性的新的 WS 7622A 单硫酸酯或二硫酸酯及其可药用盐、其制备方法、含有这些化合物的药物组合物及其使用方法。

本发明的发明人以前曾用在营养培养基中培养拒霉素链霉菌 (Streptomyces resistomycificus) 7622 菌株的方法，制备出了在本发明中作为原料使用的 WS 7622A 物质，并在许多国家提交了涉及该物质的专利申请（参见欧洲专利申请 90104500.5）。拒霉素链霉菌 7622 已保藏在中国典型培养物保藏中心（中国武汉武汉大学校内），登记号为 CCTCC M90005（保藏日：1990年2月13日）。

但是，WS 7622A 物质不溶于水，所以本发明的发明人研究了如何提高 WS 7622A 物质的水溶性，这样，通过使 WS 7622A 物质硫酸化，他们成功地提高了 WS 7622A 物质的水溶性。

本发明的 WS 7622A 单硫酸酯或二硫酸酯及其可药用盐，可以通过使 WS 7622A 物质或其盐硫酸化来制备。

作为原料的 WS 7622A 物质是新化合物，具有下列物化性质。

WS 7622A 物质的物化性质：

外观： 无色棱晶

物质本性： 酸性

颜色反应： 阳性：硫酸铈、碘蒸气

阴性：茚三酮、莫利施试剂

溶解性： 溶于甲醇、乙醇、正丁醇

微溶于氯仿、丙酮、乙酸乙酯

不溶于水、正己烷

薄层层析 (TLC)：

氯仿-甲醇 (5 : 1 ; V / V) R f 0 . 5 1

丙酮-甲醇 (10 : 1) 0 . 6 2

(Kiesel gel 60 F254 硅胶板, Merck)

熔点 : 250-252°C (分解)

旋光率 : $[\alpha]_D^{23} + 36^\circ$ (C=1.0, 甲醇)

紫外光谱 : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 287nm ($\epsilon = 3600$)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH-HCl}}$ 287nm

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH-NaOH}}$ 298nm

分子式 : $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_9\text{O}_{13}$

元素分析 :

计算值 ($\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_9\text{O}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): C 56.56, H 6.77, N 12.63 %

实测值 : C 56.65, H 6.62, N 12.27 %

分子量 : FAB-MS m/z 984 (M+Na)⁺

红外吸收光谱:

ν	KBr	3400,	3300,	3060,	2980,	2940,	1735,	1710,
max		1690,	1670,	1660,	1640,	1540,	1520,	1470,
		1380,	1330,	1300,	1260,	1220,	1200,	1160,
		1130,	1090,	1000,	980 ,	940 ,	920	cm ⁻¹

¹H核磁共振谱:

(400MHz, CD ₃ OD) δ	
7.22-7.09	(3H, m)
6.88-6.77	(3H, m)
6.74	(1H, s)
6.46	(1H, s)
5.46	(1H, m)
5.18	(1H, s)
4.85	(1H, s)
4.77	(1H, m)
4.65	(1H, m)
4.50	(1H, m)
3.96	(1H, m)
3.91	(1H, d, J=9Hz)
3.60-3.47	(2H, m)
3.03	(1H, m)
2.90	(3H, s)
2.86	(1H, m)
2.59-2.49	(2H, m)
2.39	(1H, m)

2.29-2.16	(2H, m)
2.00	(1H, m)
1.84	(1H, m)
1.74	(3H, d, J=6Hz)
1.72-1.53	(4H, m)
1.44	(3H, d, J=6Hz)
1.12	(1H, m)
1.10	(6H, d, J=6Hz)
0.99	(3H, d, J=6Hz)
0.94	(3H, d, J=6Hz)

^{13}C 核磁共振谱:

(100MHz, CD_3OD) δ

179.7	(s)
176.3	(s)
174.7	(s)
173.3	(s)
172.4	(s)
171.4	(s)
170.3	(s)
165.8	(s)
160.2	(s)
145.7	(s)
145.6	(s)
137.5	(s)
134.0	(d)
131.4	(s)
130.6	(d) x 2
129.8	(s)
129.1	(d) x 2
129.1	(s)
127.6	(d)
119.1	(d)
118.0	(d)
76.0	(d)

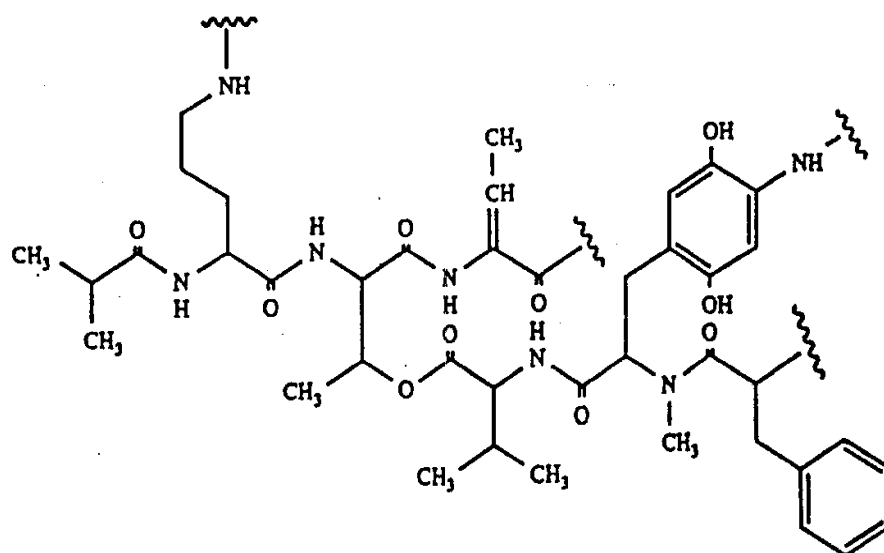
73.4	(d)
63.1	(d)
61.4	(d)
57.1	(d)
53.6	(d)
52.7	(d)
50.5	(d)
39.9	(t)
36.1	(t)
35.8	(d)
31.8	(q)
31.0	(t)
30.8	(d)
29.9	(t)
29.7	(t)
25.2	(t)
22.3	(t)
20.2	(q)
20.0	(q) x 2
19.7	(q)
19.5	(q)
13.3	(q)

氨基酸分析：

取WS 7 6 2 2 A (1 mg)，用 6 N HCl (1 ml) 在 110℃ 下水解 20 小时，然后将该混合物蒸发至干。所得混合物在日立 835 型自动氨基酸分析仪上进行分析。用氨基酸标准溶液 [采用 H 型 (Wako Chemicals 013-08391) 和 B 型 (Wako Chemicals 016-08641)] 作参比。

结果检测出苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸、NH₃ 和对茛三酮呈阳性的一些未知组分。

提出 WS 7 6 2 2 A 的部分化学结构如下：



WS 7622A 的盐可包括与无机或有机碱形成的盐，例如碱金属盐（例如钠盐、钾盐等）、碱土金属盐（例如钙盐等）、铵盐、乙醇胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐等。

用于制备本发明的 WS 7622A 单硫酸酯或二硫酸酯及其可药用盐的合适硫酸化试剂有：氯磺酸、氨基磺酸、二环己基碳二亚胺和硫酸的混合物、二环己基碳二亚胺和硫酸氢四丁铵的混合物、三氧化硫加合物（例如三氧化硫吡啶配合物、三氧化硫三甲胺配合物、三氧化硫三乙胺配合物、三氧化硫二噁烷配合物、三氧化硫二甲基苯胺配合物）等。

该反应通常在常规溶剂中进行，例如二氯甲烷、氯仿、苯、甲苯、吡啶、乙醚、二噁烷、四氢呋喃、丙酮、乙腈、乙酸乙酯、N，N-二甲基甲酰胺，或者对反应没有不利影响的任何其它有机溶剂。

反应温度并不关键，反应可在冷却、环境温度或加热条件下进行。

该反应最好在碱存在下进行。合适的碱可以是无机碱，例如碱金属或碱土金属氢氧化物（例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙等）、碱金属碳酸氢盐（例如碳酸氢钠、碳酸氢钾等）、碱金属或碱土金属碳酸盐（例如碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙等）、碱金属磷酸盐（例如磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾等）；也可以是有机碱，例如碱金属醇盐（例如甲醇钠、乙醇钾等）、胺（例如三乙胺、吡啶、二甲基吡啶等）。

WS 7 6 2 2 A 单硫酸酯或二硫酸酯及其可药用盐是新化合物，其中，WS 7 6 2 2 A 二硫酸酯的二钠盐和WS 7 6 2 2 A 二硫酸酯的二钾盐分别具有下列物化性质。

WS 7 6 2 2 A 二硫酸酯的二钠盐：

外观： 无色晶体

溶解性： 溶于水、甲醇

 不溶于氯仿、正己烷

熔点 : 257-263℃(分解)

旋光率 : $[\alpha]_D^{25} + 37.5^\circ$ (C=1.0, 甲醇)

分子式 : $C_{47}H_{61}N_9 O_{19}S_2 Na_2$

元素分析 : $(C_{47}H_{61}N_9 O_{19}S_2 Na_2 \cdot 6H_2 O)$

计算值: C 44.30, H 5.77, N 9.89, S 5.03, Na 3.61 %

实测值: C 44.98, H 5.90, N 10.06, S 5.00, Na 3.98 %

分子量 : FAB-MS m/z 1188 (M+Na)⁺

薄层层析：

固定相	展开剂	R f 值
硅胶	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O	0.11
(Merck Art 5715)	(65 : 25 : 4)	
	正丁醇-乙酸-水	0.29
	(4 : 2 : 1)	

红外吸收光谱(附图1):

KBr	
v	3360, 2960, 1735, 1660, 1640, 1530,
max	1500, 1380, 1250, 1200, 1060, 1030,
	940, 890 cm ⁻¹

¹H核磁共振谱(附图2):

(400MHz, D ₂ O) δ	
7.50	(1H, s)
7.27	(1H, s)
7.33-7.24	(3H, m)
6.94	(1H, q, J=7Hz)
6.85	(2H, br d, J=8Hz)
5.53	(1H, m)
5.37	(1H, m)
4.80	(1H, br s)
4.63-4.57	(2H, m)
4.53	(1H, m)
4.06	(1H, m)

3.99	(1H, d, J=10Hz)
3.56	(1H, br d, J=14Hz)
3.46	(1H, m)
2.97	(3H, s)
2.97-2.88	(2H, m)
2.72	(1H, m)
2.59	(1H, m)
2.51-2.38	(2H, m)
2.09-1.91	(4H, m)
1.82-1.60	(3H, m)
1.77	(3H, d, J=7Hz)
1.50	(3H, d, J=6.5Hz)
1.40	(1H, m)
1.11	(6H, d, J=7Hz)
0.99	(3H, d, J=6.5Hz)
0.97	(3H, d, J=6.5Hz)

^{13}C 核磁共振谱 (附图 3) :

(100MHz, D_2O) δ	
183.6	(s)
177.9	(s)
177.7	(s)
174.8	(s)
173.8	(s)
173.3	(s)
172.4	(s)
167.8	(s)
161.5	(s)
145.5	(s)
144.9	(s)
139.6	(d)
139.0	(s)
137.0	(s)

136.0	(s)
132.3	(d) x 2
131.0	(d) x 2
129.6	(d)
127.4	(d)
125.9	(d)
77.4	(d)
75.1	(d)
63.8	(d)
62.7	(d)
59.1	(d)
55.9	(d)
54.9	(d)
51.9	(d)
41.9	(t)
37.2	(d)
36.9	(t)
34.1	(q)
32.3	(d)
31.9	(t)
31.8	(t)
31.2	(t)
27.5	(t)
23.7	(t)
21.7	(q)
21.4	(q) x 2
21.3	(q)
21.1	(q)
15.5	(q)

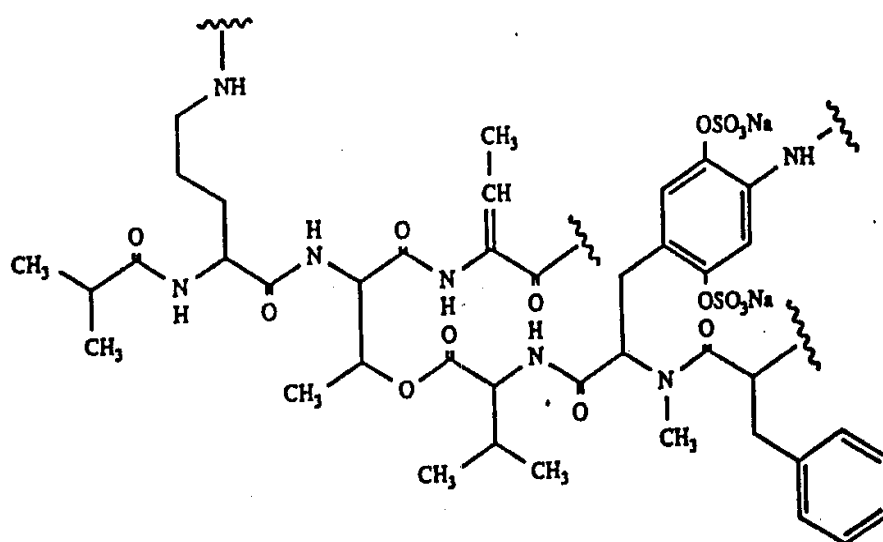
氨基酸分析：

取WS 7622A二硫酸酯的二钠盐（1mg），用6NHCl（1ml）在110℃下水解20小时，将该混合物蒸发至干。所得混合物用日立

835型自动氨基酸分析仪进行分析。用氨基酸标准溶液〔采用H型（Wako Chemicals 013-08391）和B型（Wako Chemicals 016-08641）〕作参比。

结果检测出苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸、 NH_3 和对茚三酮呈阳性的一些未知组分。

提出WS7622A二硫酸酯的二钠盐的部分化学结构如下：



WS7622A二硫酸酯的二钾盐：

外观：无色无定形粉末

溶解性： 溶于水、甲醇

不溶于氯仿、正己烷

熔点： 230—237℃（分解）

旋光率： $[\alpha]_D^{23} + 34^\circ$ (C=1.0, 甲醇)

分子式： $\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_{19}\text{S}_2\text{K}_2$

元素分析：

计算值 ($C_{47}H_{61}N_9O_{19}S_2K_2 \cdot 6H_2O$):

C 43.21, H 5.63, N 9.65, S 4.91, K 5.99 %

实测值: C 43.96, H 5.44, N 9.97, S 5.09, K 4.49 %

分子量 : FAB-MS m/z 1236 $(M+K)^+$

薄层层析：

固定相	展开剂	R f 值
硅胶 (Merck Art 5715)	$CHCl_3$ - CH_3OH - H_2O (65 : 25 : 4)	0.13

红外吸收光谱(附图4):

KBr ν_{max}	3360, 2960, 1735, 1660, 1640, 1530, 1500, 1405, 1380, 1250, 1200, 1050, 1030, 940, 890 cm^{-1}
--------------------	--

1H 核磁共振谱(附图5):

(400MHz, D_2O) δ	
7.52	(1H, s)
7.28	(1H, s)
7.34-7.25	(3H, m)
6.96	(1H, q, $J=7Hz$)
6.87	(2H, br d, $J=8Hz$)
5.56	(1H, m)

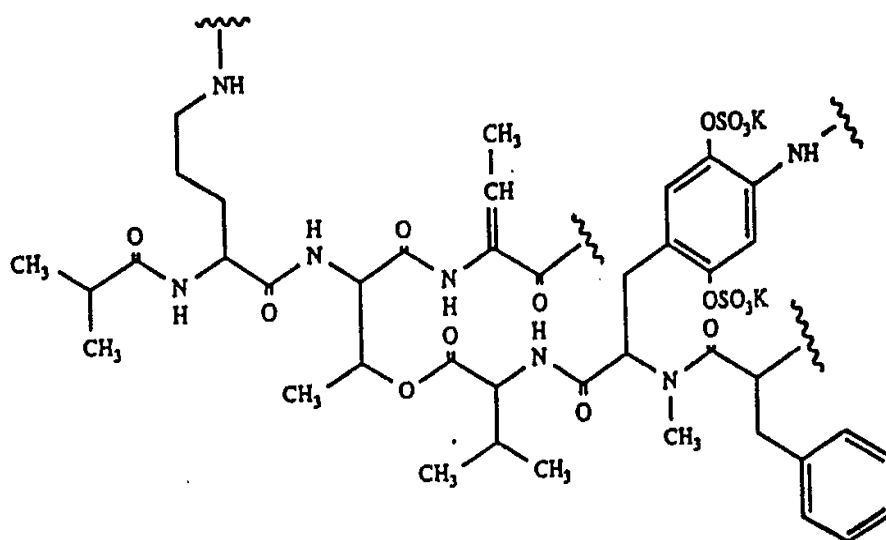
5.40	(1H, m)
4.84	(1H, br s)
4.70-4.55	(3H, m)
4.10	(1H, m)
4.03	(1H, m)
3.60	(1H, br d, J=14Hz)
3.50	(1H, m)
3.00	(3H, s)
3.00-2.85	(2H, m)
2.76	(1H, m)
2.62	(1H, m)
2.55-2.40	(2H, m)
2.12-1.95	(4H, m)
1.90-1.65	(3H, m)
1.79	(3H, d, J=7Hz)
1.53	(3H, d, J=6.5Hz)
1.45	(1H, m)
1.14	(6H, d, J=7Hz)
1.02	(3H, d, J=6.5Hz)
1.00	(3H, d, J=6.5Hz)

氨基酸分析：

取WS7622A二硫酸酯的二钾盐(1mg)，用6N HCl(1ml)于110℃下水解20小时，将该混合物蒸发至干。所得混合物用日立835型自动氨基酸分析仪进行分析。用氨基酸标准溶液[采用H型(Wako Chemicals 013-08391)和B型(Wako Chemicals 016-08641)]作参比。

结果检测出苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸、NH₃及对茛三酮呈阳性的一些未知组分。

提出WS7622A二硫酸酯的二钾盐的部分化学结构如下：



WS 7622A 单硫酸酯或二硫酸酯的可药用盐，可以包括与无机碱或有机碱形成的单盐或二盐，例如碱金属盐（例如钠盐、钾盐等）、碱土金属盐（例如钙盐等）、铵盐、乙醇胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐、吡啶盐等。

WS 7622A 单硫酸酯或二硫酸酯及其可药用盐，具有人白细胞弹性蛋白酶抑制活性，可作为人白细胞弹性蛋白酶抑制剂用于治疗或预防变性疾病，例如肺气肿、动脉粥样硬化、风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣、胰腺炎、成人呼吸窘迫综合症、囊性纤维变性、慢性支气管炎、支气管扩张等，进一步可用于治疗或预防哮喘、移植排拆、肾炎和脓毒病。

为说明WS 7622A 单硫酸酯或二硫酸酯及其可药用盐的有用性，下面给出其药理试验数据。

1. 蛋白酶抑制作用测定

(1) 方法:

整个测定中所使用的缓冲液为含 0.5 M NaCl 的 0.1 M HEPES ($\text{N}-(2\text{-羟乙基})\text{哌嗪}-\text{N}'-(2\text{-乙磺酸})$), $\text{pH} 7.5$ 。在 96 孔微量滴定板的各小孔中使 $25\text{ }\mu\text{l}$ 2 mM 甲氧基琥珀酰基- $(\text{Ala})_2\text{-Pro-Val-}$ 对硝基苯胺 (用缓冲液稀释 100 mM 二甲亚砜溶液) 和 $50\text{ }\mu\text{l}$ 样品 (用缓冲液将有机溶剂中的 $10\text{ }\mu\text{l}$ 样品稀释 5 倍) 混合。用微量滴定板读数器 (Corona Electric Co., Ibaraki, Japan) 测量该混合物在 415 nm 波长处的吸收。测量后, 加入 $25\text{ }\mu\text{l}$ $6\text{ }\mu\text{g/ml}$ 人胰弹性蛋白酶 (HSE), 并在室温下放置 30 分钟。然后测量 415 nm 处的光吸收。用 100 X ($1 - \text{有抑制剂时的 "r"} / \text{无抑制剂时的 "r"}$) 计算药物抑制百分比, 其中 "r" 为保温 30 分钟后的光吸收减去加酶前的光吸收。类似地测定抑制剂对其它蛋白酶的效果, 用 $\text{N}-\text{琥珀酰基}-(\text{Ala})_3\text{-}$ 对硝基苯胺测定猪胰弹性蛋白酶 (IV 型, 终浓度 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$), 用 $\text{N}-\alpha\text{-}$ 苯甲酰基-Arg-对硝基苯胺测定牛胰蛋白酶 (I 型, 终浓度 $16\text{ }\mu\text{g/ml}$), 用甲氧基琥珀酰基- $(\text{Ala})_2\text{-Pro-Met-}$ 对硝基苯胺测定牛胰糜蛋白酶 (II 型, 终浓度 $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$)。HSE 从 Elastin Products 公司 (MO, U.S.A) 得到。其它所有底物和蛋白酶都购自 Sigma 化学品公司。

(2) 结果:

WS 7622A 二硫酸酯的二钠盐和 WS 7622A 二硫酸酯的二钾盐对几种丝氨酸蛋白酶活性的抑制效果

I C ₅₀ (M)				
物质 (M)	人痰弹性 蛋白酶	猪胰弹性 蛋白酶	胰蛋白酶 (牛)	糜蛋白酶 (牛)
WS7622A二 硫酸酯的 二钠盐	3.5×10^{-8}	4.9×10^{-8}	1.8×10^{-4}	2.0×10^{-7}
WS7622A二 硫酸酯的 二钾盐	5.9×10^{-8}	4.9×10^{-8}	2.9×10^{-4}	2.0×10^{-7}

各结果均以 50 % 抑制浓度 (I C₅₀) 表示

2 . 弹性蛋白酶诱导的肺损伤作用中活性的测定

(1) 方法 :

使用受戊巴比妥麻醉的仓鼠。用带 27 号针头的 1 ml 注射器, 通过颈腹侧的小切口将生理盐水或含人痰弹性蛋白酶的生理盐水滴入气管内。

3 小时后, 用 CO₂ 窒息法处死动物, 再暴露出每只动物的气管。用 2 . 5 ml 等份生理盐水灌洗各只仓鼠的肺, 然后吸出生理盐水, 每只动物吸出终体积约为 1 . 5 ml 的支气管肺泡灌洗 (B A L) 液。

离心收集支气管肺泡灌洗液中的细胞, 然后用蒸馏水稀释使细胞破碎, 用分光光度法在 541 nm 处测定血红蛋白含量。

将试验药物溶于生理盐水中, 并以与滴注弹性蛋白酶所用方式相同的方式滴入气管内, 5 分钟后开始滴注弹性蛋白酶。

(2) 结果 :

对弹性蛋白酶诱导的肺出血的抑制效果

试验化合物	5 分钟前预剂量 (μg /部位)	出 血 (OD 541 nm)	%抑制
正常	-	0.31 ± 0.12	-
对照	-	29.35 ± 2.9	-
WS7622A二硫			
酸酯的二钠盐	1	$19.06 \pm 1.40^*$	35.4
	10	$9.75 \pm 4.82^*$	67.5
	100	$0.28 \pm 0.05^{***}$	100.1
WS7622A二硫酸	1	$19.71 \pm 1.20^*$	33.2
酯的二钾盐	10	$10.73 \pm 1.20^{**}$	64.1
	100	$0.35 \pm 0.16^{***}$	99.9

与对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ (“学生”
t 检验) 。

本发明的药物组合物可以以常规药物剂型使用, 例如注射剂、吸入剂、粉剂、细粒剂、粒剂、片剂、糖锭剂、微囊剂、胶囊剂、栓剂、溶液、悬浮剂、乳液糖浆剂等。如果需要, 可在所述组合物中配入稀释剂或崩解剂 (如蔗糖、乳糖、淀粉、结晶纤维素、低取代羟丙基纤维素、合成硅酸铝等)、粘合剂 (如纤维素、甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚丙基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、阿拉伯树胶、聚乙二醇等)、着色剂、甜味剂、润滑剂 (如硬脂酸镁等) 等。

所述本发明组合物的剂量取决于患者的年龄、体重、身体状况等，口服日剂量按目的化合物或其可药用盐计算一般为100mg-10g，优选1g-5g，以每日1-3次的间隔服用。典型的单位剂量可以是50mg、100mg、200mg、500mg、1g等，当然这些只是举例，并不是限定性的。

给出下列实施例以说明本发明。

实施例1

在300ml三颈烧瓶中装入三氧化硫三甲胺配合物(13.9g, Aldrich)、无水碳酸钾(6.9g)和WS7622A物质(10g)，并加入无水二甲基甲酰胺(50ml)，将该混合物在室温下剧烈搅拌过夜。

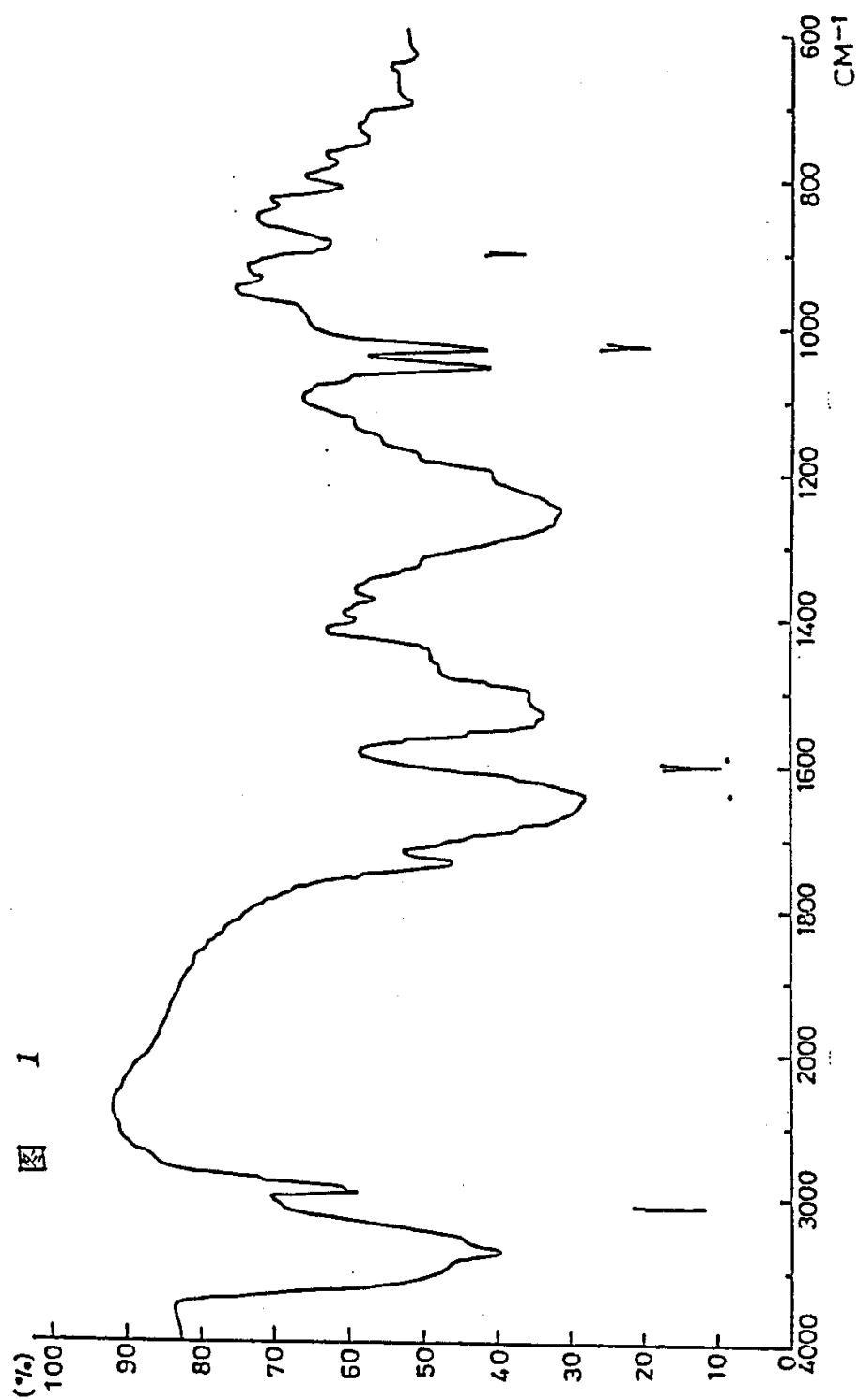
将混合物减压蒸发至干，残余物溶于冰水(300ml)中，并加到HP200ss柱(9.6×25cm)上。用水(10升)洗柱，用MeOH-H₂O(4:6)(2升)洗脱。收集产物部分并蒸发至干，得到粉末状物。将该粉末溶于水(70ml)中，使其通过AG50W-X4柱(Na⁺型，4×32cm, Bio-Rad Laboratories)，并蒸发至干。所得粉末(11.2g)用热乙醇(50ml)重结晶，得到10.6g WS7622A二硫酸酯的二钠盐，为无色晶体。

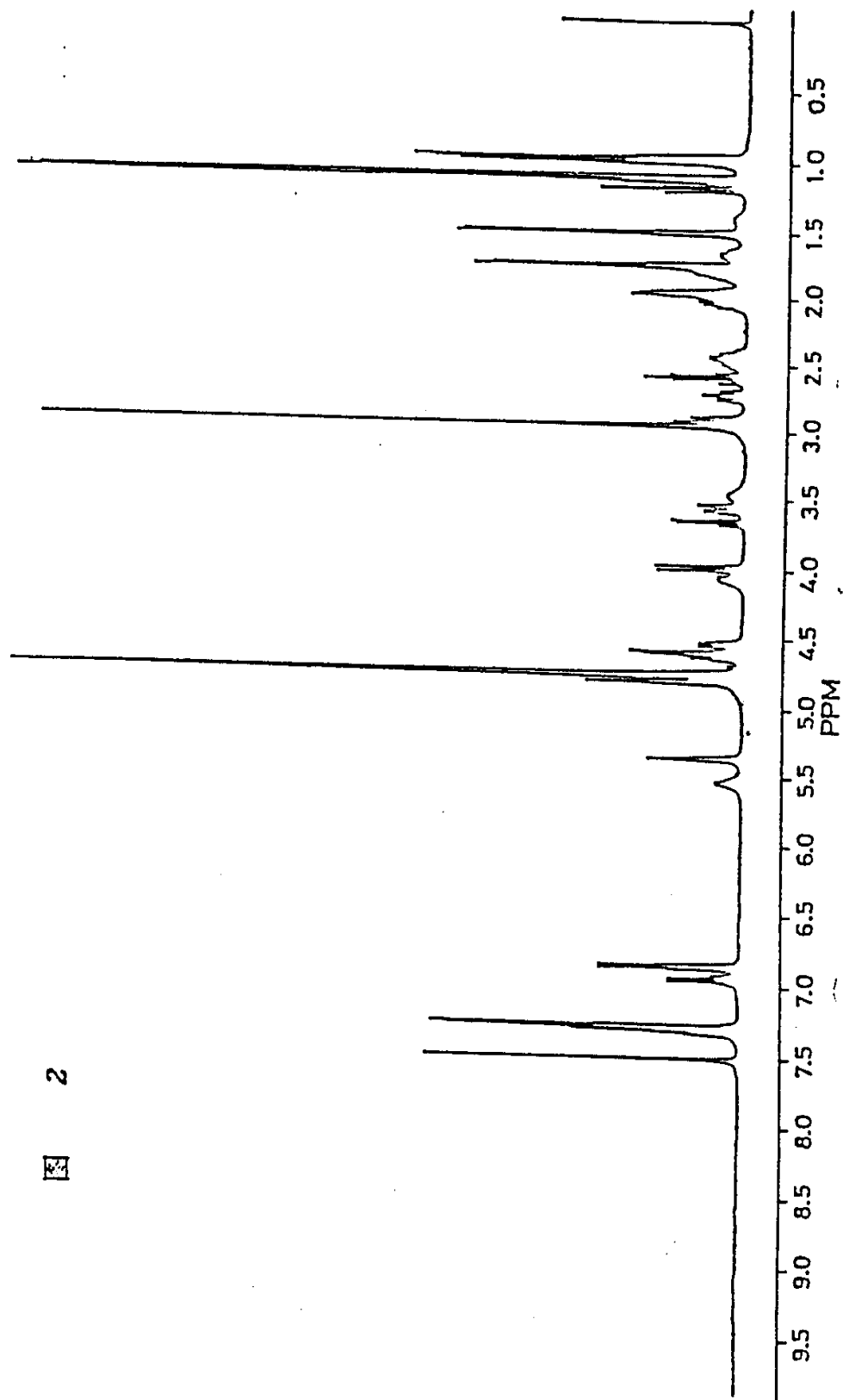
实施例2

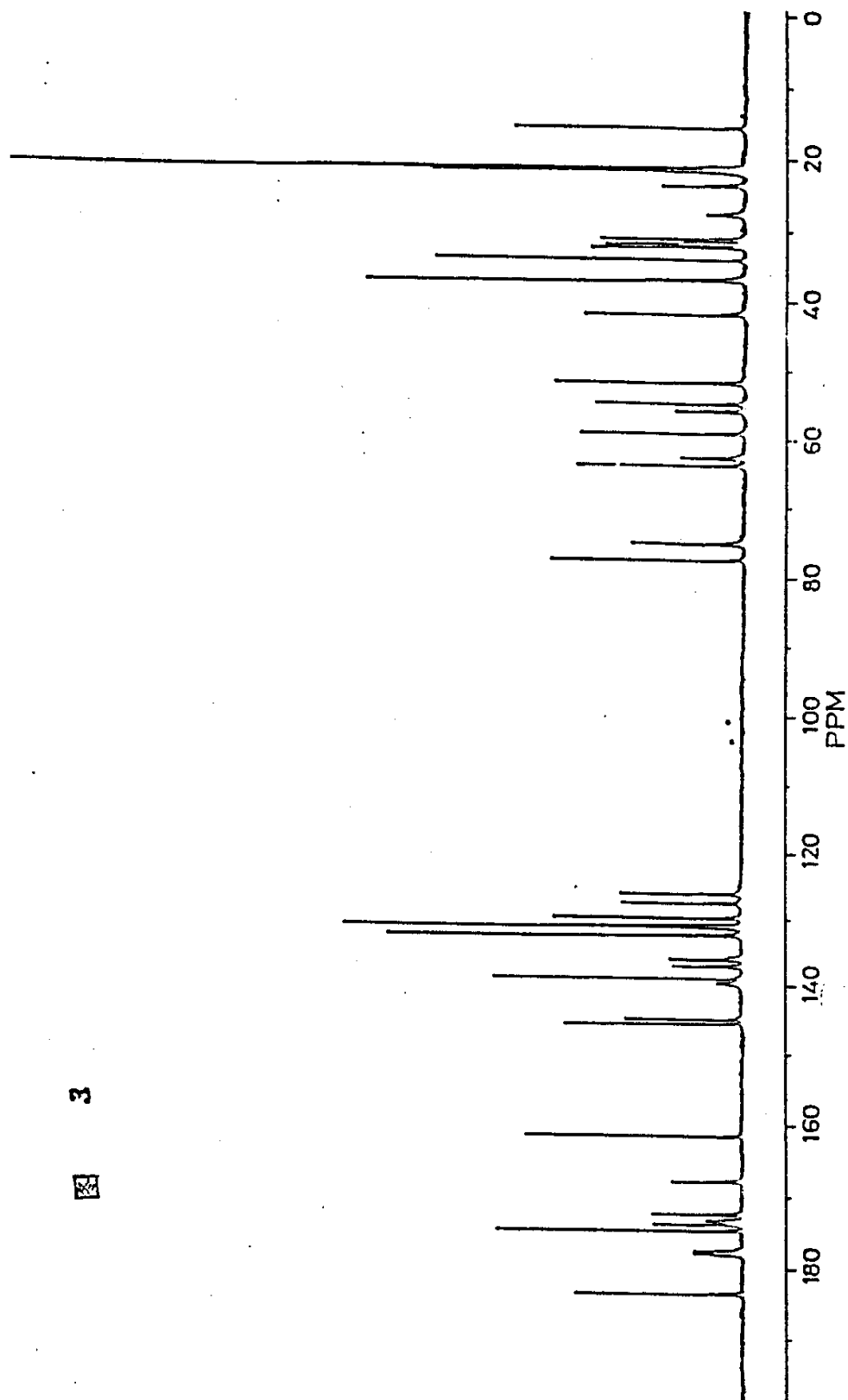
在300ml三颈烧瓶中装入三氧化硫三甲胺配合物(13.9g, Aldrich)、无水碳酸钾(6.9g)和WS7622A物质(10g)，并向其中加入无水二甲基甲酰胺(50ml)，将该混合物在室温下剧烈搅拌过夜。

将该混合物减压蒸发至干，残余物溶于冰水(300ml)中，并加

到HP 20 s s 柱(9 . 6 × 2 5 cm)上。用水(1 0 升)洗柱并用
M e O H - H ₂ O (4 : 6) (2 升)洗脱。收集产物部分并蒸发至干，
得到 1 1 . 8 g W S 7 6 2 2 A 二硫酸酯的二钾盐，为无色粉末。







3



Fig. 4

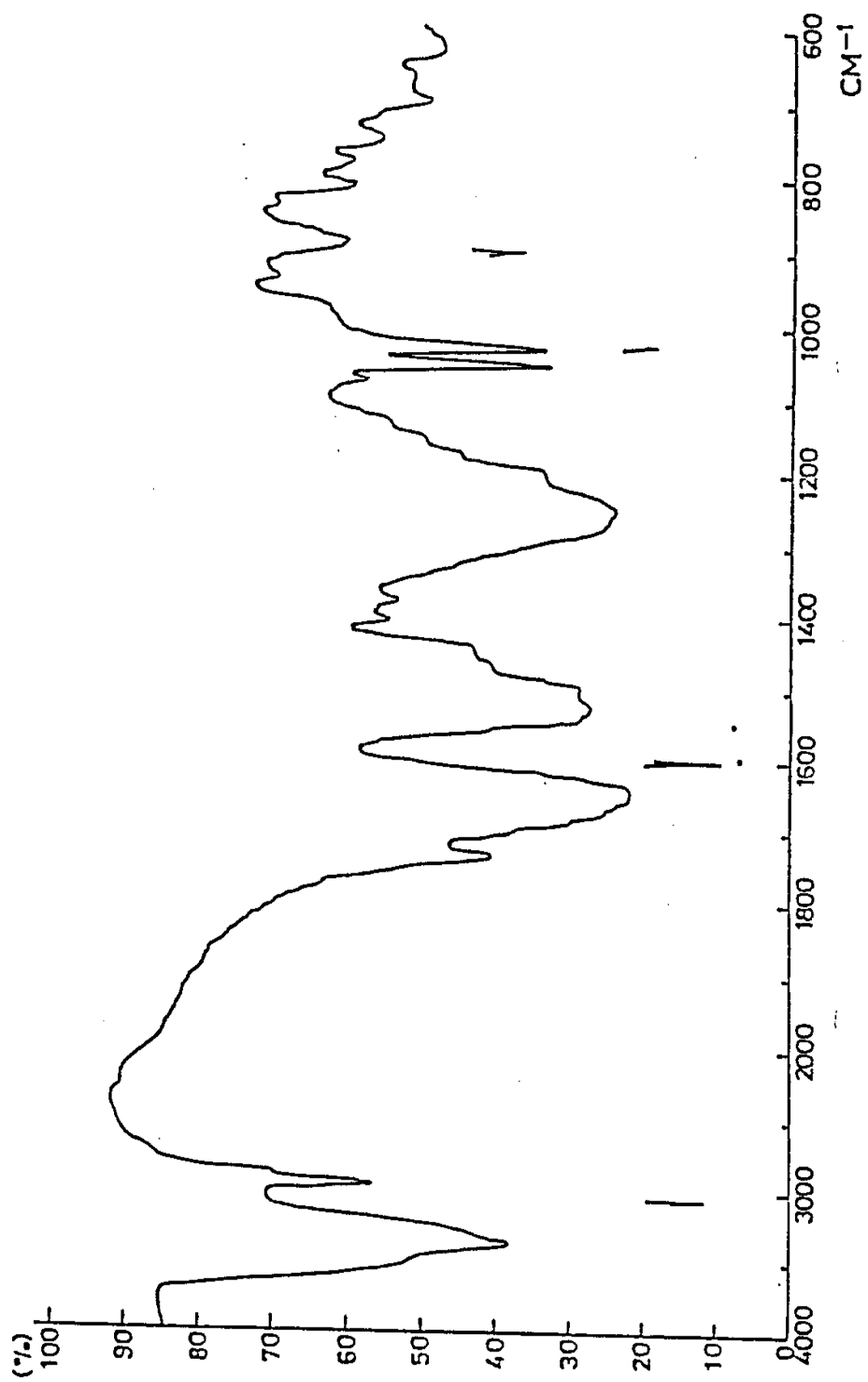


图 5

