

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 91103013.1

[51]Int.Cl⁶

C07C235 / 74

[45]授权公告日 1996年7月10日

[24]颁证日 96.3.30

[21]申请号 91103013.1

[22]申请日 91.5.11

[30]优先权

[32]90.5.12 [33]DE[31]P4015255.3

[73]专利权人 赫彻斯特股份公司

地址 联邦德国法兰克福

[72]发明人 埃柯哈德·巴得 哈拉得·布利哈德

沃科马·古泽勒-浦卡尔

C07C233 / 47

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商

C07C323 / 59 A61K 31 / 195

标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

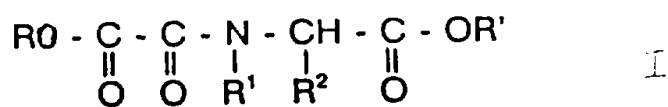
[54]发明名称 用作抑制脯氨酸羟化酶的药物的制备方法

[57]摘要

本发明涉及用作影响胶原和类胶原物质代谢或胶原合成的药物的制备方法，其包括将式 I 化合物，它们的 D—及 L—型为主的化合物及其药用盐与药用赋形剂混合物。

权 利 要 求 书

1. 影响胶原和类胶原物质代谢或原生物合成的药物的制备方法,其包括将式 I 的化合物,和它们的以 D—及 L—型为主的化合物和其药用盐与药用赋形剂混合



式中

R 和 R' 是相同或不相同且为 C₁—C₆的烷基或氢,

R¹是氢或 C₁—C₄ 烷基,

R²是氢或 C₁—C₆ 烷基, C₁—C₃ 烷氧基,羟基, C₁—C₆ 烷氧羰基,芳基, SH, NH₂ 或氢,这里烷基是未被取代或者被芳基, OH, SH 或 NH₂ 取代,或

R¹ 和 R² 一起是 C₂—C₄亚烷基链。

2. 如权利要求 1 所要求的方法,其中 R 和 R' 是相同或不同的 C₁—C₃烷基, Na 或 K,

R¹ 是氢,甲基或乙基,

R²是氢或 C₁—C₄烷基,这里烷基是未被取代或被苯基或 SH 取代或

R^1 和 R^2 一起形成 C_2 或 C_3 亚烷基链。

3. 如权利要求 1 所要求的方法, 其中, R 和 R^1 是相同的, 为甲基, 乙基, Na 或 K ,

R^1 是或甲基,

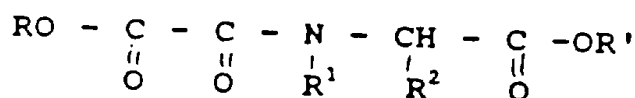
R^2 是氢, C_1-C_3 烷基, 苄基或硫甲基,

或

R^1 和 R^2 一起形成亚乙基链。

用作抑制脯氨酸羟化酶的药物制备方法

草酰氨基酸衍生物是已知的，例如，在FR-A 2,010,601, JP43/10614或生物化学(Biochemistry), 27(8), 2934-2943(1988)中叙述过。然而，这些化合物用作药物，以前并未叙述过。现已发现式I的草酰氨基酸衍生物和其主要以钝D-型和L-型的化合物及其药用盐是脯氨酸羟化酶和赖氨酸羟化酶的良好抑制物，



其中

R和R'是相同或不同的C₁-C₆烷基或H，

R'是H或C₁-C₄-烷基，

R²是H，C₁-C₆-烷基，C₁-C₃-烷氧基，羧基，C₁-C₆-烷氧羰基，芳基，SH，NH₂或卤素，这里的烷基是未被取代或者被芳基，OH，SH，或NH₂基团取代，

或者

R¹和R²一起构成C₂-C₄-亚烷基链。

本发明涉及上述化合物作为药物的用途，特别是用作影响胶原和类胶原物质的代谢或生物合成的药物。

本发明尤其涉及式I中如下取代时的那些化合物的应用，其中R和R'是相同或不同的C₁-C₃-烷基，Na或K，R'是氢，甲基或乙

基，

R^2 是氢或 C_1-C_4 -烷基，这里的烷基是未取代或被苯基或 SH 取代或。

R^1 和 R^2 一起形成 C_2 -或 C_3 -亚烷基链。

式 I 中的化合物的用途在如下的情况时是特别好的，其中， R 和 R^1 是相同的甲基，乙基，Na 或 K， R^1 是氢或甲基，

R^2 是氢， C_1-C_3 -烷基，苄基或硫甲基，或

R^1 和 R^2 一起形成亚乙基链。

有 3 个或更多碳的烷基可以是直链和支链。芳基其含意可理解为芳香烃类，特别是苯基和萘基。卤素可认为是 F，Cl，Br 和 I，特别是 Cl 和 Br。

式 (I) 的化合物的制备是已知的，例如在 FR-A 2,010,601 中所述。其制备方法只不过是将 1-3 当量的氨基酸酯氢卤酸盐，(最好是盐酸盐) 和 1-5 当量的碱合并，这里使用的碱例如碳酸盐或碳酸氢盐，如碳酸钠或碳酸钾，或碳酸氢钠或碳酸氢钾，或者为叔胺，如三乙胺，三丁胺，乙基二异丙胺，或者为杂环胺如 N-烷基吗啉，吡啶，喹啉或二烷基苯胺。

如果需要，许多碱可同时使用。反应温度是 -30°C 到 150°C ，以 20°C 到 100°C 较好。如果需要，反应也可在溶剂中进行，如乙醚或二甲氧基乙烷或四氢呋喃，氯化烃类如二氯甲烷，氯仿，三或四氯乙烯，苯，甲苯以及极性溶剂如二甲基甲酰胺，丙酮，醇类如甲醇或乙醇或二甲基亚砷。然后在 -78°C 和 100°C 之间，最好是在

-20°C和+20°C之间慢慢加1-3当量草酸酐酰氯。如果需要，该反应也可在上述溶剂中进行。用薄层层析检测反应是否完全。

如果需要，可用例如提取或者用硅胶层析处理产物，分离的产物可用重结晶纯化。

式I的R和/或R'为碱金属，例如Na或K的化合物可以用如下方法制备，例如由式I的R和/或R'为C₁-C₄-烷氧基的相应化合物在碱性介质中水解，如NaOH或KOH，溶剂为低分子量醇中如甲醇或乙醇，或者在醚中如二甲氧基乙烷或四氢呋喃，如果需要可有水存在。所得盐的金属阳离子可用常规的方法通过离子交换剂酸化，以任何所需的阳离子取代。为此，例如将酸通过装有阳离子交换剂的柱子，这种交换剂例如是基于聚苯乙烯/二乙烯苯(Amberlite CG-150或[®]Dowex-CCR-2)的树脂。阳离子交换剂载有所要的阳离子，例如铵离子，是由伯胺、仲胺或叔胺产生的。洗脱液经蒸发可得所要的盐。

由伯、仲或叔胺产生的酸的铵盐也可用下法制备，即向游离酸的醇溶液加等摩尔量的适当的胺，然后蒸掉溶剂即可。

由外消旋物制备以D-或L-对映体为主的纯化合物，同样可用文献已知的方法进行，例如，用分步结晶法或用酶处理法进行。另外一种可行的方法是由适当的D-或L-前体(起始物)直接合成纯的对映体化合物。

本发明的物质作为可逆的抑制剂对脯氨酸羟化酶是有效的。因此，这些物质选择性地抑制胶原特异的羟化反应，在该反应过程中，脯氨酸羟化酶羟化结合于蛋白中的脯氨酸。该反应在抑制剂的作用下，形成无功能的、羟化不全的胶原分子，该类分子只有少量释放入细胞间

隙中。羟化不全的胶原不能另外参入到胶原基质中，而很容易发生蛋白水解性的降解过程。由于这些作用，细胞外沉积的胶原总量减少。因此，脯氨酸羟化酶抑制剂在治疗主要由于胶原沉积引起的征候群方面是适宜的手段。其中特别包括肺、肝和皮肤（硬皮病）的纤维化以及动脉粥样硬化。

另外，用已知的抑制剂如 α ， α' -联吡啶对脯氨酸羟化酶的抑制导致巨噬细胞的生物合成胶原的抑制也是已知的 (W. Muller et al, FEBS Lett, 90, 218 以及下列等等 (et seq)(1978))。结果不能发生补体活化经典的途径；因此，脯氨酸羟化酶抑制剂在像免疫综合症方面也起免疫抑制剂的作用。

因此，本发明的物质可用作纤维化抑制剂，免疫抑制剂及抗动脉粥样硬化剂。

抗纤维化的活性可用四氯化碳诱发的肝纤维变性模型测定。为此，用溶在橄榄油中的 CCl_4 (1ml / kg) 处理大鼠每周两次。受试物质溶在适宜的溶剂每天给药，如果合适甚至可每天给两次，口服或腹腔注射。用组织学方法测定肝纤维变性的程度和用测定羟基脯氨酸分析肝中胶原的比例，如 Kivirikko et al. 在 (Anal. Biochem, 19, 249 等等 (1967)) 所述。纤维发生的活力可用放射免疫测定血清中的胶原组分和原胶原肽。本发明的化合物在浓度为 1-100mg/kg 时对这种模型是有效的。另一个评价抗生活性的模型是 Kelley 等 (J. Lab. Clin. Med, 96, 954, (1980) 叙述的博莱霉素诱发的肺纤维变性。为评价本发明化合物对肉芽发生组织的活性，可用 Meier 等在 Experimentia 6, 469 (1950) 中叙述的棉球肉芽肿模型进行试验。

本发明用以下实例更详细的阐明

实例

制备实例 1 - 6 中化合物的通用方法。

在室温氮气下，将 1 当量氨基酸酯盐酸盐，2 当量三乙胺和 2 当量 N，N-二甲胺基吡啶先加到二氯甲烷中。然后在 0°C - 10°C 慢慢滴加溶在二氯甲烷的 1 当量草酸酯酰氯。混合物在室温搅拌 1 2 小时，加入饱和碳酸氢钠溶液后提取。分出有机层，用氯化钠溶液洗涤，硫酸镁干燥并蒸发。得到的粗产物进行层析。

实例 1

(N-草酰基) - L - 丙氨酸二甲酯

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

由 5 g L-丙氨酸甲酯盐酸盐和 3.3 ml 草酸甲酯酰氯得 6 g 油状实例 1 的化合物 (层析: EA / CH₂OH 5 / 1)

实例 2

(N-草酰基) - L - 苯丙氨酸二甲酯

$R = R' = CH_3$; $R^1 = H$; $R^2 = CH_2C_6H_5$

由 5 g L-苯丙氨酸甲酯盐酸盐和 2.2 ml 草酸甲酯酰氯得 6.5 g 实例 2 的油状化合物 (层析: EA / CH₂OH 5 / 1)

实例 3

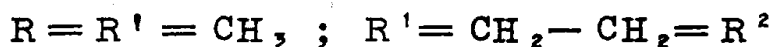
(N-草酰基) - L - 甘氨酸二甲酯

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

由 15 g 甘氨酸甲酯盐酸盐和 11 ml 草酸单甲酯酰氯得到 23 g 实例 3 的化合物; m. p. 49°C (层析: EA)

实例 4

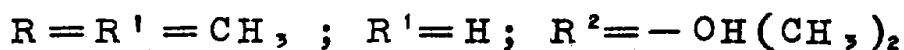
(N-草酰基)-L-脯氨酸二甲酯



由 2 g L-脯氨酸甲酯盐酸盐和 2.9 g 草酸单甲酯酰氯得 1.5 g 油状物 (层析: EA)

实例 5

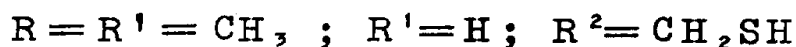
(N-草酰基)-L-缬氨酸二甲酯



由 2 g L-缬氨酸甲酯盐酸盐和 2.8 g 草酸单甲酯酰氯得 2 g 油状物 (层析: CH/EA 1/1)

实例 6

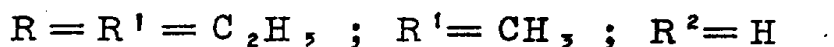
(N-草酰基)-L-半胱氨酸二甲酯



由 2 g L-半胱氨酸甲酯盐酸盐和 3.9 g 草酸单甲酯酰氯得 1.5 g 油状物 (层析: CH/E 1/1)

实例 7

(N-草酰基)-肌氨酸二乙酯



先将 2 g 肌氨酸乙酯盐酸盐加到 50 ml 乙醇中, 室温下滴加 3.5 ml (2 当量) 草酸二乙酯和 1.8 ml 三乙胺在 25 ml 乙醇中的溶液。在 50°C 搅拌 5 小时, 然后回流 2 小时。溶液冷却并蒸发至干。

用二氯甲烷溶解剩余物，水洗一次，有机相经硫酸镁干燥并蒸除溶剂。
粗产物进行层析（EA/CH₂Cl₂/1）

产量：0.35 g

制备实例8-14中的化合物的通用方法：

将1当量实例1-7的化合物在室温下溶于2当量的0.1 N碱金属氢氧化物的醇溶液。混合物在室温搅拌12小时并蒸发干。剩余物用甲苯蒸发两次，用戊烷洗涤数次，然后在高真空中干燥。

实例8

（N-草酰基）-L-丙氨酸二钾盐

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

300 mg 实例1的化合物与32.5 ml 0.1 N 氢氧化钾乙醇溶液反应。

产量：370 mg 白色结晶，m. p. : >300°C

实例9

（N-草酰基）-L-苯丙氨酸二钠盐

$R = R' = Na; R^1 = H; R^2 = CH_2 C_6H_5,$

420 mg 实例2的化合物与32.5 ml 0.1 N 氢氧化钠甲醇溶液反应。

产量：440 mg 白色结晶，m. p. : >300°C

实例10

（N-草酰基）-L-甘氨酸二钾盐

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

5. 5 g 实例 3 的化合物与 31.4 ml 0.1 N 氢氧化钾甲醇溶液反应。

产量: 5.4 g 白色结晶, m. p: $>300^{\circ}\text{C}$

实例 11

(N-草酰基)-L-脯氨酸二钠盐

$R = R^1 = \text{Na}; R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_2 = R^2$

300 mg 实例 4 的化合物与 1.5 ml 0.1 N 的氢氧化钠乙醇溶液反应。

产量: 290 mg 白色结晶, m. p: $>300^{\circ}\text{C}$

实例 12

(N-草酰基)-L-缬氨酸二钠盐

$R = R^1 = \text{Na}; R^1 = \text{H}; R^2 = \text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$

300 mg 实例 6 的化合物与 13.7 ml 0.1 N 氢氧化钠甲醇溶液反应。

产量: 300 mg 白色结晶, m. p: $>300^{\circ}\text{C}$

实例 14

(N-草酰基)-肌氨酸二钾盐

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

120 mg 实例 7 的化合物与 11.4 ml 0.1 N 氢氧化钾乙醇溶液反应。

产量：130 mg 白色结晶，m. p. : >300°C

实例 1-14 的化合物列于下表 (表 1)

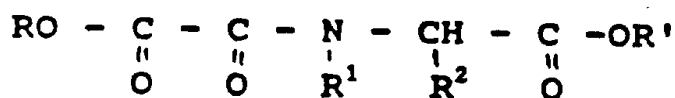


表 1
实例

	R	R'	R ¹	R ²	M. p. / 油
1	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	油
2	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ C ₆ H ₅	油
3	CH ₃	CH ₃	H	H	49°C
4	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -----	CH ₂	Oil
5	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₃) ₂	Oil
6	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ SH	Oil
7	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃	H	Oil
8	K	K	H	CH ₃	> 300°C
9	Na	Na	H	CH ₂ C ₆ H ₅	> 300°C
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

本发明的化合物对酶活性的抑制测定类似于 B. Peterkofsky

和 R. DiBlasio (Anal. Biochem. 66, 279-286, (1975)) 的方法。该试验是在二价铁离子, α -酮戊二酸和抗坏血酸的存在下, 用酶法使脯氨酰羟化酶羟化那些羟化不全的胶原, 以抑制酶活性 80% (以 K_i 表示其值) 来计算本发明化合物的抑制浓度

实例 8 和 10 的化合物的结果列于表 2。

表 2 (盐类)

化合物	K_i [mM]
实施例 8	0.04
实施例 10	0.01

也可用细胞或组织培养法测定抑制活性。为此, 可应用成纤维细胞或其它产生胶原的细胞或颅盖, 或者产生胶原的细官。本发明物质对颅盖培养基的抑制活性列于表 3。用代谢标记¹⁴C 的脯氨酸测定法使羟基脯氨酸/脯氨酸比值减少 50% 表示其抑制浓度 (IC_{50})。

表 3 (酯类)

化合物	IC_{50} [mM]
实施例 1	0.35
实施例 3	0.002