

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07C323/58



[12] 发明专利说明书

C07C323/59 A61K 31/195

A61P 11/06 A61P 19/02

A61P 25/06 A61P 1/00

[21] ZL 专利号 98803186.8

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1149190C

[22] 申请日 1998.1.9 [21] 申请号 98803186.8

[30] 优先权

[32] 1997. 1. 13 [33] US [31] 08/783402

[86] 国际申请 PCT/EP1998/000096 1998.1.9

[87] 国际公布 WO98/030537 英 1998.7.16

[85] 进入国家阶段日期 1999.9.8

[71] 专利权人 葛兰素集团有限公司

地址 英国英格兰

[72] 发明人 R·M·贝姆斯

M·J·德赖斯达勒

K·W·弗兰兹曼 A·J·弗伦德

H·F·霍德逊 R·G·诺勒斯

D·D·雷斯 D·A·肖耶尔

审查员 陈 矛

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

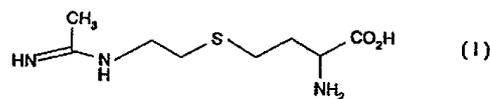
代理人 周慧敏

权利要求书 2 页 说明书 17 页

[54] 发明名称 一氧化氮合成酶抑制剂

[57] 摘要

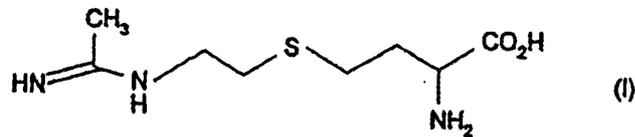
本发明涉及新的式(I)脒基化合物、它们的生产方法、含有它们的药用组合物以及它们的医疗用途，特别是它们作为诱导型一氧化氮合成酶的选择性抑制剂的用途。



ISSN 1008-4274

1. 式(I)化合物或其盐、溶剂化物、酯、酰胺或氨基甲酸酯

5



10 2. 式(I)化合物, 选自下列化合物或其盐、溶剂化物、酯、酰胺或氨基甲酸酯:

(R/S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-DL-高半胱氨酸

(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸; 和

(R)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-D-高半胱氨酸。

15 3. 式(I)化合物, 它为(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸或其盐、溶剂化物、酯、酰胺或氨基甲酸酯。

4. 药用组合物, 它包括权利要求 1-3 中任一项所定义的式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、酯、酰胺或氨基甲酸酯, 和药学上可接受的载体或赋形剂及任选一种或多种其它的治疗成份。

20

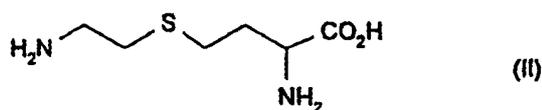
5. 权利要求 1-3 中任一项所定义的式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、酯、酰胺或氨基甲酸酯在生产用于预防或治疗与 NO 合成酶抑制剂有关的临床疾病的药物中的用途。

6. 按照权利要求 5 的用途, 其中所述临床疾病选自关节炎、哮喘、慢性阻塞性肺部疾病、肠梗阻和偏头痛。

25

7. 制备式(I)化合物或其盐、溶剂化物、酯、酰胺或氨基甲酸酯的方法, 该方法包括:

(i)使式(II)化合物或其对映体、盐或其保护的衍生物



5 与式(II)化合物或其盐



- 10 反应，其中 L 为离去基团；然后按任意顺序进行下面几步步骤：
 (ii) 任选移去任何的保护基；
 (iii) 任选从对映体的混合物中分离对映体；
 (iv) 任选转化产物为相应的盐、溶剂化物、酯、酰胺或氨基甲酸酯。

8. 选自下列的化合物

- 15 (R,S)-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯；和
 (S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯。

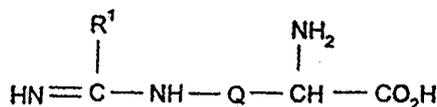
一氧化氮合成酶抑制剂

5 本发明涉及新的脘基化合物、它们的生产方法、含有这些化合物的药用组合物以及它们的医疗用途，特别是它们作为诱导型一氧化氮合成酶的选择性抑制剂的用途。

一氧化氮是可溶性鸟苷酸环化酶的内源性刺激物，并与一系列的生物作用有关。人们认为一氧化氮的过量产生与许多疾病有关，
10 这些疾病包括：脓毒性休克和炎性疾病。一氧化氮的生化合成为是一氧化氮合成酶催化由 L-精氨酸合成的。许多一氧化氮合成酶抑制剂被描述和被推荐作为药物使用。

最近，本领域的目标为提供一氧化氮合成酶抑制剂，相对于内皮一氧化氮合成酶(eNOS)而言，这些抑制剂可选择性抑制诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)或神经元一氧化氮合成酶(nNOS)。
15

因此，WO93/13055 描述了作为一氧化氮合成酶的选择性抑制剂的下式化合物及其盐、药学上可接受的酯和酰胺：



20 其中

R_1 为 C_{1-6} 直链或支链烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基或 C_{3-6} 环烷基 C_{1-6} 烷基；

Q 为被一个或多个 C_{1-3} 烷基任选取代的 3-6 个碳原子的亚烷基、亚链烯基或亚炔基；

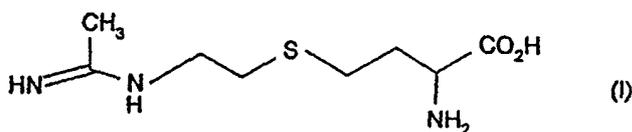
25 式 $-(\text{CH}_2)_p\text{X}(\text{CH}_2)_q-$ 基团，其中 p 为 2 或 3， q 为 1 或 2，而 X 为 $\text{S}(\text{O})_x$ 其中 x 为 0、1 或 2， O 或 NR^2 其中 R^2 为 H 、 C_{1-6} 烷基；

式 $-(\text{CH}_2)_r\text{A}(\text{CH}_2)_s-$ 基团，其中 r 为 0、1 或 2， s 为 0、1 或 2， A 为可

以被一个或多个适宜的取代基任选取代的 3-6 元碳环或杂环，所述取代基如： C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羟基、卤素、硝基、氰基、三氟 C_{1-6} 烷基、氨基、 C_{1-6} 烷氨基、二 C_{1-6} 烷氨基。

我们发现，WO93/13055 范围内的化合物(也是 iNOS 的选择性抑制剂)体内给予时显示长的半衰期和可以口服生物利用的优点。

因此，本发明提供了式(I)化合物或其盐、溶剂化物或生理官能衍生物



式(I)在氨基酸基团上有一个不对称中心，虽然优选天然的 L 或(S)型精氨酸，但是式(I)化合物包括基本纯形式或以任何比例混合的(S)和(R)对映体。因此，本发明提供选自下列的化合物及其盐、溶剂化物和生理官能衍生物：

- (R/S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-DL-高半胱氨酸
 (S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸；和
 (R)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-D-高半胱氨酸。

在优选的方面，本发明提供(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸或其盐、溶剂化物或生理官能衍生物。在特别优选的方面，本发明提供(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸或其盐。

适合用作药物的式(I)化合物的盐和溶剂化物为这样的化合物，其中的抗衡离子或缔合溶剂是药学上可以接受的。然而，本发明的范围包括药学上不能接受的抗衡离子或缔合溶剂的盐和溶剂化物，例如，在制备其它式(I)化合物以及它们的药学上可以接受的盐、溶剂化物和生理官能衍生物时，作为中间体。

术语“生理官能衍生物”意指与游离的式(I)化合物具有相同生理功能的式(I)化合物的化学衍生物，例如可在体内转化为(I)化合物。

根据本发明，生理官能衍生物的实例包括酯、酰胺、氨基甲酸酯，优选酯和酰胺。

5 根据本发明，适宜的盐包括与有机和无机酸或碱形成的盐。药学上可接受的盐包括与下列酸形成的酸加成盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、三氟乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、丁酮二酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸及羟乙磺酸。药学上可接受的碱式盐包括铵盐、碱金属盐如钠盐和钾盐、碱土金属盐如钙盐和镁盐以及与有机碱如二环己基胺和 N-甲基-D-葡萄糖胺形成的盐。

10 式(I)化合物的药学上可接受的的酯和酰胺可具有可转化为 C_{1-6} 烷基、芳基、芳基 C_{1-6} 烷基、或氨基酸酯或酰胺的酸性基团；式(I)化合物药学上可接受的酰胺和氨基甲酸酯可具有可转化为 C_{1-6} 烷基、芳基、芳基 C_{1-6} 烷基、或氨基酸酰胺或氨基甲酸酯的氨基基团。

15 如上所述，式(I)化合物是一氧化氮合成酶抑制剂，这一点在下面的 NOS 抑制测定中证明。

因此，式(I)化合物及其药学上可以接受的盐、溶剂化物和生理官能衍生物可以用于治疗与 NO 合成酶抑制剂(特别是 Inos 抑制剂)有关的临床病症。这些病症包括炎症性疾病、休克状态、免疫疾病及胃肠蠕动紊乱等。式(I)化合物及其药学上可以接受的盐、溶剂化物和生理官能衍生物也可用于预防和治疗中枢神经系统疾病包括偏头痛。

25 NO 的过量产生引起休克，如脓毒性休克、出血性休克、创伤性休克、由爆发性肝衰竭引起的休克、或由于用细胞因子如 TNF、IL-1 和 IL-2 进行治疗或用细胞因子诱导剂如 5,6-二甲基咕吨酮乙酸治疗时引起的休克。

炎症性疾病及免疫性疾病的实例包括关节疾病，特别是关节炎(例如类风湿性关节炎、骨关节炎、假体关节衰退)、或胃肠道疾病(例如溃疡性结肠炎、节段性回肠炎、其它炎性肠疾病、胃炎以及由于感

5 染引起的粘膜炎症、由非甾体抗炎药引起的肠病)、肺部疾病(例如成人呼吸窘迫综合征、哮喘、囊纤维化、或慢性阻塞性肺部疾病)、心脏疾病(如心肌炎)、神经组织疾病(如多发性硬化症)、胰腺疾病(如糖尿病及并发症)、肾疾病(如肾小球性肾炎)、皮肤病(如皮炎、牛皮癣、湿疹、荨麻疹)、眼部疾病(如青光眼)、移植器官疾病(如排斥反应)、多器官疾病(如系统性红斑狼疮)及病毒和细菌感染后的炎性后遗症。

此外,有证据表明在动脉粥样硬化症和伴随缺氧或局部缺血损害(有或无再灌注),例如脑部或心脏局部缺血疾病中,由 iNOS 催化产生了过量的 NO。

10 胃肠蠕动紊乱包括肠梗阻,如术后肠梗阻和脓毒症期间肠梗阻。

中枢神经系统疾病指与 NO 的过量产生有关的疾病,如偏头痛、精神病、焦虑、精神分裂症、睡眠障碍、大脑局部缺血、CNS 损伤、癫痫、多发性硬化症、AIDS 痴呆、慢性神经变性疾病(如 Lewy Body 痴呆、亨廷顿氏舞蹈病、帕金森病或老年性痴呆)、尖锐和慢性疼痛等,以及可能与非肾上腺素能神经和非胆碱能神经有关的疾病如阴茎异常勃起、肥胖和饮食亢进。

15 尖锐疼痛的实例包括肌与骨骼的疼痛、术后疼痛、手术疼痛;慢性疼痛的实例包括慢性炎症疼痛(如类风湿性关节炎和骨关节炎)、神经性疼痛(如带状疱疹后的神经痛、与糖尿病相关的糖尿病性神经病、三叉神经痛、与功能性紊乱如过敏性肠综合征相关的疼痛、非心脏的胸部疼痛及持续的交感神经痛)、癌症疼痛和纤维肌痛(fibromyalgia)。

20 此外,一氧化氮合成酶的抑制可能有助于预防与 HIV 感染有关的淋巴细胞的丢失、增加放射治疗期间肿瘤细胞的放射敏感性、降低肿瘤的生长、肿瘤发展、血管生成和肿瘤转移。

25 因此,本发明提供预防或治疗哺乳动物(如人类)与 NO 合成酶抑制剂(例如 iNOS 抑制剂)有关的临床疾病的方法,该方法包括给予有效治疗量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官

能衍生物。具体地讲本发明提供了预防或治疗炎性和/或免疫性疾病，如关节炎和哮喘的方法。在优选的方面，本发明提供预防或治疗关节炎、哮喘、肠梗阻和偏头痛等临床病症的方法。

5 另外，也提供了式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官能衍生物，它们可以用于医疗中，具体地讲它们可以用于预防或治疗哺乳动物(如人)的与 NO 合成酶抑制剂(例如 iNOS 抑制剂)有关的临床疾病。具体地讲我们提供了式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官能衍生物，它们可以用于预防或治疗炎性和/或免疫性疾病，如关节炎和哮喘。在优选的方面，我们提供式(I)
10 化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官能衍生物用于预防或治疗关节炎、哮喘、肠梗阻和偏头痛。

所需的获得治疗作用的式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官能衍生物的量当然因具体的化合物、给药途径、治疗对象、具体的疾病及所治疗的疾病而变化。本发明的化合物可口服给药或注射给药，剂量为 0.1-1500mg/kg/d，优选 0.1-500mg/kg/d。通常成人的剂量范围为 5mg-35g/d，优选为 5mg-2g/d。以独立的单位提供的片剂或其它成品规格形式含本发明化合物的单位有效量或多倍有效量，例如为 5mg-500mg，通常在 10mg-200mg 的范围内。

15 当式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理功能衍生物单独给药时，优选以药用制剂提供。

因此，本发明进一步提供了药用制剂，该制剂含有式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理功能衍生物以及药学上可以接受的载体或赋形剂以及可任选的一种或多种其它的治疗成份。

25 本发明也提供了式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官能衍生物在药物生产中的用途，这些药物可用于预防或治疗与 NO 合成酶抑制剂(例如 iNOS 抑制剂)相关的疾病，所述疾病如炎性和/或免疫性疾病，像关节炎或哮喘。在优选的方面，我们提供式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官能衍生物在

生产用于预防或治疗关节炎、哮喘、肠梗阻和偏头痛等临床病症的药物中的用途。

此后，术语“活性成分”意指式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官能衍生物。

5 所述制剂包括口服给药制剂、胃肠外给药制剂(包括皮下注射、皮内注射、肌肉注射、静脉注射以及关节腔内注射)、吸入制剂(包括由不同剂量的加压气雾器、喷雾器、吹入器中产生的微粒粉剂或雾剂)、直肠和局部给药制剂(包括皮肤给药、口腔内给药舌下给药及眼内给药)。最适合的给药途径取决于用患者的状况和疾病。制剂通常以单位剂型提供，并且可以通过药学领域中已知的任何方法进行制备。所有的方法都包括将活性成分与载体混合的步骤，载体由一个或多个辅助成分构成。通常情况下，通过使活性组分与液体或精细固体载体或两者均匀紧密地结合，随后如果需要将所述产物制成所需制剂形状而制备所述制剂。适宜口服给药的本发明制剂可以以独立
10 的单位如胶囊剂、扁囊剂或片剂提供，而每单位含有预定量的活性成分；散剂或颗粒剂；水溶性液体或非水溶性液体溶液或悬浮液；或水包油型乳剂或油包水型乳剂。也可以以大丸剂、药糖剂或糊剂形式提供活性成份。

 通过任选与一种或多种辅助成份一起压片或塑型可以制备片剂。通过在适当的机器上压制在自由流动形式如粉末或颗粒(任选与
20 粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、润滑剂、表面活性剂或分散剂混合)中的活性组分可以制备压制片剂。模压片的制备是在适宜的机器上，将用惰性液体稀释剂湿润的粉状化合物的混合物塑型。所述片剂可任选为包衣的或压痕的，并且配成制剂以提供活性成份的缓释或控
25 释。

 胃肠外给药的制剂包括水性和非水性无菌注射液，该注射液可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抗菌剂及使制剂与患者血液等张的溶质；水性和非水性的无菌悬浮液，该悬浮液可以含有悬浮剂和增稠剂。

所述制剂可以以单位剂量或多剂量包装，例如用密封的安瓿和管制瓶提供；并且可以在冷冻干燥(冻干)的条件下贮存，在使用前仅需要加入无菌的液体载体如盐水或注射用水。可以用散剂、颗粒剂及前面描述的各种片剂，制备临时注射溶液和悬浮液。

5 直肠给药的制剂可以以与常用的载体(如可可脂或聚乙二醇)的栓剂形式提供。

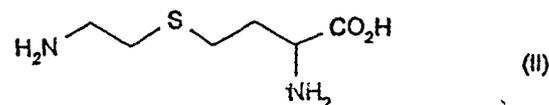
用于口腔的局部给药的制剂(如口腔含化剂或舌下给药的制剂)，包括在调味基质(如蔗糖、阿拉伯胶或西黄蓍胶)中的活性成份的锭剂；和在基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶中的活性成分的糖锭剂。

10 如前所述，优选的单位剂量制剂为含有有效量的活性成份或适宜的活性成份部分的制剂。

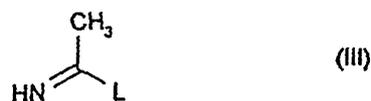
可以理解，除上面特别提到的成份外，本发明的制剂还包含有本领域相关制剂类型的其它常规成分，例如适于口服给药的成分可以包括调味剂。

本发明进一步提供了式(I)化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或生理官能衍生物的制备方法，该方法包括：

(i) 使式(II)化合物或其对映体、盐或其保护的衍生物



20 与式(III)化合物或其盐



反应，其中L为离去基团，最适合为C₁₋₆烷氧基(如乙氧基)、烷硫基、芳烷硫基或芳硫基(如苄硫基或1-或2-萘基甲硫基)；然后按任意顺序进行下面几步反应：

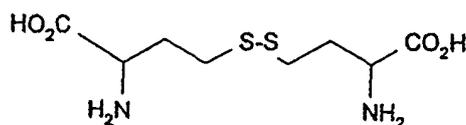
25

- (i) 任选移去任何的保护基；
 (iii) 任选从对映体的混合物中分离对映体；
 (iv) 任选转化产物为相应的盐、溶剂化物或生理官能衍生物。

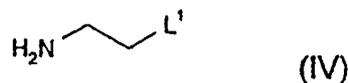
当 L 为 C₁₋₆ 烷氧基时，步骤(i)的反应可以在碱性 pH (如 pH 在 8-11 之间，适宜的 pH 为 10.5) 溶液中、低温(温度在 -5°C-20°C 之间，适宜的温度为 0-5°C) 下进行；当 L 为烷硫基、芳烷硫基或芳硫基时，反应可以在有机溶剂如四氢呋喃或 C₁₋₄ 醇(如乙醇)中、中等温度(如温度在 10-40°C 之间，适宜的温度为室温)下进行。

式(III)化合物及其盐可以购自商业，也可以通过本领域技术人员已知的有机化学方法进行制备，例如根据 Shearer 等在 Tetrahedron Letters, 1997, 38, 179-182. 中所描述的方法制备。

通过断裂二硫键由高胱氨酸或其保护性衍生物：



15 ，形成高半胱氨酸或其保护性衍生物，然后与式(IV)化合物或其保护性衍生物：



20 偶合，得到式(II)化合物及其盐和保护性衍生物。在式(IV)化合物中，L¹ 为离去基团，例如：卤素(如溴)、烷基、芳基或芳烷基磺酸酯(如甲苯磺酰基)。

通过本领域技术人员已知的方法，例如用液氨中的钠、二硫苏糖醇、或硼氢化钠等断裂高胱氨酸或其保护性衍生物的二硫键，形成高半胱氨酸或其保护性衍生物。

25 在适宜的有机溶剂(如甲苯)条件下，在碱(如 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯或类似的本领域技术人员认可的试剂)介导的反应中，使

高半胱氨酸的保护性衍生物(如 N-叔丁氧基羰基高半胱氨酸叔丁基酯)与式(IV)化合物进行反应。

高胱氨酸、式(IV)化合物及其保护性衍生物可以购自商业,也可以通过本领域技术人员已知的有机化学方法进行制备。

- 5 在制备式(I)化合物时,可利用常规的方法,例如,利用 Theodora W Green在第二版《有机合成中的保护基团》(John Wiley 和 Sons, 1991)中所描述的方法使用保护基团,该书中也描述了移去这类基团的方法。

10 在上述反应中,伯胺基团可用酰基适当保护,如用叔丁氧基羰基或苄氧基羰基保护,然后在酸性条件下移去,如用盐酸或氢溴酸处理,也可氢解移去。

15 如本领域技术人员所理解,此类保护基团的使用包括对式(II)化合物的氨基基团的正交保护,在另一个基团存在时,有利于选择性移去一个基团,因此使得能够选择将一个氨基官能团选择性官能化。例如,通过氢解可选择移去苄氧基羰基基团。本领域技术人员也可以理解其它的正交保护方法,如在 Theodora W Green(见上)中所描述的常规方法。

20 本发明的对映体化合物可通过(a)分离相应的外消旋混合物的各组分获得,例如,通过手性层析柱、酶拆分等方法,或制备并分离适当的非对映异构体;或(b)通过上述方法,用适宜的手性中间体直接合成。

通过与适宜的酸或碱反应,可以方便地进行任选转化式(I)化合物为相应的盐;用本领域技术人员已知的方法,任选转化式(I)化合物为相应的溶剂化物或生理官能衍生物。

25 根据另一方面,本发明提供了制备式(I)化合物的新的中间体,如:前面定义的式(II)化合物或其对映体、盐、或保护的衍生物;具体地讲为选自下列的化合物:

(S)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸;

(S)-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (R,S)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (R,S)-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯；
 (S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯；
 (R,S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (R,S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (R,S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯；和
 (R,S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯。

式(I)化合物的某些保护性衍生物也可作为制备式(I)化合物的中间体，特别是选自下面的化合物及其盐和溶剂化物：

(S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸
 (S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯；
 (R,S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸；
 (R,S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯。

为了更好地理解本发明，描述了下列实施例。

合成实施例

5 实施例 1

合成(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸
 或(S)-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸

(i) (S)-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸

向冷却至 -80°C 的液氮(130ml)中加入 L-高胱氨酸(3g), 随后加入金属钠(1.06g)至兰色 15 分钟不褪去。然后加入 N-苄氧基羰基-乙醇胺甲苯磺酸盐(8.16g), 在室温下搅拌该反应物至氨蒸发。用水(80ml)溶解残留物, 并用 0.5M EDTA 钠盐(2ml)处理。用 2 N 的硫酸调节溶液的 pH 至 7.0, 滤出产生的白色沉淀, 用冷水及丙酮洗涤, 并在真空干燥器中干燥, 得到标题化合物 5.3 g, 为白色固体。

质谱 M+H 313

(ii) (S)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸

用 45% HBr 的乙酸(23ml)溶液处理(S)-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸(5.3g) 1 小时。形成一种难处理的树脂状物, 向该混合物中加入乙醚, 确保产品完全析出。倾出液体, 将固体溶解于热的 SVM 中。用吡啶处理该热溶液, 至沉淀刚好存留, 将混合物冷却至室温。过滤产生的沉淀并在 SVM/水中重结晶, 得到标题化合物 2.2 g, 为白色固体, mp 222°C (分解)。

(iii) (S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸

在 $0-5^{\circ}\text{C}$, 在 1N NaOH (16.75ml)溶液中搅拌(S)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸(2.17g)至 pH 为 10.5。然后向该溶液中分批加入乙酰亚胺酸乙酯盐酸盐(2.07g), 用 1N NaOH 维持 pH 为 10.5。完成反应后, 用 1N HCl 调节 pH 到 3, 并将混合物过 Dowex AGX8H⁺型离子交换柱。将柱洗至中性, 然后用 2.5M 吡啶洗, 并再用水洗至中性。用 0.5 M 的氨洗脱并收集对茚三酮显阳性的组分, 蒸发。产生的残留物用 1N HCl 处理至 pH 到 4.5, 蒸发至干。然后将得到的残留物用乙醇处理, 蒸发至干, 随后用乙醚处理得到的残留物, 并蒸发至干, 得到标题化合物的一盐酸盐, 为较硬的白色泡沫状物。

产物的微量分析与 1.75 水合物相符:

测量值(计算值): C 33.56 (33.45), H 7.11 (7.49), N 13.74 (14.63)

实施例 2

通过类似实施例 1 的方法，用 D,L-高胱氨酸，制备(R/S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-D,L-高半胱氨酸。

产物的 $^1\text{H NMR}$ 与目标结构一致。

实施例 2a

- 5 用手性 Crownpac(+) HPLC 柱，以 pH 为 2 的三氟乙酸水溶液作洗脱剂，拆分实施例 2 的外消旋产物成为两种对映体成份[与实施例 1 和 4 中的(S)产物以及实施例 3 中的(R)产物完全相同]。

(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸

- 10 产物的微量分析与二三氟乙酸盐水合物 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S} \cdot (\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 相一致。

测量值(计算值): C 31.06 (30.97), H 4.53 (4.55), N 9.08 (9.03)

CD 谱(0.1N HCl 水溶液) 210(+0.80) nm

(R)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-D-高半胱氨酸

- 15 产物的微量分析与 1.67 三氟乙酸盐、0.3 HCl、1.5 水合物形成的盐形式 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S} \cdot (\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H})_{1.67} \cdot \text{HCl}_{0.3} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 相一致。

测量值(计算值): C 30.18 (30.40), H 4.92 (4.97), N 9.53 (9.41), S 7.41 (7.18), Cl 1.86 (2.38), F 21.36 (21.28).

CD 谱(0.1N HCl 水溶液) 210(-0.64) nm

实施例 3

- 20 通过类似实施例 1 的方法，由 D-高胱氨酸开始，制备(R)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-D-高半胱氨酸。

实施例 4

合成(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸

(i) (S)-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸

- 25 向冷却至 -80°C 的液氮(430ml)中加入 L-高胱氨酸(10g, 37.45mmol)。移去冷却浴，用 25 分钟分批加入金属钠(3.18g, 138.26mmol)，使温度升至回流温度。于回流下继续搅拌 30 分钟，然后加入 N-苄氧基羰基-乙醇胺甲苯磺酸盐(25g, 74.9mmol)，在室温下

搅拌该反应物过夜，直到氨蒸发。在 40°C 将残留物与水(250ml)一起搅拌 10 分钟，冷却至室温并过滤。用 2 M 硫酸调节溶液的 pH 到 7.0，过滤产生的白色沉淀，用冷水和丙酮洗涤，并在真空干燥器中干燥，得到(S)-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸，为白色固体。Mp 240°C (分解)。

(ii) (S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸

将(S)-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸(15.5g, 49.67mmol)加入到氢氧化钠(6.357g, 159mmol)的水(110ml)溶液中，随后加入二噁烷(55ml)。向该混合物中加入二碳酸二叔丁酯(16.26g, 74.5mmol)，在室温、氮气下，搅拌该混合物过夜。此后滤去固体沉淀，加入甲苯(300ml)，分离各层。将水层冷却并用 1N HCl 酸化至 pH 约为 3。用甲苯(4 × 100ml)及乙酸乙酯(3 × 100ml)提取酸化的部分，合并有机部分用 MgSO₄ 脱水。减压浓缩合并的有机物，得到(S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸，为白色胶状物。

质谱 M+H 413

(iii) (S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸甲酸盐

在氮气下，向冷却至 5°C 的甲醇(50ml)中，一次性加入钨黑(0.678g)。用 1 分钟，向冷却的溶液中加入甲醇(50ml)和甲酸(11ml, 196mmol)的混合物，随后用 2 分钟，加入(S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸(2g, 4.85mmol)的甲醇(50ml)溶液。在室温下，搅拌该混合物过夜，加入更多的钨黑(257mg)，并继续搅拌 3 小时。通过 Hyflo 过滤反应混合物，减压浓缩。使残留物分配于水和乙酸乙酯之间，用乙酸乙酯洗涤水层，浓缩水层，得到(S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸甲酸盐，为白色固体。

质谱 M+H 279 (65%), 223 (100%)

(iv) (S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸盐酸盐

在室温、氮气下，向(S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚

酸甲酸盐(2.154g, 6.59mmol)的乙醇(50ml)溶液中加入 S-(1-萘基甲基)硫代乙酰亚胺酸酯盐酸盐(3.70g, 14.75mmol), 随后加入乙醇(50ml)。在室温下搅拌该混合物, 2 小时后固体溶解, 搅拌该溶液过夜。真空浓缩反应液, 用水处理残留物, 用乙醚(4×50ml)洗涤水层。真空浓缩水层, 得到(S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸盐酸盐, 为白色吸湿性固体。

质谱 M+H 320 (75%), 264 (100%), 220 (15%)

(v) (S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸

将 4N HCl/二噁烷溶液(20ml)缓慢加入到(S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸盐酸盐(3.086g, 8.69mmol)中, 在室温下搅拌反应混合物过夜。真空浓缩反应液, 用水溶解残留物, 并用乙醚(3×20ml)洗涤。真空浓缩水层, 得到标题化合物的盐酸盐, 为吸湿性固体。

质谱 M+H 220;

¹H NMR(D₂O) δ: 2.1-2.35 (5H, m), 2.76 (2H, t), 2.87 (2H, t), 3.51 (2H, t), 4.12 (1H, t).

实施例 5

合成(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸

(i) (S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯

在室温、氮气下, 向 N-叔丁氧基羰基半胱氨酸叔丁酯(通过用二硫苏糖醇还原 N-叔丁氧基羰基胱氨酸叔丁酯制备)(291mg, 1mmol)的无水甲苯(20ml)溶液中加入 N-苄氧基羰基-乙醇胺甲苯磺酸盐(349mg, 1mmol)和 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(150 μl, 1mmol), 并剧烈搅拌该混合物过夜。使混合物分配于乙酸乙酯和 1N HCl 水溶液各 50ml 之间。合并有机萃取物, 然后用碳酸氢钠水溶液、水及盐水依次洗涤这些萃取物, 脱水并蒸发。经柱层析纯化, 得到标题化合物。

质谱 M+H 469 (25%), 369 (100%)

另一个替代的方法为，用 N,N-二甲基甲酰胺 di-O-t-butyl acetal 或 O-1,1,1 三氯乙酰亚胺酸酯叔丁酯，转化实施例 4 步骤(ii)的产物为叔丁基酯，得到标题化合物，为白色结晶性固体。

(ii) (S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯甲酸盐

- 5 向(S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-苄氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯(1g, 2.1mmol)的乙醇(50ml)溶液中加入氢氧化钯炭(20%, 0.5g)及甲酸铵(1.34g)。将该悬浮液回流 2.5 小时，冷却，然后通过二氧化硅柱过滤，用 1:1 乙醇-水洗涤，蒸发得到标题化合物的甲酸盐。

质谱 M+H 335

- 10 (iii) (S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯盐酸盐

- 15 将从步骤(ii)得到的粗品(S)-2N-叔丁氧基羰基-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯甲酸盐在 50ml 四氢呋喃中制成淤浆，倾出液体并与 S-(1-萘基甲基)硫代乙酰亚胺酸酯盐酸盐(0.5g, 2mmol)混合，在室温下搅拌 24 小时。蒸发溶剂，将残留物分配于乙醚和水各 25 ml 之间，随后用乙醚洗涤 2 次；合并水提取物并蒸发，得到白色的糊状物。将该糊状物冷冻干燥两次，得到标题化合物，为白色吸湿性固体。

质谱 M+H 376 (100%), 320 (15%), 276 (12%)

(iv) (S)-S-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸

- 20 通过类似于实施例 4 步骤(v)的方法，用 4N HCl 二噁烷溶液使(S)-2N-叔丁氧基羰基-7N-(1-亚氨基乙基)-2,7-二氨基-5-硫代庚酸叔丁酯盐酸盐去保护，得到(S)-S-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸。

标题化合物的特征数据与实施例 4 的产物的特征数据相一致。

- 25 生物活性

1. 抑制鼠主动脉环中的 eNOS 和 iNOS

可以通过测量由 NO 合成酶抑制剂所引起的鼠主动脉环张力的增加，来评估对 eNOS 和 iNOS 的在位抑制活性。为了研究基础张力

(反映 eNOS), 按照以前描述的方法(Rees 等. (1989) Br. J. Pharmacol. 96, 418-424), 制备具有完整内皮的胸主动脉环, 得到在临界浓度苯肾上腺素(ED₁₀ 约为 10nM)存在下获得的抑制剂的累积浓度曲线。为了研究诱导的平滑肌张力(反映 iNOS), 按照以前描述的方法(Rees 等. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 541-547), 将内皮裸露的环暴露于含苯肾上腺素(接近 ED₉₀)的 LPS (0.1 μg/ml 来自于 *S. typhosa*) 中 6 小时。在此期间, 由于 iNOS 的诱导, 张力逐渐降低。然后得到抑制剂的累积浓度曲线。

结果见下表:

	iNOS IC ₅₀ (μM)	eNOS %抑制, 300Mm 处	选择性 iNOS 比 eNOS
实施例 1	0.73	43	>500 倍
实施例 2	0.45	53	>500 倍
实施例 3	6.6	20	>500 倍

相比之下, 在同样的实验中, 2-(1-亚氨基乙氨基)乙基半胱氨酸盐酸盐(WO93/13055 中实施例 4)对 iNOS 的选择性仅为对 eNOS 选择性的 33 倍。

2. 抑制大鼠皮质切片中的 nNOS

按照 Furfine 等(1994). J. Biol. Chem. 269, 26677-26683 及 Lizasoain 等(1995) 在 J. Neurochem. 64, 636-642 中所描述的方法, 测定化合物对大鼠脑切片中 nNOS 的影响。

通过 McIlwain-切片(0.2mm×0.2mm)的大鼠脑皮质切片中 14C-精氨酸在 37°C、2 小时内向 14C-瓜氨酸的转化、随后在无化合物存在下或在高浓度的氯化钾存在下预孵育 1 小时, 来测定受 KCl (54mM) 刺激的 NO 的合成。

测定结果表明实施例 1 化合物的 IC₅₀ 为 220 μM, 亦表明其对 iNOS 的选择性约为对 nNOS 的 300 倍。

3. iNOS 抑制剂化合物的口服生物利用度的测定方法

动物实验

将受试化合物的水溶液，分别给小鼠(每个时间点为 3 只动物)静脉注射(10mg/kg)和口服(50mg/kg)。给药后，按一定的时间间隔采集血样，并通过离心制备血浆。分析前将样品在-20°C 贮存。

5 血浆中化合物的分析

将血浆(50 μ l)去蛋白，用季铵试剂衍生化合物。然后将样品注入 HPLC 系统，并用质谱检测测定化合物的浓度。

药物动力学分析

10 将通过以上方法获得的血浆浓度数据输入药物动力学软件 (PKCAL 1.2s 版)中，并用开放模型(non-compartmental)拟合。通过比较软件计算出的口服的和静脉注射的曲线下面积值，从而测定化合物的口服生物利用度。拟合静脉注射曲线终末相的时间点，得到半衰期。

15 我们发现(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸的口服生物利用度为 55%，而半衰期为 5.7 小时。

当给大鼠重复静脉注射和口服(10mg/kg)时，(S)-[2-(1-亚氨基乙氨基)乙基]-L-高半胱氨酸的生物利用度为 92%。