



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 025 123** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК<sup>5</sup> **A 61 K 31/16**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

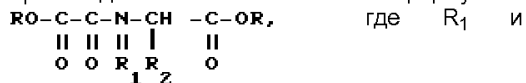
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4895308/14, 10.05.1991  
(30) Приоритет: 12.05.1990 DE P 4015255.3  
(46) Дата публикации: 30.12.1994  
(56) Ссылки: Патент Франции N 2010601, кл. C 07C103/00, 1980.

(71) Заявитель:  
Хехст АГ (DE)  
(72) Изобретатель: Эккехард Баадер[DE],  
Харальд Бургхард[DE], Фолкмар  
Гюнцлер-Пукалл[DE]  
(73) Патентообладатель:  
Хехст АГ (DE)

(54) ИНГИБИТОРЫ ПРОЛИН- ИЛИ ЛИЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ, ФИБРО- ИЛИ ИММУНОДЕПРЕССАНТЫ, ЛЕЧЕБНОЕ СРЕДСТВО ПРИ РАССТРОЙСТВАХ МЕТАБОЛИЗМА КОЛЛАГЕНА ИЛИ КОЛЛАГЕНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ

(57) Реферат:  
Изобретение касается применения производных оксалиламинокислот формулы 1



$R_2$  одинаковы или различны и означают  $C_1-C_3$  - алкилы, Na или K,  $R_1$  - означает

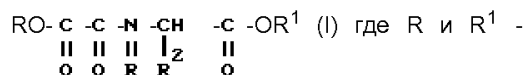
водород или метил,  $R_2$  - означает водород,  $C_1-C_3$  - алкил, бензил или тиометил, либо  $R_1$  и  $R_2$  совместно образуют алкиленовую цепь. Соединения зарекомендовали себя как отличные ингибиторы пролин- и лизингидроксилаз, фибро- или иммунодепрессанты, лечебные средства при расстройствах метаболизма коллагена или коллагеноподобных веществ. 1 табл.

RU 2 0 2 5 1 2 3 C 1

RU 2 0 2 5 1 2 3 C 1



Изобретение касается использования соединений формулы



одинаковые и означают метил, этил Na и K;

R<sup>1</sup> - означает водород или метил;

R<sup>2</sup> - означает водород, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил, бензил или тиометил, либо R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> совместно образуют этиленовую цепь.

Алкильные цепи из трех и более атомов углерода могут быть как линейными, так и разветвленными. Под арилом подразумеваются ароматические углеводороды, в первую очередь, фенил и нафтил.

Получение соединений, отвечающих формуле I, известно. Наиболее просто оно осуществляется в том случае, когда 1-3 эквивалента гидрогалогенида, предпочтительно гидрохлорида, эфира аминокислоты смешивают с 1-5 эквивалентами основания, например карбонатом или гидрокарбонатом, таким как карбонаты натрия или калия либо гидрокарбонаты натрия или калия, или третичными аминами, такими как триэтиламин, трибутиламин, этилдиизопропиламин, или гетероциклическими аминами, такими как N-алкилморфолин, пиридин, хинолин или диалкиланилин.

При желании одновременно могут быть использованы несколько оснований. Температура проведения реакции лежит в диапазоне от -30°C до 150°C, предпочтительно от -20°C до 100°C. При необходимости можно использовать растворители, такие как диэтиловый эфир, диметилцеллозольв или тетрагидрофуран, хлорированные углеводороды, такие как хлористый метилен, хлороформ, три- или тетрагидрофуран, бензол, толуол, а также полярные растворители, такие как диметилформамид, ацетон, спирты, например метанол или этанол, или диметилсульфоксид. Непосредственно затем при температурах от -78°C до 100°C, предпочтительно от -20°C до 20°C, медленно прибавляют 1-3 эквивалента хлорангидрида эфира щавелевой кислоты. При желании также возможно работать в присутствии растворителя как описано выше. Окончание реакции определяется, например, методом тонкослойной хроматографии.

Разделение продуктов может осуществляться, например, путем экстракции или хроматографии, например, на силикагеле. Выделенный продукт можно перекристаллизовать.

Соединения формулы I с R и/или R<sup>1</sup> = щелочной металл, например, Na или K могут быть получены из соответствующих соединений формулы I с R и/или R<sup>1</sup> = C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси в щелочной среде методом омыления до соответствующих солей, например с помощью NaOH или KOH в растворе низкомолекулярного спирта, такого как метанол или этанол, или же в таких эфирах, как диметилцеллозольв или тетрагидрофуран, в данных условиях и в присутствии воды. Катион щелочного металла в полученных солях может быть обычным

способом при подкислении в ионообменнике заменен на любой другой катион. Для этого, например, кислоты пропускают через колонку, заполненную катионообменником, (таким как ® Amberlite Cg-150 или ®Dowex - CCR-2) на основе системы полистирол-дивинилбензол. Катионообменник загружен требуемым катионом, например, ионами аммония, образующимися из первичного, вторичного или третичного амина. Желаемую соль получают выпариванием элюата.

Аммониевые соли кислот, образованные от первичного, вторичного или третичного амина, можно также получить, добавив свободную кислоту в спиртовой раствор эквимолекулярного количества соответствующего амина и упарив растворитель.

Получение преимущественно энантиомерных D- или L-соединений из рацематов осуществляется по известным методикам, например, путем фракционной кристаллизации или путем ферментной обработки. Другая возможность состоит в прямом синтезе энантиомерных соединений из соответствующих D- или L-интермедиатов.

Отвечающие изобретению вещества действуют как обратимые ингибиторы пролилгидроксилазы. По этой причине они осуществляют селективное ингибирование коллагенспецифической реакции гидроксирования, в ходе которой протеиносвязанный пролит гидроксيليруется ферментом пролилгидроксилазой. При прекращении данной реакции с помощью ингибитора возникает не способная к функционированию недогидроксированная молекула коллагена, которая может быть возвращена клеткой во внеклеточное пространство лишь в незначительных количествах. Кроме того, недогидроксированный коллаген не способен встраиваться в коллоагенную матрицу и легко подвергается протеолитической деструкции. Вследствие этого эффекта уменьшается общее количество коллагена, отлагаемого вне клетки. Поэтому ингибиторы пролингидроксилазы являются инструментом, пригодным для лечения заболеваний, при которых отложения коллагена вносят решающий вклад в клиническую картину. Сюда среди прочих относятся фиброзы легких, печени и кожи (склеродермия), а также атеросклероза.

Кроме того, известно, что ингибирование пролингидроксилазы известными ингибиторами, такими как α, α'-дипиридил, приводит к ингибированию CLg-биосинтеза макрофагов (В. Мюллер и др. FEBS Lett 90, 218f, 1978). Это является причиной отказа от классического пути дополнительного активирования: в этом случае ингибиторы пролилгидроксилазы одновременно действуют как иммунодепрессанты, например, при общих иммунных заболеваниях.

Исходя из этого, отвечающие изобретению вещества могут быть использованы в качестве фибродепрессантов, иммунодепрессантов и противоатеросклеротических препаратов.

Противофиброзное действие может быть изучено на примере фиброза печени, вызванного четыреххлористым углеродом.

Для этого крыс дважды в неделю обрабатывают  $CCl_4$  (1 мг на кг), растворенным в оливковом масле. Исследуемое вещество вводится ежедневно, в данном случае даже дважды в день, перорально или внутривентриально, в виде раствора в переносимом растворителе. Размер фиброза печени определяется гистологически, а доля коллагена в печени исследуется через определение гидроксипролина, как описано Кивирикко и др. (Anal. Biochem. 19, 249 f, 1967).

Активность фиброгенеза может быть определена путем радиоиммунологического обнаружения фрагментов коллагена и проколлагеновых пептидов в сыворотке. Отвечающие изобретению соединения активны в этих опытах при концентрациях от 1 до 100 мг/кг. Другой моделью для оценки антибиотического действия является описанный Келлеем и др. (Lab. Clin. Med. 96, 956, 1980). Фиброз легких, вызываемый биомиицином. Для оценки эффективности отвечающих изобретению соединений грануляционная ткань может рассматриваться в приближении к модели гранулемы ватного тампона, как описано у Майера и др., Experimentia 6, 469, 1950.

Примеры. Общая пропись для получения соединений из примеров 1-6.

Один эквивалент гидрохлорида эфира аминокислоты, два эквивалента триэтиламина и 2 эквивалента N,N-диметиламинопиридина вносят в хлористый метилен при комнатной температуре в атмосфере азота. Затем при 0-10°C медленно прикапывают один эквивалент хлорангидрида эфира щавелевой кислоты, растворенного в хлористом метиле. Перемешивают 12 ч при комнатной температуре, прибавляют насыщенный раствор гидрокарбоната натрия и экстрагируют. Отделяют органическую фазу, промывают ее раствором хлорида натрия, сушат сульфатом магния и упаривают. Сырой продукт хроматографируют.

Пример 1. Диметиловый эфир (N-оксалил)-L-аланина

$R = R^1 = CH_3$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = CH_3$  5 г гидрохлорида метилового эфира L-аланина и 3,3 мл хлорангидрида метилового эфира щавелевой кислоты образуют 6 г образца 1 в виде масла.

Хроматография: эфир (метанол 5)1

Пример 2. Диметиловый эфир (N-оксалил)-L-фенилаланина

$R = R^1 = CH_3$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = CH_2C_6H_5$  5 г гидрохлорида метилового эфира L-фенилаланина и 2,2 мл хлорангидрида метилового эфира щавелевой кислоты образуют 6,5 г образца 2 в виде масла.

Хроматография: эфир ( $CH_3OH$  5)1

Пример 3. Диметиловый эфир (N-оксалил)-L-глицина

$R = R^1 = CH_3$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = H$  15 г гидрохлорида метилового эфира L-глицина и 11 мл хлорангидрида монометилового эфира щавелевой кислоты образуют 23 г образца 3. Т.пл. 49°C, хроматография: эфир.

Пример 4. Диметиловый эфир (N-оксалил)-L-пролина

$R = R^1 = CH_3$ ;  $R^2 = CH_2 - CH_2 = R^3$  2 г гидрохлорида метилового эфира L-пролина и 2,9 г хлорангидрида монометилового эфира щавелевой кислоты образуют 1,5 г в виде

масла, хроматография: эфир.

Пример 5. Диметиловый эфир (N-оксалил)-L-валина

$R = R^1 = CH_3$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = -CH(CH_3)_2$  2 г гидрохлорида метилового эфира L-валина и 2,8 г хлорангидрида монометилового эфира щавелевой кислоты образуют 2 г в виде масла. Хроматография: хлороформ (эфир) 1)1

Пример 6. Диметиловый эфир (N-оксалил)-L-цистеина

$R = R^1 = CH_3$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = CH_2SH$  2 г гидрохлорида метилового эфира L-цистеина и 3,9 г хлорангидрида монометилового эфира щавелевой кислоты образуют 1,5 г в виде масла. Хроматография: хлороформ (эфир) 1)1

Пример 7. Диэтиловый эфир (N-оксалил)-саркозина

$R = R^1 = CH_3$ ;  $R^2 = CH_3$ ;  $R^3 = H$ .

2 г гидрохлорида этилового эфира саркозина прибавляют к 50 мл этанола и при комнатной температуре прикапывают раствор 3,5 мл (2 эквивалента) диэтилоксалата и 1,8 мл триэтиламина в 25 мл этанола. Перемешивают 5 ч при 50°C, затем 2 ч нагревают с обратным холодильником. Раствор охлаждают и упаривают досуха. Остаток растворяют в хлористом метиле, однократно промывают водой, сушат органическую фазу над сульфатом магния и упаривают.

Сырой продукт хроматографируют: эфир (хлороформ 1)1

Выход: 0,35 г

Общие прописи для получения соединений из примеров 8-14.

Один эквивалент соединений из примеров 1-7 при комнатной температуре растворяют в 2 эквивалентах 0,1 и спиртовой щелочи. Перемешивают 12 ч при комнатной температуре и упаривают досуха. Из остатка дважды удаляют дымящиеся продукты толуолом, несколько раз промывают пентаном и высушивают в глубоком вакууме.

Пример 8. Дикалиевая соль (N-оксалил)-L-аланина

$R = R^1 = K$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = CH_3$  300 мг соединения образца 1 вводят в реакцию обмена с 32,5 мл 0,1 н. раствора калийной щелочи в этаноле.

Выход: 370 мг белых кристаллов. Т.пл. > 300°C

Пример 9. Динатриевая соль (N-оксалил)-L-фенилаланина

$R = R^1 = Na$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = CH_2C_6H_5$  420 мг соединения образца 2 вводят в реакцию обмена с 32,5 мл 0,1 н. раствора натриевой щелочи в этаноле. Выход: 440 мг белых кристаллов, Т.пл. > 300°C

Пример 10.

Дикалиевая соль (N-оксалил)-L-глицина  
 $R = R^1 = K$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = H$  5,5 г соединения образца 3 вводят в реакцию обмена с 314 мл 0,1 н. раствора гидроокиси калия в метаноле.

Выход: 5,4 г белых кристаллов, Т.пл. > 300°C

Пример 11. Динатриевая соль (N-оксалил)-L-пролина

$R = R^1 = Na$ ;  $R^2 = CH_2 - CH_2 = R^3$  300 мг соединения образца 4 вводят в реакцию обмена с 1,5 мл 0,1 н. раствора гидроокиси натрия в этаноле. Выход 290 мг белых кристаллов, Т.пл. > 300°C

Пример 12. Динатриевая соль (N-оксалил)-L-валина

$R = R^1 = Na$ ;  $R^1 = H$ ;  $R^2 = CH(CH_3)_2$  300 мг соединения образца 5 вводят в реакцию обмена с 14 мл 0,1 н. раствора гидроокиси натрия в этаноле. Выход: 235 мг белых кристаллов, Т. пл. > 300°C.

Пример 13. Динатриевая соль (N-оксалил)-L-цистеина

$R = R^1 = Na$ ;  $R^1 = H$ ;  $R^2 = CH_2H$  300 мг соединения образца 6 вводят в реакцию обмена с 13,7 мл 0,1 н. раствора гидроокиси натрия в метаноле. Выход: 300 мг белых кристаллов, Т. пл. > 300°C.

Пример 14. Дикалиевая соль (N-оксалил)саркозина.

$R = R^1 = K$ ;  $R^1 = CH_3$ ,  $R^2 = H$  120 мг соединения образца 7 вводят в реакцию обмена с 11,4 мл 0,1 н. раствора гидроокиси калия в этаноле. Выход 130 мг белых кристаллов, Т. пл. 300°C

Соединения примеров 1-14 представлены в таблице.

Ингибирующее действие отвечающих изобретению соединений определялось по форментному тесту, аналогичному методу В. Петеркофского и Р. Диблазис. Anal. Biochem 6, 279-286 (1975).

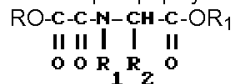
При этом недогидроксилированный коллаген ферментно гидроксилируется пролилгидроксилазой в присутствии ионов железа (II),  $\alpha$ -кетоглутарата и аскорбата и определяется та концентрация прибавленного соединения, отвечающего изобретению, которая приводит к 80%-ному ингибированию активности фермента значение выражается через  $K_i$  (соли). Для соединений примера 8  $K_i$  0,04 мМ, примера 10  $K_i$  0,01 мМ

Ингибирующее действие можно также определять в культуре клеток или ткани. Для этого можно использовать фибропласты или иные продуцирующие коллаген клетки и соответственно Calvarien или другие продуцирующие коллаген органы. Далее представлено ингибирующее действие предлагаемых веществ в культуре Calvarien. Указана концентрация, приводящая к

50%-ному снижению частного гидроксипролин / пролин при метаболическом маркировании с помощью  $^{14}C$ -пролина ( $IC_{50}$ ) (эферы): пример 1 0,35 мМ, пример 3 0,002 мМ.

#### Формула изобретения:

1. Применение оксааллиламиновых кислот общей формулы



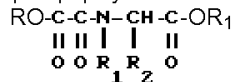
где R и  $R_1$  - одинаковые или различные,  $C_1$  -  $C_3$ -алкил, Na или K;

$R_1$  - водород или метил;

$R_2$  - водород,  $C_1$  -  $C_3$ -алкил, бензил или тиометил,

либо  $R_1$  и  $R_2$  вместе образуют этиленовую цепь, в качестве ингибиторов пролин- или лизингидроксилазы.

2. Применение оксааллиламиновых кислот общей формулы



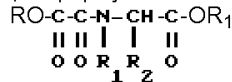
где R и  $R_1$  - одинаковые или различные,  $C_1$  -  $C_3$ -алкил, Na или K;

$R_1$  - водород или метил;

$R_2$  - водород,  $C_1$  -  $C_3$ -алкил, бензил или тиометил,

либо  $R_1$  и  $R_2$  - вместе образуют этиленовую цепь, в качестве фибро- или иммунодепрессантов.

3. Применение оксааминовых кислот общей формулы



где R и  $R_1$  - одинаковые или различные,  $C_1$  -  $C_3$ -алкил, Na или K;

$R_1$  - водород или метил;

$R_2$  - водород,  $C_1$  -  $C_3$ -алкил, бензил или тиометил,

либо  $R_1$  и  $R_2$ -совместно образуют этиленовую цепь,

в качестве лечебного средства при расстройствах метаболизма коллагена или коллагеноподобных веществ.

RU 2025123 C1

Пример	Соединение				Т пл. / масло/
	R	R <sup>1</sup>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	
1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	Масло
2	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Масло
3	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	40°C
4	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub>	Масло
5	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH/CH <sub>3</sub> /2	Масло
6	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> SH	Масло
7	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	H	Масло
8	K	K	H	CH <sub>3</sub>	>300°C
9	Na	Na	H	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	>300°C
10	K	K	H	H	>300°C
11	Na	Na	CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub>	>300°C
12	Na	Na	H	CH/CH <sub>3</sub> /2	>300°C
13	Na	Na	H	CH <sub>2</sub> SH	>300°C
14	K	K	CH <sub>3</sub>	H	>300°C

RU 2025123 C1