



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **NR. 153768**

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) int. Cl.⁴ C 07 C 149/273

(21) Patentsoknad nr. 821595
(22) Inngivelsesdag 13.05.82
(24) Lopedag 13.05.82
(62) Avdelt/utskilt fra soknad nr.

(86) Internasjonal soknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -

(71)(73) Søker/Patenthaver **PFIZER INC.**,
235 East 42nd Street,
New York, NY 10017, USA.

(41) Alment tilgjengelig fra 19.11.82
(44) Utlegningsdag 10.02.86
(72) Oppfinner **JASJIT SINGH BINDRA**,
Groton, New London, CT,
USA.

(74) Fullmektig Cand.mag. Johan H. Gørbitz,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 18.05.81, USA, nr 264752.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **ANALOGIFREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV
2-(2-BENZYL-3-MERKAPTO-PROPIONYLAMINO)-
DERIVATER AV 1-ALKANOLER OG AV 4-METYL-
TIOSMØRSYRE.**

(57) Sammendrag

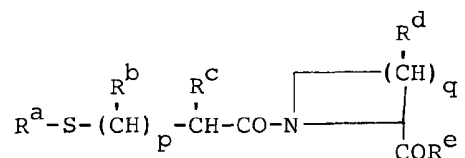
Oppfinnelsen angår fremstilling av chirale 2-(2-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-1-alkanol-derivater og chirale 2-(2-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-4-metyltiosmørsyrer som er inhibitorer av enkefalinase-enzym, hvorved de kan anvendes klinisk som analgetika eller antikonvulsiva eller som terapeutikum for forstyrrelser hvor det endogene enkefalin-nivå er under det normale.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av en klasse chirale 2-(2-benzyl-3-merkaptopropionyl)amino-1-alkanoler samt chirale 2-(2-benzyl-3-metylmerkaptopropionylamino-4-metyltiosmørsyrer som har gunstige CNS (sentralnervesystem) virkninger, innbefattet klinisk anvendelighet som analgetika eller anti-konvulsiva, eller som terapi for forstyrrelser hvor endogene enkefalin-nivåer er under det normale. Det antas at disse virkninger skyldes forbindelsenes evne til å inhibere enkefalinase, en dipeptidylkarboksypeptidase som spesifikt spalter Gly³-Phe⁴-bindingen i enkefaliner. Enkefalinene er forbindelser som regnes som signaloverførende forbindelser i sentralnervesystemet. Inhibitorer av enkefaliner har nyttige CNS-virkninger.

Roques *et al.* [Nature 288, s. 286-288 (1980)] har nylig vist at N-(2-benzyl-3-merkaptopropionyl)glycin ("thiorfan") er en spesifikk enkefalinase-inhibitor. Denne forbindelse angis å ha analgetisk ("antinociceptive") virkning i mus i den såkalte "hot-plate-jump-test" men ikke i den såkalte "tail-withdrawal-test".

Forbindelser med den meget generelle formel:



hvor

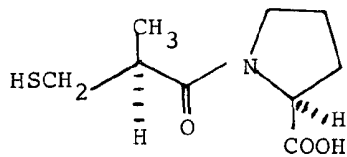
- R^a er H eller R^f CO;
- R^b og R^c er H, alkyl eller fenylalkyl;
- R^d er H, OH eller alkyl;
- R^e er OH, alkoksy eller NH₂;
- R^f er alkyl, fenyl eller fenylalkyl;
- p er 0, 1 eller 2; og
- q er 1 til 3;

er beskrevet av Ondetti *et al.* [US-patent 4.046.889 (7/6/77)] som inhibitorer av angiotensin-konverterende enzym, anvendelige som hypotensive midler. Ondetti *et al.* angir som en undergruppe av "broadly preferred"-forbindelser, slike hvor

153768

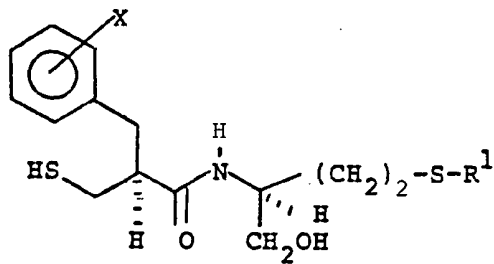
2

R^b og R^c er forskjellig fra fenylalkyl, mens "especially preferred" derivater er ytterligere begrenset til prolin-derivater (d.v.s. $q = 2$, $R^d = H$). En forbindelse av denne klasse med formel:

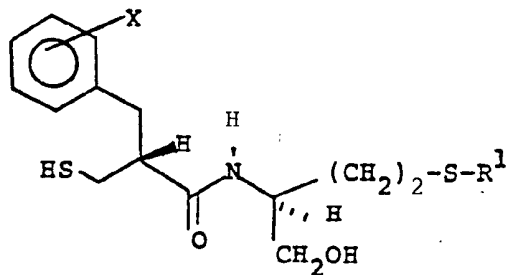


har fått det generiske navn captopril.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av chirale forbindelser med formel:



---I



---II

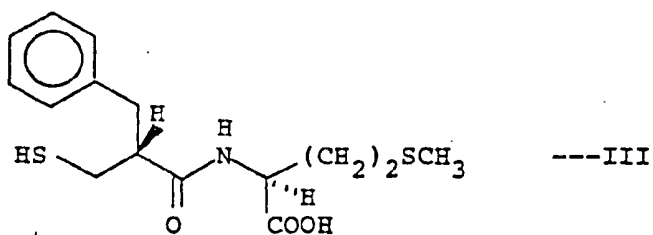
hvor

X er hydrogen, (C₁-C₃)alkoksy, fluor, klor eller brom;

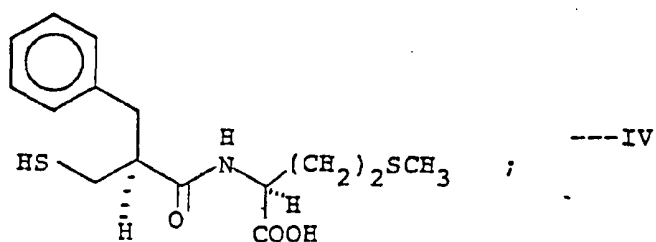
R¹ er (C₁-C₃)alkyl.

Spesielt verdifulle er forbindelser hvor R¹ = metyl. Innenfor denne undergruppe er den foretrukne betydning av X p-klor, p-metoksy eller hydrogen.

Foreliggende oppfinnelse angår også fremstilling av forbindelser med formel:



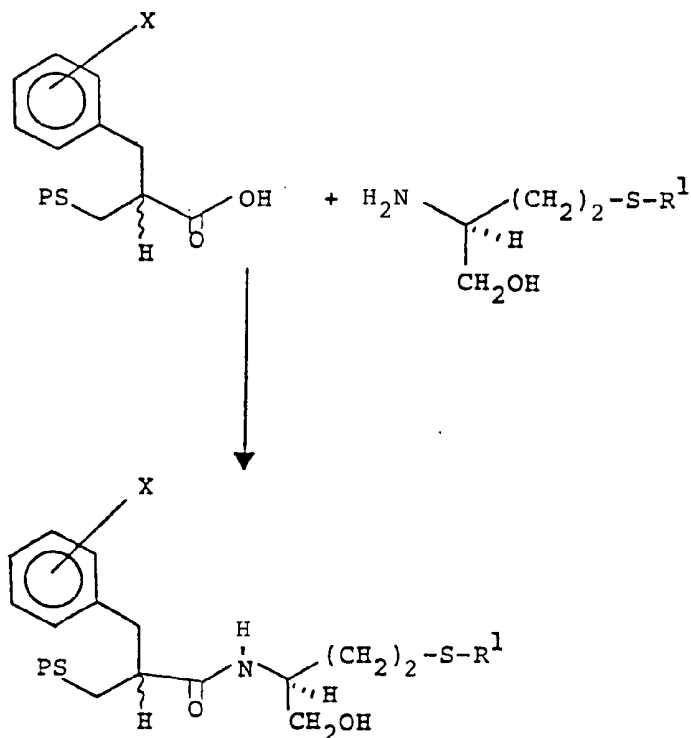
og



Farmasøytisk akseptable salter innbefatter alkalimetall-saltene, f.eks. natrium og kalium-saltet; jordalkalisaltene, så som kalsium og magnesium-saltene; aluminiumsalter; ammoniumsalter; og salter med organiske baser, f.eks. aminer som benzatin (N,N'-dibenzyletylendiamin), kolin, dietanolamin, etylendiamin, meglumin (N-metylglukamin), benetamin (N-benzylfenetylamin), dietylamin, piperazin og trometamin (2-amino-2-hydroksymetyl-1,3-propanodiol). Andre salter, f.eks. dicykloheksylaminsaltet som vanligvis ikke ansees som farmasøytisk akseptabelt, kan også benyttes for isolering, rensing og undersøkelses-formål.

Forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen er enkefalinase-inhibitorer. Det er på grunn av denne mekanisme at forbindelsene antas å virksom analgetiske og antikonvulsive midler i pattedyr, inklusiv mennesket.

Forbindelsene med formel (I) og (II) kan lett fremstilles ved å koble den passende beskyttede merkapto-syre med det tilhørende amin,



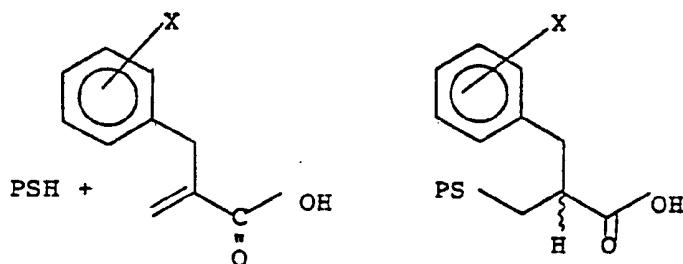
hvor X og R¹ er som tidligere angitt og P er en svovel-beskyttende gruppe som benzoyl eller acetyl som fjernes selektivt ved et senere solvolysetrinn.

Koblingen av syren med aminet kan utføres etter en rekke metoder som er velkjent innen peptidkjemien, under anvendelse av i det vesentlige molare ekvivalenter syre og amin for å maksimere utbyttet og minimere eventuell acylering av alkoholen. For det foreliggende formål består en spesielt lettvent metode i å omdanne syren til syrekloridet med et overskudd av et syreklorid-dannende reagens (f.eks. oksalyklorid, sulfonylklorid) i et inert, lavtkokende løsningsmiddel som metylenklorid. Temperaturen er ikke kritisk, men bør fortrinnsvis ligge i området 20-50°C (et moderat trykk er nødvendig i det øvre temperaturområdet dersom metylenklorid benyttes som løsningsmiddel). Syrekloridet isoleres fritt for løsningsmiddel og reagensoverskudd ved en enkel fordampning i vakuum, hvorpå det løses opp igjen i et inert løsningsmiddel og langsomt tilsettes til en løsning av aminoalkoholen og minst en molar ekvivalent av et tertiært amin som f.eks. trietylamin eller N-metylmorfolin. Temperaturen er heller ikke her vesentlig; området 0-50°C er f.eks. velegnet. Temperaturer i nedre del av området foretrekkes. Dersom den anvendte syre er racemisk, er det i alminnelighet mulig å separere det resulterende par av diastereoisomerer (epimerer) etter standardmetoder for fraksjonert krystallisasjon eller kromatografi. Diastereoisomerene kan herunder eventuelt separeres etter fjerning av den beskyttende gruppe. Dersom et spesielt diastereoisomer ønskes, er bruk av den passende chirale syre som utgangsmateriale å foretrekke. Den beskyttende gruppe P fjernes under enhver omstendighet selektivt ved standard solvolysemetoder, som i alminnelighet gjør bruk av en sterk base i vann og/eller en alkohol, eventuelt i nærvær av et reaksjonsinert, blandbart organisk løsningsmiddel. En foretrukket fremgangsmåte består i å omsette acyltioforbindelsen med minst en molar ekvivalent natrium-metoksyd i vannfri metanol. Herunder benyttes vanligvis ikke mer enn et 20% molart overskudd av metoksydet. Temperaturen er ikke kritisk (f.eks. 0-50°C er velegnet). Romtemperatur er således velegnet.

153768

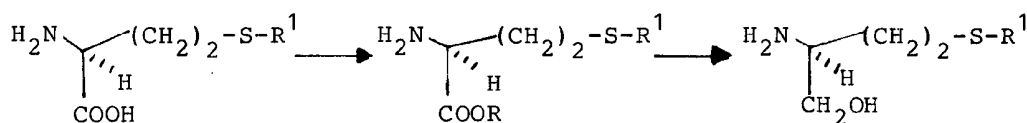
6

De racemiske syrer som trengs for ovennevnte syntese kan lett oppnås ved kondensasjon av en tiokarboksylsyre med den passende 3-fenyl-2-metylenpropionsyre:



De chirale former av disse syrer kan, om ønskes, oppnås ved saltdannelse med et chiralt amin (f.eks. d-(+)-alfa-metylbenzylamin), fulgt av velkjent fraksjonert krystallasjonsteknikk for separasjon av de diastereomere salter.

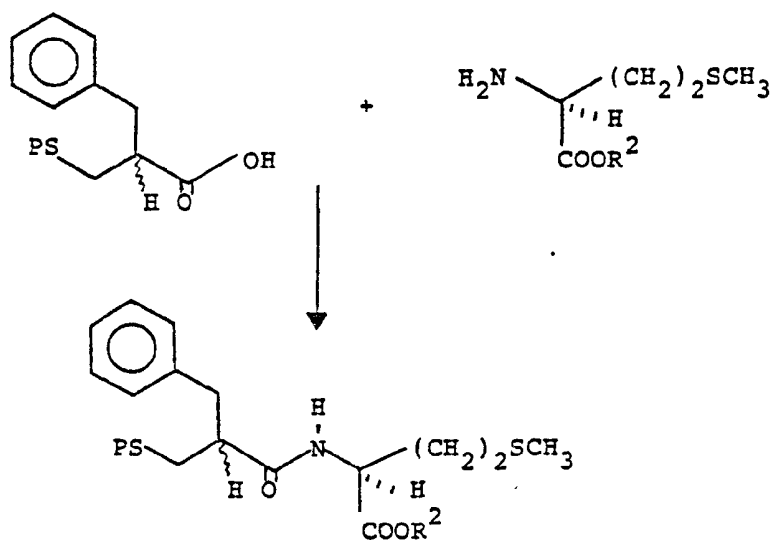
De chirale aminoalkoholer som trengs for syntesen er ofte kommersielt tilgjengelige. De kan alternativt oppnås ved forestring/hydrid-reduksjon av chirale syrer/estere som er tilgjengelige enten kommersielt eller etter litteraturmetoder, f.eks.:



hvor R¹ er som tidligere angitt. Alternativt

oppnås de chirale aminoalkoholer etter standard-separasjonsmetoder ved bruk av et chiralt amin på syretrinet, eller en chiral syre på syre, ester eller alkohol-trinnet.

Karboksylsyrene med formel (III) og (IV) fremstilles likeledes ved å koble en beskyttet merkaptosyre med L-metioninester:



hvor P er som tidligere angitt og R² er en syrebeskyttende gruppe som kan fjernes ved hydrolyse. Den enklest mulige ester, d.v.s. R² = metyl, er meget velegnet til formålet. Koblingen utføres som beskrevet for kobling av en beskyttet merkaptosyre med aminoalkoholer. I dette tilfelle kan imidlertid overskudd av syreklorid (eller andre egnede aktiverte former av syren) benyttes siden aminoesteren ikke inneholder alkoholgrupper. Tidligere bemerkninger angående separasjon av diastereoisomerer eller bruk av chirale syrer som utgangsmaterialer, gjelder også i dette tilfelle. Beskyttelsesgruppene P og R¹ fjernes likeledes, vanligvis samtidig, ved bruk av minst 2 ekvivalenter av en sterk base. En spesielt velegnet metode består i å utføre hydrolysen med et lite overskudd av vandig natriumhydroksyd i et reaksjonsinert løsningsmiddel som er blandbart med vann, f.eks. en lavere alkohol, eller 1,2-dimetoksyetan.

De farmasøytisk akseptable kationiske salter av forbindelsene med formel (III) og (IV) fremstilles lett ved

omsetning av syreformene med en passende base, vanligvis en ekvivalent, i et med-løsningsmiddel. Typiske baser er natriumhydroksyd, natriummetoksyd, natriumetoksyd, natriumhydrid, kalium-metoksyd, magnesiumhydroksyd, kalsiumhydroksyd, ammoniumhydroksyd, benzatin, kolin, dietanolamin, etylendiamin, meglumin, benetamin, dietylamin, piperazin og trometamin. Saltene isoleres ved konsentrering til tørrhet eller ved tilsetning av en ikke-løsende væske. I enkelte tilfelle kan det dannes salter ved at en oppløsning av syren blandes med en løsning av et annet salt av kationen (f.eks. natriumetylheksanoat, magnesiumoleat) under anvendelse av et løsningsmiddel hvor det ønskede kationiske salt utfelles, eller kan isoleres ved konsentrering og/eller tilsetning av et ikke-løsende middel. Ved anvendelse av et salt som ikke ansees som farmasøytisk akseptabelt, for isolering eller rensing, kan dette lett omdannes til den fri syreform ved surgjøring av en vandig oppslemming eller oppløsning av saltet, fulgt av ekstraksjon over i et organisk løsningsmiddel som ikke er blandbart med vann, og inndampning.

Forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen er gjenstand for in vitro studier av inhibering av enkefalinase enzym på følgende måte. For enzymfremstillingen tas hele hjernen (minus cerebellum) ut fra dekapiterte Sprague-Dawley CD hannrotter (Charles River Breeding Laboratories, Inc., Wilmington, MA; 200-250 g). Vevet homogeniseres (Polytron, Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY) i 30 volumer (vekt/volum) iskald 50 mM tris-HCl tris(hydroksymetyl)metylaminhydroklorid, Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ) pH 7,7 buffer. Homogenatet sentrifugeres ved 50.000 x g i 15 minutter. Proppen resuspenderes i 50 mM tris-HCl pH 7,7 buffer og sentrifugeres ved 50.000 x g i 15 minutter. Den resulterende propp resuspenderes og sentrifugeres ytterligere 3 ganger som beskrevet. Membranproppen dispergeres i 15 volumer 50 mM tris-HCl pH 7,7 buffer inneholdende 1% Triton X-100 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA) og inkuberes ved 37°C i 45 minutter. Etter sentrifugering ved 100.000 x g i 60 minutter innfryses de løste enzymer i 2 ml alikvoter (preparatet kan lagres frosset i 3 måneder).

For å bestemme inhibitorer for enkefalinaseinhibering, inkuberes blandinger bestående av 90, μ l 50 mM tris-HCl pH 7,7 buffer inneholdende 3,2 mM puromycindihydroklorid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 200, μ l løsende buffer (fra slutt-trinnet av enzymfremstillingen), 5, μ l inhibitor (forskjellige konsentrasjoner, løst i vann), 200, μ l enzym og 5, μ l 144 nM 3 H-leucin-enkefalin (26,8 Ci/mM, New England Nuclear, Boston, MA), i en time ved 37°C i 1,8 ml polyetylenrør (Beckman Microfuge tubes, Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA). Ett sett kontrollrør inneholder kokt enzym (oppvarmet til 100°C i 10 minutter) som blindprøve. Reaksjonen stoppes ved koking av rørene i 10 minutter etterfulgt av ett minutt sentrifugering i Beckman sentrifugen. En 10, μ l alikvot av hver supernatant avsettes på en tynnskiktsplate (TLC) (silikagel 60, 20 x 20 cm, E. Merck, Darmstadt, Vest-Tyskland) ved bruk av 1-8 prøver pr plate. 10, μ l av en standardblanding bestående av 0,4 mg/ml tyrosin (tyr, Mann Research Laboratories Inc., New York, NY), 1 mg/ml L-tyrosylglycin (tyr-gly-Sigma), 1 mg/ml L-tyrosylglycylglycin (tyr-gly-gly, Sigma) og 1 mg/ml leucin-enkefalin (leu-E, Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, CA) avsettes over hver flekk av inkubasjonsblandingen, samt separat på hver plate for sone-identifisering.

Platene tørkes og anbringes i dekkede glasskammere ekvilibrert med 100 ml isopropanol:etylacetat:5% eddiksyre (2:2:1). Etter utvikling av TLC-platene, fremkalles de separerte komponenter ved spraying med en ninhydrin:aceton (0,5%, vekt/volum) løsning og 10 minutters oppvarming ved 100°C i en vakuum-ovn. R_f -verdiene av markørstandardene er: tyr, 0,33; tyr-gly, 0,20; tyr-gly-gly, 0,13; leu-E, 0,47. De radioaktive flekker identifiseres ved de tilsatte markører og skrapes over i telleglass tilsatt 1 ml etanol etterfulgt av 10 ml aquasol-2 (New England Nuclear). Glassene henstilles over natten for radioaktivitetsmåling i en væskescintillasjonsteller. Tyr-gly-gly-dannelse beregnes på basis av differansen mellom totaltellingen pr minutt for denne TLC-sone, minus den korresponderende verdi oppnådd ved bruk av kokt enzym (blindprøve). Aktiviteten angis som den inhiberende molarkonsentrasjon (IC_{50} , M) som vil inhibere enzymaktiviteten til 50% av normalverdien. Typiske resultater oppnådd med forskjellige

forbindelser fremstilt i henhold til oppfinnelsen er vist i tabell I sammenlignet med tiorfan i den samme test.

Tabell I

Enkefalinase inhibering

<u>Forbindelse</u>		<u>R¹</u>	<u>IC₅₀, M</u>
<u>I/II/III/IV</u>	<u>X</u>		
I	H	CH ₃	4,8 x 10 ⁻⁷
II	H	CH ₃	9,6 x 10 ⁻⁶
III	-	-	9,1 x 10 ⁻⁹
IV	-	-	7 x 10 ⁻⁸
	-tiorfan -		1,5 x 10 ⁻⁸

For å undersøke den analgetiske virkning av forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen, benyttes en smertevoldende kjemisk stimulus d.v.s. blokkering av abdominalrefleksen etter fenylobenzoquinon (PBQ). Herunder anvendes Carworth CF-1 musrase, da denne rase viser en spesielt markert strekkrespons. Forsøksdyrene fastes i 15-16 timer før start av eksperimentet. 15 mus (i grupper på 5) med 11-15 g vekt benyttes pr dosenivå. Forbindelsene gis peroralt eller subkutant. Medikamentforbehandlingstid er 1 time (p.o.) og 20 minutter (s.c.). Par av mus gis 2 mg/kg PBQ i.p. og anbringes i transparente bur (28 x 18 x 24 cm) som holdes ved 40^o av et termostatert vannbad. 5 minutter senere observeres dyrene i 5 minutter og antallet av abdominale reflekser pr dyr registreres. Med en refleks forstås i denne forbindelse en forbigående kontraksjon av abdomen, strekking av bakben, hoftevidning eller opistotonus (muse-buken berører burgulvet og dras over hele burlengden). Graden av analgetisk beskyttelse beregnes på basis av undertrykkelsen av smertebevegelsene i forhold til kontrolldyr testet samme dag (% MPE). Typiske resultater oppnådd med forbindelser fremstilt i henhold til oppfinnelsen er vist i tabell II. Testen gir et uttrykk for den endelige kliniske nytte av forbindelsene som analgetika.

Tabell II

Prosent blokkering av abdominalrefleksen
(%MPE) etter fenylobenzokinon

<u>Forbindelse</u>		<u>R¹</u>	<u>%MPE</u>	<u>Dose (s.c., mg/kg)</u>
<u>I/II/III/IV</u>	<u>X</u>			
I	H	CH ₃	100	320
			69	233
			23	170
I	4-OCH ₃	CH ₃	62	320
I	4-Cl	CH ₃	86	320
II	H	CH ₃	(a)	320
II	4-OCH ₃	CH ₃	46	320
II	4-Cl	CH ₃	75	320
III	-	-	57	160
IV	-	-	48	160

(a) Ingen signifikant virkning registrert ved dette dosenivå.

De antikonvulsive virkninger av forbindelsene bestemmes i forsøk på mus, d.v.s. Charles River hanner, Swiss CD-rase (17-21 g), fastet i 18 timer før undersøkelsen. Grupper av mus behandles med forskjellige nivåer av testforbindelsene og gis 1 time senere supramaksimale elektrokonvulsive sjokk (ECS) i 0,2 sekunder med 50 mA, 60 Hz via transkorneale elektroder. Etter administrering av det elektriske stimulus observeres hver mus i 10 sek. med henblikk på tonisk bakbenschtrekk. Alle kontrollmus får slike kramper. Dataene er samlet i tabell III. Blokkering av supramaksimal ECS hos mus er en vanlig laboratorietest for klinisk egnethet som antikonvulsive og flere kjente antikonvulsive midler oppviser virkning under denne. Det fremgår av tabellen at tiorfan var inaktivt endog ved vesentlig høyere dosering.

Tabell III

Antikonvulsiv virkning av enkefalinase
inhibitorer overfor supramaksimale
elektrokonvulsive sjokk (ECS) hos mus

<u>I/II/III/IV</u>	<u>Forbindelse</u>		<u>ED₅₀</u>
	<u>X</u>	<u>R¹</u>	<u>(s.c., mg/kg)</u>
I	H	CH ₃	178
III	-	-	74,1
IV	-	-	140,8
	- tiorfan -		>320

Hydroksy-derivatene (formel I og II) er ifølge den ovenfor beskrevne enkefalinase-inhiberende og analgetiske virkning, klinisk anvendelige som analgetiske midler, d.v.s. for bruk som smertestillende middel, mens syre-derivatene er klinisk anvendelige som krampehindrende midler.

I begge tilfelle kan forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen formuleres i en rekke farmasøytiske preparatformer som inneholder derivatet alene eller i kombinasjon med farmasøytiske bærere som inerte faste fortynningsmidler, vandige løsninger eller forskjellige ugiftige organiske løsningsmidler og i doseringsformer som gelatinkapsler, tabletter, pulvere, drops, miksturer, injeksjoner og lignende. Bærerne innbefatter vann, etanol, gelatiner, laktose, stivelse, vegetabiliske oljer, gummi, glykoler, talkum, benzoylalkoholer og andre kjente medikamentbærere. Preparatene kan dessuten inneholde ytterligere komponenter så som konserveringsmidler, fuktemidler, stabiliseringsmidler, smøremidler, absorpsjonsmidler, buffere og isotoniske midler.

Derivatene kan gis til pasienten ved konvensjonelle administreringsmåter, f.eks. peroralt, intravenøst, intramuskulært eller subkutant. Generelt gis små initialdoser med en gradvis økning av doseringen inntil optimalnivået er fastlagt. Som ved ethvert medikament, vil imidlertid dosering, formulering og administrasjonsmåte avhenge av pasientens alder, vekt og respons og av behandlende leges vurdering.

Ved vanlig behandlingsforløp vil en totaldose av derivatet på ca. 0,1-100 mg pr døgn gitt som enkelt eller delt dose, gi effektiv behandling innen human-medisinen. Når derivatet har forlenget virkning, kan det gis med lavere hyppighet, f.eks. annenhver dag, eller i form av 1 eller 2 delte doser pr uke.

Eksempel 1

Metyl 2S-(3-acetyltio-2R-benzylpropionyl-
amino)-4-metyltiobutyrat

og

Metyl 2S-(3-acetyltio-2S-benzylpropionyl-
amino)-4-metyltiobutyrat

Tioleddiksyre (10,65 g, 140,0 mmol) ble tilsatt til 2-benzylakrylsyre (10,0 g, 62,0 mmol) og den resulterende løsning oppvarmet til 90°C under nitrogenatmosfære i en time hvorved TLC på kiselgel (eter-eluent) indikerte at reaksjonen i det vesentlige var fullført (R_f 0,3-produkt; R_f 0,6-utgangsmaterial). Reaksjonsblandingen ble avkjølt og tioleddiksyre-overskuddet fjernet under vakuum. Residuet ble kokt azeotropisk med benzen en gang, utnidd tre ganger med heksan og dekantert for å fjerne de siste spor av tioleddiksyre. Det røde olje-residuum ble omgående løst i metylenklorid (25,0 ml) og behandlet med oksalyklorid (21,8 g, 170,0 mmol). Løsningen ble oppvarmet til 40°C under nitrogenatmosfære i en time da gass-utviklingen hadde opphørt. Reaksjonsblandingen ble avkjølt, inndampet under vakuum og kokt azeotropisk med benzen en gang. Residuet ble løst i metylenklorid (25,0 ml) og dråpevis tilsatt i løpet av 0,5 timer til en kald (0°C) omrørt blanding av L-metioninmetylester-hydroklorid (12,3 g, 61,6 mmol), metylenklorid (75,0 ml) og trietylamin (14,51 g, 140,0 mmol). Etter endt tilsetning ble reaksjonsblandingen omrørt i en time ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. TLC-kontroll (eter) viste på dette tidspunkt at reaksjonen var fullført (R_f 0,48, 0,51- produkter, R_f 0,3- utgangsmaterial). Reaksjonsblandingen ble vasket med 2N saltsyre (2 x 25,0 ml), vann (1 x 25,0 ml) og mettet natriumbikarbonat (1 x 25,0 ml). Det organiske lag ble tørket over vannfri magnesiumsulfat, filtrert og

153768

14

konsentrert under vakuum til en blanding av tittelforbindelsen i form av 25,0 g olje. Produktblandingen ble separert i 2 isomerer via væskrokromatografi under middels trykk ved å gå ut fra 7,5 g blanding og eluere ved 35 psi på en 25 x 1000 mm kolonne med 20% eter/heksan, 25% eter/heksan og 30% eter/heksan. Denne prosess ble gjentatt inntil hele blandingen var separert. Derved ble det oppnådd metyl-2S-(3-acetyltio-2S-benzylpropionyl-amino)-4-metyltiobutytrat: 4,1 g (17,3% utbytte) farveløse krystaller smp 68-70°C fra eter/heksan (1:1);

Analyse beregnet for $C_{18}H_{25}O_4NS_2$:

C, 56,37; H, 6,57%; N, 3,65.

Funnet: C, 56,19; H, 6,26; N, 3,64.

og metyl-2S-(3-acetyltio-2R-benzylpropionylamino)-4-metyltiobutytrat: 5,4 g (22,8% utbytte) farveløse krystaller smp. 65-67°C fra eter/heksan (1:1).

Analyse beregnet for $C_{18}H_{25}O_4NS_2$:

C, 56,37; H, 6,57; N, 3,65.

Funnet: C, 56,48; H, 6,35; N, 3,68.

Eksempel 2

2S-(2R-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-
4-metyltiosmørsyre

og

2S-(2S-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-
4-metyltiosmørsyre

En blanding av esterproduktene fra foregående eksempel (18,82 g, 49,0 mmol) i 1,2-dimetoksyetan (72,0 ml) ble omrørt ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. 2N natriumhydroksyd (55,0 ml, 110 mmol) ble tilsatt og den resulterende løsning omrørt i en time. Ved dette tidspunkt indikerte TLC på kiselgel (9:1 kloroform:etanol) at reaksjonen var fullført (R_f 0,2- produkt; R_f 0,75 - utgangsmateriale). 1,2-dimetoksyetan ble fjernet under vakuum og residuet surgjort med 2N saltsyre til pH 2. Residuet ble ekstrahert med etylacetat (3 x 100 ml) og de kombinerte ekstrakter tørket over vannfri magnesiumsulfat. Den tørkede løsning ble konsentrert til 16,4 g oljeaktig råprodukt. Oljeproduktet ble kromatografert på 350 g kiselgel

(230-400 mesh) som ble eluert med kloroform, deretter 1% etanol/kloroform og tilslutt 2% etanol/kloroform.

Produktet ble isolert som en blanding av de to tittelisomerer: 3,4 g (21% utbytte) av et krystallinsk produkt, smp. 130-132°C. Etter en omkrystallisering fra etylacetat ble det oppnådd 2,3 g rent produkt, smp. 137-138°C.

Analyse beregnet for $C_{15}H_{21}O_3NS_2$:

C, 55,02; H, 6,46; N, 4,28.

Funnet: C, 54,66; H, 6,18; N, 4,25.

Eksempel 3

Dicykloheksylammonium-2S-(2R-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-4-metyltiobutytrat

En løsning av metyl-2S-(3-acetyltio-2R-benzylpropionylamino)-4-metyltio-butytrat (0,5 g, 1,3 mmol) i 1,2-dimetoksyetan (1,9 ml) ble omrørt ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. 2N natriumhydroksyd (1,3 ml, 2,6 mmol) ble tilsatt og den resulterende løsning omrørt i en time under TLC kontroll som i foregående eksempel. 1,2-dimetoksyetan ble fjernet under vakuum og residuet surgjort med 2N saltsyre til pH 2. Den surgjorte løsning ble ekstrahert med etylacetat (3 x 15 ml) og de kombinerte ekstrakter tørket over vannfri magnesiumsulfat. Den tørkede løsning ble konsentrert og førte til 484 mg av et oljeaktig råprodukt. Oljeproduktet ble omdannet til dicykloheksaminsaltet i eter, og det ble oppnådd 479 mg produkt (72% utbytte) smp. 152-155°C. En omkrystallisering med isopropanol førte til 171 mg rent produkt, smp. 164-167°C.

Analyse beregnet for $C_{15}H_{21}O_3N_2S \cdot C_{12}H_{23}N$:

C, 63,74; H, 8,72; N, 5,51.

Funnet: C, 63,51; H, 8,35; N, 5,30.

Eksempel 4

2S-(2S-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-
4-metyltiosmørsyre
og
dicykloheksaminsalt

Etter fremgangsmåten i foregående eksempel ble 1 g metyl-2S-(3-acetyltio-2S-benzylpropionylamino)-4-metyltio-butyrat omdannet til 939 mg av tittelproduktet i form av en olje. Oljen ble kromatografert på 20 g kiselgel (230-400 mesh) som ble eluert med eter, hvilket førte til 716 mg (84% utbytte) av det rene tittelprodukt i form av en klar olje. En 565 mg prøve av oljen ble omdannet til dicykloheksylaminsaltet i eter, og førte til 565 mg med smp. 136-141°C. En omkrystallisering fra benzen ga 428 mg produkt, smp. 140-143°C.

Analyse beregnet for $C_{15}H_{21}O_3N_2S \cdot C_{12}H_{23}N$:
C, 63,74; H, 8,72; N, 5,51.
Funnet: C, 63,96; H, 8,58; N, 5,29.

Eksempel 5

2S-(3-benzoyltio-2R-benzylpropionylamino)-
4-metyltio-1-butanol
og
2S-(3-benzoyltio-2S-benzylpropionylamino)-
4-metyltio-1-butanol

En løsning av 2-benzyl-3-benzoyltiopropionsyre (4,44 g, 14,8 mmol) i metylenklorid (25,0 ml) ble omrørt ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. Oksalyklorid (9,3 g, 73 mmol) ble tilsatt og den resulterende løsning oppvarmet til 40°C i en time ved hvilket tidspunkt gassutviklingen var over. Reaksjonsblandingen ble avkjølt, inndampet under vakuum og kokt en gang azeotropisk med benzen, hvorved syrekloridet ble oppnådd. Dette ble løst i metylenklorid (25,0 ml) og dråpevis tilsatt i løpet av 0,5 timer til en kald (0°C) omrørt løsning av 2S-amino-4-metyltio-1-butanol (2,0 g, 14,8 mmol) i metylenklorid (50,0 ml) og trietylamin (1,65 g, 16,0 mmol). Etter endt tilsetning ble reaksjonen omrørt i en time ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. Reaksjonen ble kontrollert

via TLC (kiselgel) med 9:1 kloroform:etanol, og etter en time var reaksjonen fullført (R_f 0,55 - produkter; R_f 0,40 - utgangsmaterial). Reaksjonsblandingen ble vasket med 2N salt-syre (2 x 25 ml), vann (1 x 25,0 ml) og mettet natrium-bikarbonat (1 x 25,0 ml). Det organiske lag ble tørket over vannfri magnesiumsulfat og konsentrert under vakuum til 5,4 g produkt (87% utbytte), smp. 95-97°C. En omkrystallisering med etylacetat ga en prøve av analytisk kvalitet av de blandede tittelprodukter som smeltet ved 104-107°C.

Analyse beregnet for $C_{22}H_{27}O_3NS_2$:

C, 63,28; H, 6,52; N, 3,35.

Funnet: C, 63,24; H, 6,32; N, 3,25.

Eksempel 6

2S-(2R-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-
4-metyltio-1-butanol

og

2S-(2S-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-
4-metyltio-1-butanol

En løsning av blandingen av tittelproduktene fra foregående eksempel (4,5 g, 10,8 mmol) i vannfri metanol (50,0 ml) ble omrørt ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. Fast natrium metoksyd (0,7 g, 12,96 mmol) ble porsjonsvis tilsatt i løpet av 10 minutter. Den resulterende løsning ble omrørt og reaksjonen kontrollert via TLC (kiselgel) med 9:1 kloroform:etanol som viste at reaksjonen var fullført etter en time (R_f 0,35, 0,30 - produkter, R_f 0,40 - utgangsmateriale). Reaksjonsblandingen ble deretter inndampet under vakuum. Residuet ble surgjort med 2N saltsyre til pH 2 og ekstrahert med etylacetat (3 x 25,0 ml). De kombinerte ekstrakter ble tørket over vannfri magnesiumsulfat og konsentrert under vakuum til 4,98 g av en oljeaktig råproduktblanding. Produktblandingen ble kromatografert på 150 g kiselgel (230-400 mesh) med kloroform som eluent og førte til 2 isomerer: 2S-(2R-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-4-metyltio-1-butanol, 0,564 g (16% utbytte) farveløse krystaller, smp. 118-120°C fra eter/petroleter:

153768

18

Analyse beregnet for $C_{15}H_{23}O_2NS_2$:

C, 57,47; H, 7,40; N, 4,47.

Funnet: C, 57,48; H, 7,42; N, 4,52

og 2S-(2S-benzyl-3-merkaptopropionylamino)-4-metyl-tio-1-butanol, 0,6 g (17% utbytte) farveløse krystaller, smp. 67-69°C fra eter/heksan.

Analyse beregnet for $C_{15}H_{23}O_2NS_2$:

C, 57,47; H, 7,40; N, 4,47.

Funnet: C, 57,43; H, 7,20; N, 4,42.

Eksempel 7

2S-[3-benzoyltio-2R-(p-klorbenzyl)-
propionylamino]-4-metyltio-1-butanol

og

2S-[3-benzoyltio-2S-(p-klorbenzyl)-
propionylamino]-4-metyltio-1-butanol

3-benzoyl-2-(p-klorbenzyl)propionsyre (6,34 g, 18,9 mmol) og oksalyklorid (6,5 g, 4,5 ml, 51,6 mmol) i 40 ml metylenklorid ble oppvarmet til 40°C i en time. Reaksjonsblandingen ble avkjølt og inndampet til tørrhet og deretter kokt azeotropisk med benzen, hvorved det korresponderende syreklorid ble oppnådd. 2S-amino-4-merkpto-1-butanol (2,56 g, 18,9 mmol) og trietylamin (2,76 ml, 19,8 mmol) ble blandet i 50 ml metylenklorid og avkjølt til 0°C. Det ovenfor nevnte syreklorid ble løst i 10 ml metylenklorid og dråpevis tilsatt til den avkjølte løsning. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til romtemperatur, omrørt i 16 timer og deretter i rekkefølge vasket med to 25 ml porsjoner 2N saltsyre, 25 ml vann og 25 ml mettet natriumbikarbonat, tørket over vannfri magnesiumsulfat, filtrert, inndampet til tørrhet og residuet krystallisert med eter, hvorved 6,69 g av en blanding av tittelisomerene ble oppnådd, smp. 116-121°C; ir (KBr) 1645, 1659 cm^{-1} . Ved fordampning av morluten ble det oppnådd ytterligere 1,6 g av et mindre rent produkt.

Eksempel 8

2S-[2R-(p-klorbenzyl)-3-merkaptopropionylamino]-
4-metyltio-1-butanol

og

2S-[2S-(p-klorbenzyl)-3-merkaptopropionylamino]-
4-metyltio-1-butanol

Blandingen av tittelforbindelser fra foregående eksempel (6,67 g, 14,76 mmol) ble behandlet som i eksempel 6, hvilket førte til 6,27 g av en blanding av de isomere tittelforbindelser. Den førstnevnte isomer (2,0 g) krystalliserte direkte ut ved opptak av blandingen i eter, smp. 152-154°C. Omkrystallisering fra etylacetat ga 1,2 g (smp. 154-155°C) og en annen fraksjon på 0,37 g.

Analyse beregnet for $C_{22}H_{26}O_3ClNS_2$:

C, 51,78; H, 6,37; N, 4,03.

Funnet: C, 52,34; H, 6,13; N, 4,01.

Etermorluten fra den første krystallisering av den første isomer ble inndampet til tørrhet (4,2 g) og kromatografert ved MPLC ved 70 psi på en Brinkmann 25 x 1000 mm kolonne med kloroform som eluent. Produktfraksjonene av den annen isomer ble samlet og inndampet til tørrhet. Krystallisering fra eter ga 0,5 g av det sistnevnte tittelprodukt, smp. 89-91°C. Omkrystallisering fra etylacetat/heksan ga 354 mg av en første fraksjon (smp. 90-92°C) og 145 mg annen fraksjon.

Analyse beregnet for $C_{22}H_{26}O_3ClNS_2$:

C, 51,78; H, 6,37; N, 4,03.

Funnet: C, 52,06; H, 6,25; N, 4,05.

Eksempel 9

2S-[3-benzoyltio-2R-(p-metoksybenzyl)-
propionylamino]-4-metyltio-1-butanol

og

2S-[3-benzoyltio-2S-(p-metoksybenzyl)-
propionylamino]-4-metyltio-1-butanol

3-benzoyltio-2-(p-metoksybenzyl)propionsyre (6,6 g, 0,02 mol) ble løst i 20 ml metylenklorid. Oksalyklorid (4,8 ml, 0,055 mol) ble tilsatt og blandingen oppvarmet til 40°C i en time. Det resulterende syreklorid ble isolert ved inndampning til en olje og kokt azeotropisk med benzen en gang. Syrekloridet ble løst opp igjen i 10 ml metylenklorid og dråpevis tilsatt til en kald (10°C) løsning av 2S-amino-4-metyltio-1-butanol (2,7 g, 0,02 mol) og trietylamin (3,0 ml, 0,0215 mol) i 30 ml metylenklorid. Etter omrøring i 16 timer ved romtemperatur ble reaksjonsblandingen vasket i rekkefølge med 25 ml porsjoner 1N saltsyre, vann og mettet natriumbi-karbonat, tørket over vannfri magnesiumsulfat, filtrert og inndampet til 7,1 g råprodukt. Råproduktet ble kromatografert ved MPLC (kiselgel, 25 x 1000 mm kolonne, 60 psi) med 10% etanol i kloroform som eluent og førte til en blanding av tittelproduktene [4,3 g, R_f 0,16 (eter), smp. 88-92°C]. Reaksjonsprosedyren ble gjentatt bortsett fra at råproduktet ble gnidd ut med heksan, hvilket ga et lavere utbytte (1,88 g, smp. 84-87°C).

Eksempel 10

2S-[3-merkpto-2S-(p-metoksybenzyl)propionylamino]-
4-metyltio-1-butanol

og

2S-[3-merkpto-2R-(p-metoksybenzyl)propionylamino]-
4-metyltio-1-butanol

Blandingen av tittelisomerene fra foregående eksempel (5,69 g, 12,7 mmol) ble behandlet etter fremgangsmåten i eksempel 6, og ga etter inndampning 5,9 g råprodukt. MPLC på Brinkmann kiselgel (230-400 mesh, 25 x 1000 mm kolonne) med kloroform som eluent, førte til adskillelse av tittelisomerene. Det ble oppnådd rene fraksjoner av den mindre polare førstnevnte tittelisomer [1,2 g; voks; m/e 342; R_f 0,42 (19:1 kloroform:etanol)], blandingsfraksjoner (0,4 g) og den mer polare sistnevnte tittelisomer [1,2 g; R_f 0,25 (19:1 kloroform:etanol); smp. 130-134°C]. Den annen isomer ble omkrystallisert fra etylacetat (162 mg, smp. 138-140°C).
Analyse beregnet for $C_{16}H_{25}NO_3S_2$:

C, 55,95; H, 7,34; N, 4,08; m/e 343.

Funnet: C, 56,16; H, 6,89; N, 4,08; m/e 343.

Fremstilling 1p-klorfenylmetylenmalonsyre

Under nitrogen ble malonsyre (pulverisert, 20 g, 0,192 mol) blandet med acetylklorid (15 g, 0,192 mol) og oppvarmet til 65°C i oljebad. p-klorbenzaldehyd (21,6 g, 0,153 mol) ble tilsatt og blandingen oppvarmet videre til 80°C. En gul løsning som kokte langsomt under tilbakeløpskjøling fulgt av rikelig utfelling av faststoff, resulterte. Blandingene ble avkjølt og produktet frafiltrert, resuspendert i vann, omrørt i 5 minutter og filtrert igjen hvorved tittelproduktet (21,1 g; 61% av teoretisk utbytte; smp. 215°C (dekomp.) ble oppnådd.

Fremstilling 2p-metoksyfenylmetylenmalonsyre

Etter fremgangsmåten i foregående fremstilling ble p-metoksybenzaldehyd (21 g, 0,154 mol) omdannet til tittelproduktet (10,0 g; 58% av teoretisk utbytte).

Fremstilling 3p-klorbenzylmalonsyre

p-klormetylenmalonsyre (71,1 g) i 600 ml etylacetat ble hydrogenert over 10% Pd/C (3 g) på en Paar rystemaskin ved 50 psig til henimot 1 hydrogenekvivalent var konsumert. Katalysatoren ble gjenvunnet ved filtrering og morluten inndampet til tørrhet i vakuum. Residuet ble gnidd ut med heksan og ga 69 g (90%) av tittelproduktet.

Fremstilling 4p-metoksybenzylmalonsyre

Tittelproduktet fra fremstilling 2 (15 g) i 325 ml etylacetat ble hydrogenert over 1 g 50% Pd/C som i foregående eksempel. Det ble oppnådd 9,8 g av tittelproduktet.

Fremstilling 52-(p-klorbenzyl)akrylsyre

Tittelproduktet fra fremstilling 3 (35 g, 0,153 mol) ble blandet med 20 ml vann, omrørt i et isbad og dråpevis tilsatt 25% vandig dimetylamin til pH 7,5. En annen porsjon (35 g) av malonsyren og tilstrekkelig vann til oppløsning ble tilsatt. Vandig formaldehyd (35 ml 36% oppløsning) ble tilsatt, hvorpå den omrørte løsning gradvis fikk anta romtemperatur og omrørt i 17 timer. Det dimetylaminometylerede mellomprodukt ble frafiltrert og delvis tørket ved avsugning (108 g fuktig). Det fuktige mellomprodukt ble blandet med 500 ml vann og oppvarmet på et dampbad i 2 timer, hvorunder tydelig karbondioksyduttvikling kunne registreres. Reaksjonsblandingen ble avkjølt, pH regulert til 2,0 med 6N saltsyre og det utfelte tittelprodukt frafiltrert (35,3 g, smp. 95-96°C).

Fremstilling 62-(p-metoksybenzyl)akrylsyre

Tittelforbindelsen i fremstilling 4 (25 g, 0,111 mol) ble blandet med 25 ml vann og pH regulert til 7,3 med 25% vandig dimetylamin. Løsningen ble avkjølt i is-acetonbad, tilsatt ytterligere malonsyre (25 g) og blandingen omrørt inntil oppløsning. Formaldehyd (35 ml 36% vandig løsning) ble tilsatt. Blandingen ble kort omrørt i et is-acetonbad og deretter oppvarmet til romtemperatur. Det utfelte tittelprodukt ble frafiltrert (21 g, 49% teoretisk utbytte).

Fremstilling 73-benzoyltio-2-(p-klorbenzyl)propionsyre

En løsning av 2-(p-klorbenzyl)akrylsyre (3,93 g, 22 mmol) og tiobenzoesyre (2,6 ml, 20 mmol) i 40 ml metylenklorid ble tilbakeløpsbehandlet i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble inndampet til tørrhet og produktet omkrystallisert fra heksan (4,5 g). Mer produkt ble oppnådd ved inndampning av heksanmorluten og kromatografi av residuet (7,1 g) på 200 g kiselgel (230-400 mesh) med kloroform som eluent; 1,8 g, smp. 111-114°C.

Fremstilling 83-benzoyltio-2-(p-metoksybenzyl)propionsyre

Etter fremgangsmåten for fremstilling 7 ble 2-(p-metoksybenzyl)akrylsyre (3,84 g, 20 mmol) omsatt med tiobenzoesyre, hvorved tittelproduktet ble oppnådd i praktisk talt kvantitativt utbytte [6,61 g; R_f 0,48 (eter)].

Fremstilling 9

Optisk separasjon av

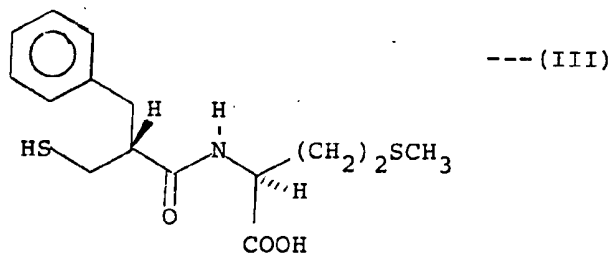
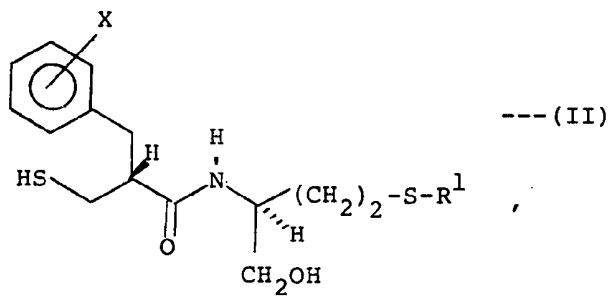
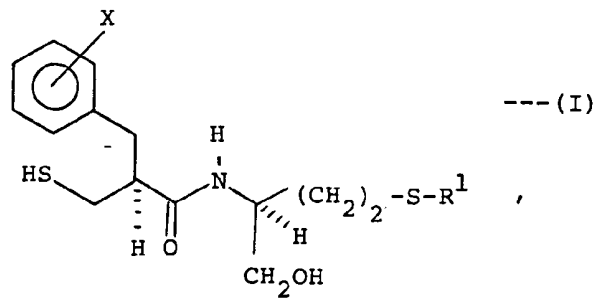
3-benzoyltio-2-benzylpropionsyre

Racemisk 3-benzoyltio-2-benzylpropionsyre (10 g) ble løst i 150 ml eter og langsomt tilsatt til 24,4 g (35 mmol) d-(+)-alfa-metyl-benzylamin, hvorved det ble oppnådd 14 g salt [α_{589}^D (C = 1, CHCl_3) + 3,46°]. To omkrystalliseringer fra metylenklorid-heksan ga 3 g av et salt som inneholdt mest 2(S) isomer [α_{589}^D (C = 1, CHCl_3) - 21,2°]. Ytterligere krystallisering fra isopropylalkohol ga 1,56 g av saltet av 2(S) isomeren [ca. 90% 2(S) isomer], [α_{589}^D (C = 1, CHCl_3) - 25°], smp. 131-133°. Den fri syre [ca. 90% 2(S) isomer] ble frigjort ved oppløsning i vann, tilsetning av 2 NHCl og ekstraksjon av produktet over i etylacetat. Tørking over MgSO_4 og konsentrering førte til den fri 2(S) syre, farveløse krystaller, smp. 64-67°, [α_{589}^D (C = 1, CHCl_3) -36.39°].

Kobling med L-metioninol og avspaltning av beskyttelsesgruppen ga i det vesentlige 2S-(2S-benzyl-3-merkaptopropionyl-amino)-4-metyltio-1-butanol-produktet fra eksempel 6.

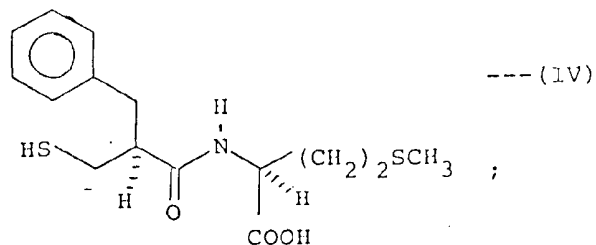
P a t e n t k r a v

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av en terapeutisk aktiv forbindelse med formel



eller

153768



hvor:

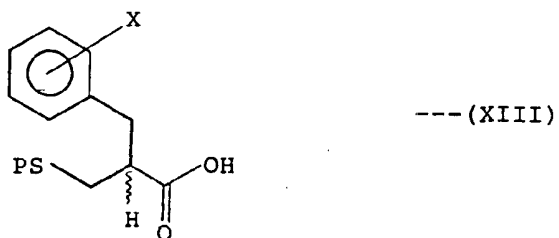
X er hydrogen, (C₁-C₃)alkoksy, fluor, klor eller brom;

og

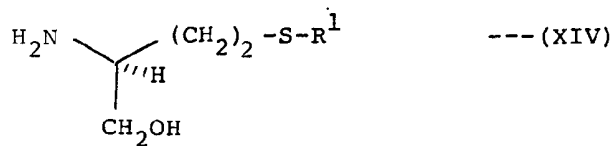
R¹ er (C₁-C₃)alkyl;

karakteriseret ved:

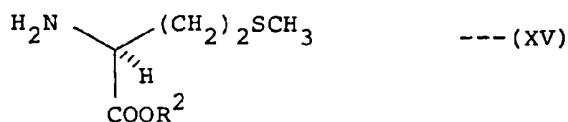
(a) kobling av en forbindelse med formel



med en forbindelse med formel



eller



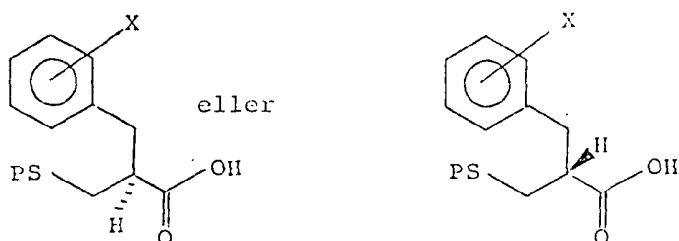
hvor X og R^1 , er som ovenfor angitt,

P er en svovelbeskyttende gruppe som fjernes selektivt ved hydrolyse; og

R^2 er en syrebeskyttende gruppe som fjernes selektivt ved hydrolyse;

idet X=H når koblingen skjer med en forbindelse med formel XV, hvorpå de resulterende diastereoisomerer enten separeres og hydrolyseres eller hydrolyseres og separeres; eller

(b) kobling av en forbindelse med formel



hvor P og X er som ovenfor angitt, med en forbindelse med formel (XIV) eller (XV), idet X=H når koblingen skjer med en forbindelse med formel XV, og hydrolyse av det resulterende mellomprodukt; og, eventuelt,

omdanning av en forbindelse med formel (III) eller (IV) til et farmasøytisk akseptabelt kation-salt.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i - s e r t v e d at det fremstilles en forbindelse med formel (I) hvor X er hydrogen og R^1 er metyl.

3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i - s e r t v e d at det fremstilles en forbindelse med formel (I) hvor X er 4-klor og R^1 er metyl.

153768

4. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i-
s e r t v e d at det fremstilles en forbindelse med
formel (III).

5. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i-
s e r t v e d at det fremstilles en forbindelse med
formel (IV).