(19) DANMARK (11) **DK 175228 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: **A 61 K 31/352** **A 61 K 31/445** **C 07 D 405/04** **C 07 D 405/14** **C 07 D 409/14**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1989 05372**

(22) Indleveringsdag: **1989-10-27**

(24) Løbedag: **1989-10-27**

(41) Alm. tilgængelig: **1990-04-29**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-07-19**

(30) Prioritet: **1988-10-28 DE 3836676**

(73) Patenthaver: **Hoechst Aktiengesellschaft, Brüningstrasse 45, D-65926 Frankfurt/Main, Tyskland**

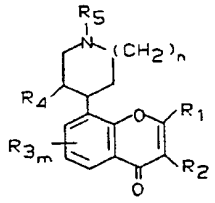
(72) Opfinder: **Ramchandra Ganapati Naik, M-4, Hoechst Executive Quarters, Darga Road, Mulund (West), Bombay 400082, Indien**
Bansi Lal, 30A, Advani Apartments, Mulund (West), Bombay 400 080, Indien
Richard Helmut Rupp, Roederweg 16a, D-6240 Koenigstein/Taunus, Tyskland
Hans Harald Sedlacek, Sonnenhang 3, D-3550 Marburg, Tyskland
Gerhard Dickneite, Zum Neuen Hieb 31, D-3550 Marburg, Tyskland
Joerg Czech, Hoehenweg 3, D-3550 Marburg, Tyskland

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Anvendelse af 4H-1-benzopyran-4-on-derivater til fremstilling af et lægemiddel med en virkning mod tumorer**

(57) Sammendrag:

4H-1-benzopyran-4-on-derivater med den almene formel



(I)

i hvilken
R_1 betyder hydrogen, alkyl med 1-6 carbonatomer, aryl-C_1--C_4-alkyl, substitueret C_1-C_6-alkyl, C_3-C_6-cycloalkyl, en C_3-C_9-heterocyclisk ring med 1, 2 eller 3 heteroatomer, f.eks. N, S, O eller deres vilkårlige kombinationer, C_3-C_6--cycloalkyl-C_1-C_4-alkyl, C_2-C_6-alkenyl, C_2-C_6-alkynyl, aryl, herunder polycycliske ringe, aromatiske heterocycliske grupper, substitueret aryl, carboxyl eller en aldehyd- eller COO-C_1-C_4-alkylgruppe, en primær amino-, alkylamino-, aralkylamino-, dialkylamino-, amido-, arylamino-, diarylaminogruppe eller -CH_2O-C_1-C_4-alkyl,
R_2 betyder hydrogen, alkyl med 1-6 carbonatomer, aryl, nitro, amino, di-C_1-C_4-alkylamino eller et halogenatom, hydroxy, alkoxy, -COOH, -COO-C_1-C_4-alkyl, -CHO, -CH_2OH eller -CH_2O-

fortsættes

$-C_1-C_4$-alkyl,

R_3 betyder hydrogen, C_1-C_4-alkyl, substitueret C_1-C_4-alkyl, hydroxy, carboxyl, C_1-C_4-alkyl, nitro, amino, en C_1-C_4-alkyl-amino- eller di-C_1-C_4-alkylaminogruppe eller halogen,

O-alkyl-C-alkyl, -CHO, $-CH_2OH$, $-CH_2O-C_1-C_4$-alkyl eller

R-N-C-O-, hvor R betyder H, C_1-C_6-alkyl, cycloalkyl,

O-alkyl-C-alkyl eller aryl,

R_4 betyder hydrogen, hydroxy, C_1-C_4-alkoxy, C_1-C_4-alkanoyl-oxy, C_1-C_4-alkoxycarbonyl, aryloxy, amino eller en C_1-C_4--alkylamino eller di-C_1-C_4-alkylaminogruppe,

R-N-C-O-,

hvor R betyder H, C_1-C_6-alkyl, cycloalkyl, O-alkyl-C-alkyl eller aryl,

R_5 betyder hydrogen, C_1-C_6-alkyl, aryl-C_1-C_4-alkyl, C_3-C_6--cycloalkyl, C_3-C_6-cycloalkyl-C_1-C_4-alkyl, alkylamino,



C_1-C_4-alkanoyl, C-O-C_1-C_4-alkyl eller aroyl, idet arylgruppen betegner usubstitueret eller mono- eller polysubstitueret phenyl,

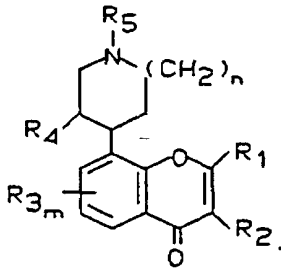
m betyder et helt tal mellem 0 og 3, og

n betyder et helt tal mellem 0 og 2,

samt disse forbindelsers farmakologisk uskadelige syreadditionssalte, kan anvendes til fremstilling af lægemidler til inhibering af onkogen-kodende kinaser og/eller vækstfaktorreceptor-tyrosinkinaser. Et sådant lægemiddel kan anvendes til bekæmpelse af tumorer.

Den foreliggende opfindelse angår anvendelsen af 4H--1-benzopyran-4-on-derivater til fremstilling af et lægemiddel med en virkning mod tumorer.

Benzopyranderivater er allerede kendt fra EP patentskrift nr. 137.193 og fra DE offentliggørelsesskrift nr. 3.612.337. I det sidstnævnte skrift beskrives der forbindelser med den almene formel



a)

i hvilken substituenterne R_1-R_5 samt m og n har de angivne betydninger. Disse forbindelser har en betændelseshæmmende, analgetisk og immun-modulerende virkning.

Det har nu overraskende vist sig, at bestemte 4H-1--benzopyran-4-on-derivater inhiberer onkogen-kodende kinaser og dermed egner sig til bekæmpelse af tumorlidelser.

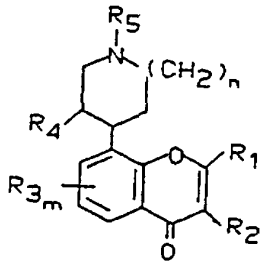
Ekspressionen af onkogener i en pattedyrscelle indtræder med overgangen fra den normale til den transformerede celletype, der dernæst bliver til en cancercelle. Transformationen fremkaldes ved infektion af en celle med et retrovirus. Et godt kendt eksempel er infektionen af høns med Rous-Sarkom-virus, der derefter udvikler cancer. Det tilsvarende onkogen, der er ansvarligt for den ondartede transformation, betegnes sosm "SRC"-(Sarcom)-genet, jf. J.S. Brugge, R.L. Erikson, Nature 269, 346-348 (1977). Mange til dato kendte onkogener er karakteriseret ved ekspressionen af et protein med kinaseaktivitet. Enzymerne katalyserer overførslen af den endestillede phosphatgruppe i ATP på en aminosyre. I modsætning til mange andre proteinkinaser, der overfører phosphatgruppen på en seryl- eller threonylgruppe, phosphorylerer de fleste onkogen-kodende kinaser en tyrosylgruppe i proteinkæden. Bortset herfra er det kendt, at produkter af onkogener, nemlig produkterne af v-mos-, v-mil-

og v-raf-onkogenet, er i besiddelse af serin/threonin-specifik proteinkinaseaktivitet, jf. K. Mölling et al., Nature (London) 312, 558-561 (1984) og B. Singh et al., Journal of Virology 60, 1149-1152 (1986).

Tyrosinkinaseaktivitet eksprimeres også i vækstfaktorreceptorer. Nye erkendelser viser nu, at væksten af mange tumorer afhænger af nærværelsen af vækstfaktorer såsom epiderm vækstfaktor (EGF), transformerende vækstfaktor α (TGFα) eller blodplade-afledt vækstfaktor (PDGF), jf. A.S. Goustin, G.D. Shipley, H.L. Moses, Cancer Research 46, 1015-1029 (1986). I tilslutning til bindingen af vækstfaktoren til dens receptor stimuleres tyrosinkinasen, der er en egenbestanddel af vækstfaktorreceptoren.

Af en inhibitor af tyrosinkinase og måske af serin/-threonin-kinase kunne man således forvente en inhibering af tumorvækst og tumorudbredelse, og en sådan inhibitor kunne anvendes ved tumorterapi.

Den foreliggende opfindelse angår således anvendelsen af 4H-1-benzopyran-4-on-derivater med den almene formel I til fremstilling af et lægemiddel med en virkning mod tumorer. Formlen I har følgende udseende:



(I)

i hvilken

R_1 betyder hydrogen, alkyl med 1-6 carbonatomer, aryl-C_1--C_4-alkyl, substitueret C_1-C_6-alkyl, C_3-C_6-cycloalkyl, en C_3-C_9-heterocyclisk ring med 1, 2 eller 3 heteroatomer, f.eks. N, S, O eller deres vilkårlige kombinationer, C_3-C_6--cycloalkyl-C_1-C_4-alkyl, C_2-C_6-alkenyl, C_2-C_6-alkynyl, aryl, herunder polycycliske ringe, aromatiske heterocycliske grupper, substitueret aryl, carboxyl eller en aldehyd- eller COO-C_1-C_4-alkylgruppe, en primær amino-, alkylamino-, aralkylamino-, dialkylamino-, amido-, arylamino-, diarylamino-

gruppe eller $-CH_2O-C_1-C_4$-alkyl;
R_2 betyder hydrogen eller C_1-C_3-alkyl;
R_3 er ens og betyder OH eller OCH_3;
R_4 betyder hydroxy;
R_5 betyder CH_3;
m betyder tallet 2; og
n betyder tallet 1;
samt disse forbindelsers farmakologisk uskadelige syreadditionssalte.

De her omhandlede forbindelser har to asymmetriske centre, et ved forbindelsesstedet for den nitrogen-heterocycliske ring med benzopyrandelen (C-4'), og det andet ved det ved R_4 substituerede carbonatom (C-3'), idet to optiske isomerpar er mulige. Definitionen af de her omhandlede forbindelser omfatter alle mulige stereoisomere og deres blandinger. Ganske specielt omfattet er de racemiske former og de isolerede optiske isomere med den angivne aktivitet. De to racemater kan adskilles ved fysiske metoder, f.eks. ved fraktioneret krystallisation. De enkelte optiske isomere kan fås ud fra racematerne ved standardmetoder, f.eks. saltdannelse med en optisk aktiv syre og påfølgende krystallisation.

Egnede alkylgrupper i betydningen R_1 er f.eks. ligekædede eller forgrenede grupper med op til 6, fortrinsvis op til 5 carbonatomer, f.eks. methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, tert.butyl-, pentyl- eller isopentylgrupper.

Egnede substituerede alkylgrupper R_1 er f.eks. halogenalkyl, f.eks. trifluormethyl, hydroxyalkyl, f.eks. hydroxyethyl, eller carboxyalkyl, f.eks. carboxyethyl.

Egnede eksempler på en cycloalkylgruppe R_1 med 3-6 carbonatomer er cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl eller cyclohexyl. Cyclopropylmethyl er et eksempel på en cycloalkylalkylgruppe.

Et eksempel på en aralkylgruppe R_1 er en phenylalkylgruppe, i hvilken phenylgruppen er usubstitueret eller substitueret en eller flere gange med substituenter såsom halo-

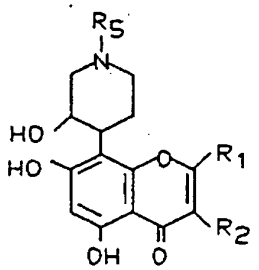
gen, C_1-C_4-alkyl, C_1-C_4-alkoxy, nitro eller en trifluormethylgruppe, en aminogruppe eller en substitueret aminogruppe.

Et eksempel på en arylgruppe R_1 er en phenylgruppe, der er usubstitueret eller substitueret en eller flere gange med substituenter såsom halogen, C_1-C_4-alkyl, C_1-C_4-alkoxy, hydroxy, carboxy, COO-alkyl, $CONH_2$, CONH-alkyl, CON(alkyl)$_2$, nitro eller trifluormethyl, amino, C_1-C_4-alkylamino, di-C_1-C_4-alkylamino, aromatiske heterocycliske grupper, f.eks. pyridylgrupper, og polycycliske aromatiske grupper, f.eks. naphthylgrupper.

Et egnet eksempel på en alkylaminogruppe R_1 er gruppen $(CH_2)_n$-NR_6R_7, i hvilken n betyder 1-3, og R_6 og R_7 betyder alkyl og har samme betydning som ovenfor angivet med hensyn til alkyl i betydningen R_1-R_5. Desuden kan R_6 og R_7 sammen med det nitrogenatom, hvortil de er bundet, danne en heterocyclisk ring med ét eller flere heteroatomer. Egnede eksempler på heterocycliske ringe, der dannes af R_6 og R_7 sammen med det nitrogenatom, hvortil de er bundet, er piperidin, pyrrolidin, morpholin, piperazin eller imidazol, der er usubstitueret eller kan være substitueret i en eller flere stillinger med C_1-C_4-alkyl, C_1-C_4-alkoxy, aryl eller en hydroxy- eller aminogruppe.

Egnede eksempler på salte af de her omhandlede forbindelser med uorganiske eller organiske syrer er hydrochloridet, hydrobromidet, sulfatet, phosphatet, acetatet, oxalatet, tartratet, citratet, maleinatet eller fumaratet.

Ifølge opfindelsen foretrækkes anvendelsen af forbindelserne med den almene formel



(Ia)

i hvilken

R_1, R_2 og R_5 har den i krav 2 angivne betydning, samt disse

forbindelsers fysiologisk uskadelige syreadditionssalte.

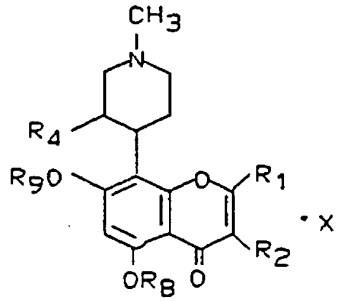
Ganske særligt foretrækkes anvendelsen af forbindelser med formlen Ia ifølge krav 2, hvilke forbindelser er ejendommelige ved, at R_1 betyder phenyl, thienyl, pyridyl, chlorphenyl, dichlorphenyl, methylphenyl, aminophenyl, bromphenyl, hydroxyphenyl eller naphthyl, R_2 betyder hydrogen, og R_5 betyder methyl, samt disse forbindelsers farmakologisk uskadelige syreadditionssalte.

Fremstillingen af disse forbindelser kan f.eks. ske som beskrevet i EP patentskrift nr. 157.193 eller i DE offentliggørelsesskrift nr 3.612.337.

Foretrukne forbindelser, der særligt egner sig til anvendelsen ifølge opfindelsen, er f.eks. følgende:
(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-thienyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on,
(-)-cis-5,7-dihydroxy-2-phenyl-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)--piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-phenyl-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)--piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(-)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-pyridyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-pyridyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(3-pyridyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(4-pyridyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(-)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-chlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(+)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-chlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-chlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2,5-dichlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy--1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid,
(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2,4-dichlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-

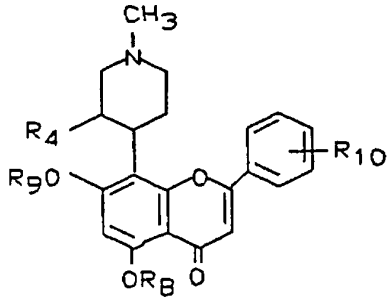
-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid, (±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(4-methylphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid, (±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(3-methylphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid, (±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(4-aminophenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid, (±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(3-bromphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid, (±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-naphthyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid, (±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on og (±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on.

Yderligere her omhandlede 4H-1-benzopyran-4-on-derivater eller forbindelser, der særligt egner sig til den her omhandlede anvendelse, er anført i de følgende tabeller I og II med tilhørende fysiske data. Tabel I vedrører forbindelserne med den almene formel



(Ic)

og tabel II vedrører forbindelserne med den almene formel



(Id)

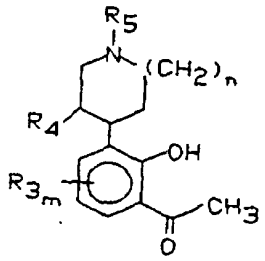
TABEL I

Forb. nr.	R_1	R_2	R_4	R_8	R_9	X	Smp. (°C)	Optisk drejning
1	H	H	OH	H	H	-	298 (sønderd.)	(±)
2	H	H	OH	CH_3	CH_3	HCl, $1,5H_2O$	173-175	(±)
3	CH_3	H	OH	H	H	HCl,	237-240	(±)
4	CH_3	H	OH	H	H	HCl,	241-43	(+)
5	CH_3	H	OH	H	H	HCl,	241-42	(-)
6	CH_3	H	OH	H	CH_3	HCl,	230-232	(±)
7	CH_3	H	OH	CH_3	CH_3	2HCl, $2H_2O$	236-239	(±)
9	C_2H_5	H	OH	H	H	HCl, $1,5H_2O$	230-233	(±)
10	C_2H_5	H	OH	CH_3	CH_3	HCl, $1,5H_2O$	240-242	(±)
11	n-C_3H_7	CH_3	OH	H	H	-	191-192	(±)
12	n-C_3H_7	H	OH	H	H	HCl,	190-192	(±)
13	n-C_3H_7	H	OH	H	H	HCl, $0,5H_2O$	197-200	(+)
14	n-C_3H_7	H	OH	H	H	HCl, $0,5H_2O$	198-201	(-)
15	n-C_4H_9	H	OH	H	H	HCl, H_2O	157-159	(±)
16	CH_3	CH_3	OH	H	H	H_2O	232-233	(±)
17	2-Pyridyl	H	OH	H	H	HCl, $0,5H_2O$	229°C	(±)
18	3-Pyridyl	H	OH	H	H	2HCl, $2H_2O$	278-280	(±)
19	4-Pyridyl	H	OH	H	H	2HCl, $1,5H_2O$	236-238	(±)
20	CO_2H	H	OH	CH_3	CH_3	H_2O	>340	(±)
21	2-Thienyl	H	OH	H	H	$2H_2O$	243-244	(±)
22	2-Thienyl	H	OH	CH_3	CH_3	-	207-208	(±)
23	2-Pyridyl	H	OH	H	H	2HCl, $2H_2O$	220-228	(-)
24	ß-Styryl	H	OH	H	H	HCl, $1,5H_2O$	>300	(±)
25	1-Naphthyl	H	OH	H	H	HCl, H_2O	195-200	(±)
26	2-Naphtyl	H	OH	H	H	HCl, $0,5H_2O$	280-282	(±)
27	(2-Chlor-phenyl)-methyl	H	OH	H	H	HCl	270-275	(±)

TABEL II

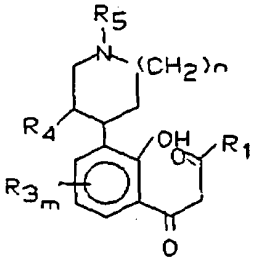
Forb. nr.	R_{10}	R_8	R_9	X	Smp. (°C)	Optisk drejning
28	H	H	H	HCl, $2H_2O$	273-275	(±)
29	4-NO_2	H	H	HCl, $3H_2O$	249 (sønderd.)	(±)
30	4-NO_2	CH_3	CH_3	HCl, $2H_2O$	257-260 (")	(±)
31	2-Cl	H	H	HCl, H_2O	198-200	(±)
32	2-Cl	CH_3	CH_3	1,5HCl, H_2O	190-191	(±)
33	4-NH_2	H	H	2HCl, $2H_2O$	240-242	(±)
31	3,5-Dimethoxy	CH_3	CH_3	2HCl, $2H_2O$	180-182	(±)
32	4-Br	H	H	HCl, $2H_2O$	215	(±)
33	4-Cl	H	H	HCl, $1,5H_2O$	225	(±)
34	2,4-Dichlor	H	H	HCl, $2,5H_2O$	165-166	(±)
35	4-F	H	H	HCl, H_2O	285-287	(±)
36	2-F	H	H	HCl, $2H_2O$	263-265	(±)
37	4-Methyl	H	H	HCl, $1,5H_2O$	247-49	(±)
38	3,5-Dihydroxy	H	H	HCl, $3H_2O$	300-302	(±)
39	3-Cl	H	H	HCl, $2H_2O$	288-290	(±)
40	3-Methyl	H	H	HCl, $2H_2O$	268	(±)
41	2-Methyl	H	H		204-205	(±)
42	2-Cl	H	H	HCl, $2H_2O$	190-192	(+)
43	H	H	H	HCl	269-271	(±)
44	3-Br	H	H	HCl, $2H_2O$	285	(±)
45	3-CO_2Me	CH_3	CH_3	1,5HCl, $3H_2O$	235	(±)
46	2,5-Dichlor	H	H	HCl, H_2O	251-252	(±)
47	3-COOH	CH_3	CH_3	HCl, $1,5H_2O$	270	(±)
48	2-Cl	H	H	HCl, $1,5H_2O$	190-194	(-)
49	H	H	H	HCl, $0,5H_2O$	266-269	(-)
50	H	H	H	HCl	270-271	(+)
51	4-OH	H	H	H_2O	> 340	(±)
52	4-Phenyl	H	H	HCl	240-242	(±)
53	2-Br	H	H	$1,5H_2O$	250-252	(±)
54	2-OH	H	H	H_2O	265-270	(±)

Fremstillingen af nogle af de ifølge opfindelsen anvendelige forbindelser samt fremstillingen af de nødvendige udgangsstoffer er udførligt beskrevet i DE offentliggørelsesskrift nr. 3.612.337. En fremgangsmåde til fremstilling af forbindelserne er ejendommelig ved, at man omsætter en forbindelse med den almene formel



(II)

i hvilken R_4 betyder hydroxy eller acetoxy, og R_3, R_5, n og m har de ovenfor angivne betydninger, f.eks. med et alkalimetal og alkylesteren af en syre med formlen R_1-COOalkyl, hvor R_1 har den i forbindelse med formlen I angivne betydning, til dannelse af en diketon med den almene formel

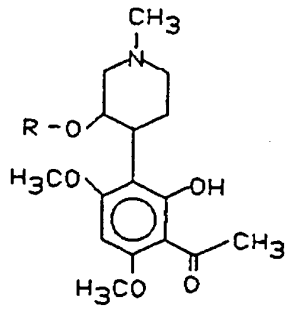


(III)

hvorpå den dannede forbindelse ved omsætning med en mineralsyre ringsluttes til en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_1, R_3, R_5, m og n har de ovenfor angivne betydninger, R_4 betyder en hydroxy- eller acetoxygruppe, og R_2 betyder hydrogen, hvorpå om ønsket en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_5 betyder CH_3, efter beskyttelse af hydroxygrupperne, omsættes med bromcyan, og den dannede forbindelse omsættes surt eller alkalisk til en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_5 betyder hydrogen, eventuelt en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_5 betyder hydrogen, omsættes med egnede elektrofile reagenser såsom halogenider, syrechlorider, tosylater eller enoner, til forbindelser med formlen Ib, i hvilken R_5 betyder usubstitueret eller substitueret

C_1-C_6-alkyl, aryl--C_1-C_4-alkyl, C_3-C_6-cycloalkyl eller C_3-C_6-cycloalkyl-C_1-C_4-alkyl, og en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_2 betyder hydrogen, eventuelt omsættes med et sekundært aminhydrochlorid og paraformaldehyd til en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_2 betyder dialkylaminomethyl, eller en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_2 betyder hydrogen, eventuelt nitreres til en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_2 betyder NO_2, og en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_2 betyder NO_2, eventuelt hydrogeneres til en forbindelse med formlen Ib, i hvilken R_2 betyder en aminogruppe.

Betingelserne for de enkelte reaktionstrin er de samme som beskrevet i DE offentliggørelsesskrift nr. 3.612.337. En særlig foretrukken metode til fremstilling af de her omhandlede forbindelser er omsætningen af en forbindelse med den almene formel



(IV)

i hvilken R betyder H, med en forbindelse med formlen

R_1-COO X

i hvilken X betyder hydrogen eller halogen, fortrinsvis hydrogen eller chlor. Denne esterificering finder sted under alment kendte betingelser, f.eks. som beskrevet i Organicum, VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften, 15. oplag, Berlin 1977, kapitel D7. De således dannede estere behandles med baser, f.eks. natriumhydrid, fortrinsvis i aprotiske opløsningsmidler, f.eks. tetrahydrofuran, dioxan eller N,N-dimethylformamid, i en indifferent atmosfære, hvorved der

dannes diketoner, som almindeligvis ikke isoleres. Den beskrevne omsætning illustreres nærmere i de følgende eksempler.

De her omhandlede forbindelser er i besiddelse af farmakologiske egenskaber, og de inhiberer navnlig onkogen-kodende kinaser, f.eks. tyrosinkinase, serin/threoninkinase og vækstfaktorreceptor-tyrosinkinase, og det kan således forventes, at de inhiberer væksten og udbredelsen af tumorer og kan anvendes ved tumorterapi.

Anvendelsen ifølge opfindelsen af 4H-1-benzopyran-4-on-derivaterne sker på i og for sig kendt, for fagmanden gængs måde. Som lægemiddel anvendes en virksom mængde af det nævnte virksomme stof, enten i sig selv eller fortrinsvis i kombination med egnede farmaceutiske hjælpestoffer i form af tabletter, dragées, kapsler, suppositorier, emulsioner, suspensioner eller opløsninger, idet indholdet af det virksomme stof kan andrage op til ca. 95%, fortrinsvis mellem 10 og 75%.

Yderligere hjælpestoffer, der er egnet til den ønskede lægemiddelsammensætning, er kendt for fagmanden på grundlag af dennes almene viden. Ud over tablethjælpestoffer, opløsningsmidler, geldannere, suppositoriegrundlag og andre bærere for virksom stof kan der f.eks. anvendes antioxidanter, dispergeringsmidler, emulgatorer, skumdæmpende midler, smagskorrigerende midler, konserveringsmidler, opløsningsformidlere eller farvestoffer.

Det virksomme stof kan indgives oralt, paranteralt, intravenøst eller rektalt, idet den intravenøse indgivelse foretrækkes. Til en oral anvendelsesform blandes det nævnte virksomme stof eventuelt med yderligere aktive forbindelser med de dertil egende tilsætningsstoffer, f.eks. bærestoffer, stabilisatorer eller indifferente fortyndingsmidler, og bringes ved hjælp af gængse metoder på egnede indgivelsesformer, f.eks. tabletter, dragées, stikkapsler samt vandige, alkoholiske eller olieagtige suspensioner eller opløsninger. Som indifferente bærestoffer kan der f.eks. anvendes gummi ara-

bicum, magnesiumoxid, mælkesukker, glucose eller stivelse, navnlig majsstivelse. Fremstillingen af præparatet kan ske såvel som tør- som fugtigt granulat. Som olieagtige bærestoffer eller opløsningsmidler kommer f.eks. vegetabilske eller animalske olier i betragtning, f.eks. solsikkeolie eller levertran.

Til subkutan eller intravenøs indgivelse bringes det virksomme stof om ønsket sammen med de dertil gængse stoffer, f.eks. opløsningsformidlere, emulgatorer eller yderligere hjælpestoffer, i opløsning, suspension eller emulsion. Som opløsningsmidler kan der f.eks. anvendes vand, fysiologisk kogesaltopløsning eller alkoholer, f.eks. ethanol, propanol eller glycerol, samt endvidere også sukkeropløsninger, f.eks. glucose- eller mannitolopløsninger, eller også en blanding af de forskellige nævnte opløsningsmidler.

Den dosis af 4H-1-benzopyran-4-on-derivater, der skal indgives, kan strække sig over et bredt område. Som en daglig dosis til indgivelse skal der vælges en sådan, der er afpasset efter den ønskede virkning. Pr. patient indgives der fortrinsvis dagligt fra ca. 20 til ca. 1000 mg, fortrinsvis intravenøst. Der kan om nødvendigt også dagligt indgives doser, der ligger lavere eller højere, idet en maksimal mængde på 2000 mg kun bør overskrides kortvarigt.

De farmakologiske egenskaber af de her omhandlede forbindelser er bekræftet ved de i det følgende beskrevne farmakologiske forsøg, der er udført med de her omhandlede forbindelser og deres salte. De opnåede resultater fremgår af den følgende tabel III.

AFPRØVNINGSMETODER

Tyrosinkinase-inhiberingsforsøg

Afprøvningsmetode:

Udgangsmaterialet til tyrosinkinase-aktiviteten er rotte-tumorcellelinien RR 1022 (ATCC CCL47), der dyrkes i RPMI 1640-medium + 10% FCS. Denne cellelinie er transformeret med RSV (Rous-Sarkom-virus) og indeholder onkogenproduktet

$PP60^{v-src}$, der er i besiddelse af tyrosinkinase-aktivitet.

Cellerne dyrkes næsten til konfluens, vaskes med PBS (phosphat-bufret saltopløsning), afskrabes fra kulturkolben, vaskes to gange med hver gang 0,85%'s NaCl-opløsning og centrifugeres ved 200 x G.

Der tilsættes derefter 100 µl puffer (10% glycerol, 25 mM tris-HCl, pH = 7,4, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% Triton® X-100, et tensid fra firmaet Rohm & Haas, Philadelphia, USA, 2 mM PMSF (phenylmethyl-sulfonyl-fluorid), 100 kallikrein-inaktiverende enheder aprotinin pr. ml og 2 mM dithiotreitol) pr. 1 x 10^6 celler til lyse af cellerne. Efter 5 minutter ved 4°C centrifugeres lysatet i 10 minutter ved 10.000 x G, og den ovenstående væske anvendes som udgangsmateriale til tyrosinkinase-aktivitet.

Tyrosinkinase-aktiviteten af lysatet måles med poly (Glu, Tyr), 4:1, som substrat. Inhibitoren forinkuberes med cellelysat, substrat (2 mg/ml) og Mg^{2+} (10 mM) i 100 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsyre), pH = 7,2, og reaktionen begyndes ved tilsætning af γ-^{32}P-ATP (40 µM). Efter 15 minutter ved 30°C fældes substratet med 10% TCA (trichloreddikesyre), filtreres på en millititer--filtreringsplade (Millipore Corporation, Mass., USA), vaskes og tørres. Indbygningen af ^{32}P konstateres ved hjælp af en væskescintillationstæller.

Resultater:

Stofferne afprøves ved en maksimal koncentration på 45 µg/ml og fortyndes trinvis i forholdet 1:10. IC_{50} betegner den koncentration, ved hvilken 50% af udgangsenzymaktiviteten hæmmes, jfr. tabel III.

<u>Afprøvning af 3',5'-cAMP-afhængig proteinkinasehæmning</u>

<u>Forsøgsbeskrivelse</u>:

Den katalytiske underenhed af den cAMP-afhængige proteinkinase (Sigma) rekonstitueres som beskrevet af Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Enzymaktiviteten måles med Kemptid (Sigma) (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-

-Gly) som substrat. Inhibitoren forinkuberes med enzym, substrat (190 μM), Mg^{2+} (5 mM), 0,25 mg BSA pr. ml og 3,75 mM mercaptoethanol i 50 mM MOPS (4-morpholinpropansulfonsyre), pH = 6,9. Reaktionen begyndes ved tilsætning af γ-^{32}P ATP (40 μM). Efter 15 minutter ved 30°C anbringes en alikvot del på p81-ionbytterpapir (2 x 2 cm; Whatman Paper Ltd., Storbritannien), neddyppes i 75 mM H_3PO_4, vaskes og tørres, og indbygningen af ^{32}P måles ved hjælp af en væskescintillationstæller.

Resultater:

Resultaterne udtrykkes som procent hæmning af udgangsenzymaktiviteten ved en inhibitorkoncentration på 45 μg/ml, jfr. tabel III.

TABEL III

Formel Ic,

i hvilken $R_2 = R_8 = H$ og $R_4 = OH$

R_1	X	Fortegn for den optiske drejning	IC_{50} i µg/ml pp60 v-src	%-Hæmning af c-AMP-afhængig protein-kinase ved 45 µg/ml inhibitorkoncentration
2-Thiophenyl	-	(±)	1,7	14
2-Bromphenyl	-	(±)	22,3	63
(2-Chlorphenyl)-methyl	HCl	(±)	>45,0	69
Phenyl	HCl	(-)	5,7	46
2-Chlorphenyl	HCl	(+)	9,2	27
2-Fluorphenyl	HCl	(±)	28,0	0
4-Methylphenyl	HCl	(±)	2,7	55
3-Pyridyl	HCl	(±)	10,6	0
2-Pyridyl	HCl	(±)	34,8	0
Phenyl	HCl	(+)	0,7	13
4-Pyridyl	HCl	(±)	4,2	12
n-Propyl	HCl	(±)	45,0	0
2-Chlorphenyl	HCl	(±)	3,3	29
Ethyl	HCl	(±)	>45,0	0
Phenyl	HCl	(±)	1,9	48
4-Bromphenyl	HCl	(±)	3,4	65
4-Biphenyl	HCl	(±)	39,0	37
n-Butyl	HCl	(±)	0,0	ikke bestemt
2-Pyridyl	HCl	(-)	7,8	6
2-Naphthyl	HCl	(±)	3,4	0
4-Fluorphenyl	HCl	(±)	2,7	25
4-Chlorphenyl	HCl	(±)	1,6	37
n-Propyl	HCl	(-)	>45,0	5

Det følgende eksempel tjener til illustration af opfindelsen.

SRC-Tumorforsøg:

Enkeltcellesuspensioner (cellekultur A 549 eller isolerede humane Tumor Xenografts LXF 529) i vævsklæber (Beriplast®, Behringwerke AG) fortyndes i forholdet 1:2 med RPMI 1640-medium og suppleres med 15% FCS til en cellekoncentration på 10^7 celler pr. 50 µl. Denne suspension opsuges hurtiges i 50 µl-glaskapillarrør (diameter 1,5 mm), hvis indre vægge er fugtet med en thrombin/$CaCl_2$-opløsning (500 enheder thrombin i 1 ml 40 mmol $CaCl_2$).

Efter størkning af celle-fibrin-blandingen (ca. 5 minutter ved stuetemperatur) transporteres fibrinnetværket ved hjælp af lufttryk ud af glaskapillarrørene til en petriskål.

Fibrinnetværket udskæres i 2 mm store dele (ca. 5 x 10^5 celler pr. stk.), og delene opbevares indtil implantationen i RPMI 1640-medium, suppleret med 15% FCS.

Et enkelt fibrinstykke implanteres under nyrekapslen af en hårløs mus, og derefter måles to på hverandre vinkelrette diametre af det implanterede stykke ved hjælp af et mikroskop med okular-mikrometer (dag 0). Tumorstørrelsen måles ved hjælp af formlen

$$V = a \times b$$

hvor V betegner tumorstørrelsen,
a betegner den største diameter og
b betegner diameteren vinkelret på a.

Forsøgsforbindelsen indgives intravenøst eller peroralt dagligt på dagene nr. 2 - 15 i den maksimalt tålelige dosis (MVD) og en dosis, der andrager 2/3 af MVD-værdien ifølge for-forsøgene. Der anvendes 5 mus pr. gruppe.

Den 21. dag efter implantationen aflives dyrene, nyrerne udpræpareres, og tumorstørrelserne måles på ny. Virkningen af forsøgsforbindelsen bestemmes på basis af tumorvæksthæmningen.

Den relative tumorstørrelse bestemmes ved hjælp af den følgende formel:

$$V_R = \frac{V_t}{V_o}$$

i hvilken

V_t betegner tumorstørrelsen ved afslutningen af forsøget (dag 21), og

V_o betegner tumor-/fibrinstørrelsen på implantationsdagen.

Derefter relateres den gennemsnitlige relative tumorstørrelse for den behandlede gruppe (V_T) til den tilsvarende gennemsnitlige tumorstørrelse for kontrolgruppen (V_C) ifølge følgende formel:

$$T/C\ \% = \frac{V_T}{V_C} \times 100$$

Den statistiske signifikans ($p > 0,05$) for den antitumorale virkning bestemmes ved hjælp af Wilcoxon U-forsøgene.

Forsøgsresultaterne fremgår af den følgende tabel IV.

TABEL IV

Forsøgsforbindelse	Tumor	Dosis (mg/kg/dag)	Behandlingsvarighed (dage)	T/C (%)	
	bronchogent carcinom				
Eks. 17	LXF 529	25 i.v.	2-15	81	n.s.
		35 i.v.	2-15	67	
	A549	35 i.v.	2-15	70	
		100 p.o.	2-15	73	
Eks. 9	LXF 529	2 i.v.	2-15	59	
		4 i.v.	2-15	51	
Eks. 19	LXF 529	100 i.v.	2-15	98	n.s.
		150 i.v.	2-15	80	

n.s. = ikke signifikant ($p > 0,05$)

Eksempel 1

(+)-cis-5,7-Dimethoxy-2-(2-thienyl)-8-[4-(3-acetoxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on

Til en opløsning af 3,0 g (±)-cis-3-acetoxy-1-methyl--4-(3-acetyl-4,6-dimethoxy-2-hydroxy)-phenylperidin med formlen IV, i hvilken R betyder $COCH_3$, i 30 ml tør pyridin sættes der 2,73 g 2-thiophencarboxylsyre ved 0°C, og derefter 2,2 ml $POCl_3$. Reaktionsblandingen omrøres i 2 timer ved stuetemperatur. Der sættes langsomt 50 ml vand til reaktionsblandingen, og reaktionsopløsningen gøres senere alkalisk ved tilsætning af natriumcarbonatopløsning (pH = 8). Reaktionsblandingen ekstraheres med 3 x 40 ml eddikeester. De forenede organiske ekstrakter vaskes med vand, tørres med vandfrit natriumsulfat, og opløsningsmidlet fjernes under vakuum. Remanensen chromatograferes på silicagel (4% MeOH i $CHCl_3$), og der fås et udbytte på 2,7 g (±)-cis-3--acetoxy-1-methyl-4-(3-acetyl-4,6-dimethoxy-2-(2-thienyloxy)--phenyl)-piperidin med smp. 153-154°C.

Denne forbindelse optages i 50 ml tør dioxan, der tilsættes 5 ækvivalenter natriumhydrid, og blandingen omrøres i 4 timer ved 40°C. Der tilsættes 10 ml MeOH til sønderdeling af overskydende natriumhydrid, og der tilledes tør HCl-gas, indtil opløsningens pH-værdi tydeligt er sur. Reaktionsblandingen oparbejdes ved tilsætning af iskold natriumcarbonatopløsning, og det fremkomne faste produkt skilles fra ved filtrering. Den yderligere rensning gennemføres ved hjælp af søjlechromatografi (silicagel, 2% MeOH, 1% NH_4OH i $CHCl_3$), og der fås 2,50 g (±)-cis-5,7-dimethoxy-2-(2-thienyl)-8-[4--(3-acetoxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on med smp. 207-208°C.

Analogt med eksempel 1 fremstilles følgende forbindelser:

Eksempel 2

(+)-cis-5,7-dihydroxy-2-(phenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 3

(-)-cis-5,7-dihydroxy-2-phenyl-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 4

(+)-cis-5,7-dihydroxy-2-phenyl-8-[4-(3-hydroxy-1--methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 5

(-)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-pyridyl)-8-[4-(3-hydroxy--1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 6

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-pyridyl)-8-[4-(3-hydroxy--1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 7

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(3-pyridyl)-8-[4-(3-hydroxy--1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 8

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(4-pyridyl)-8-[4-(3-hydroxy--1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 9

(-)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-chlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 10

(+)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-chlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 11

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-chlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 12

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2,5-dichlorphenyl)-8-[4-(3--hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 13

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2,4-dichlorphenyl)-8-[4-(3--hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 14

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(4-methylphenyl)-8-[4-(3--hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 15

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(3-methylphenyl)-8-[4-(3--hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 16

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(4-aminophenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 17

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(3-bromphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 18

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-naphthyl)-8-[4-(3-hydroxy--1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid.

Eksempel 19

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-[4-(3--hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on.

Eksempel 20

(±)-cis-5,7-dihydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)-8-[4-(3--hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on.

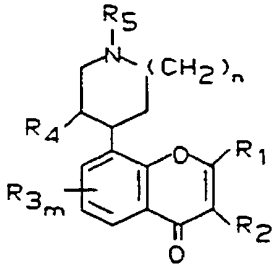
Eksempel 21

Opløsninger af virksomt stof, der er egnet til injektion, indeholder de i det følgende angivne bestanddele og kan fremstilles på i og for sig kendt måde, idet stofferne blandes med hinanden og fyldes på sterile ampuller. Injektionsopløsningerne tjener til antitumor-behandling i en dosis på 1-2 injektionsenheder (1 injektionsenhed = 1 ampul) pr. dag.

Bestanddele (pr. ampul)	Vægt
(±)-cis-5,7-dimethoxy-2-(2-thienyl)--8-[4-(3-acetoxy-1-methyl)-piperidinyl]--4H-1-benzopyran-4-on	200 mg
Natriumchlorid	50 mg
Methylparaben	5 mg
Sterilt vand	5 mg

PATENTKRAV.

1. Anvendelse af 4H-1-benzopyran-4-on-derivater med den almene formel



(I)

i hvilken

R_1 betyder hydrogen, alkyl med 1-6 carbonatomer, aryl-C_1--C_4-alkyl, med halogen, trifluormethyl, hydroxy eller carboxy substitueret C_1-C_6-alkyl, C_3-C_6-cycloalkyl, en C_3-C_9-heterocyclisk ring med 1, 2 eller 3 heteroatomer, f.eks. N, S, O eller deres vilkårlige kombinationer, C_3-C_6-cycloalkyl-C_1-C_4-alkyl, C_2-C_6-alkenyl, C_2-C_6-alkynyl,herunder polycycliske ringe, aromatiske heterocycliske grupper, eventuelt med halogen, C_1-C_4-alkyl, C_1-C_4-alkoxy, hydroxy, carboxy, COO-Alkyl, $CONH_2$, CONH-Alkyl, $CON(Alkyl)_2$, nitro, trifluormethyl, amino, C_1-C_4-alkylamino, di-C_1-C_4-alkylamino, aromatiske heterocykler såsom pyridylgrupper, og polycykliske aromatiske grupper, såsom naphthylgrupper, substitueret aryl, carboxyl eller en aldehyd- eller COO-C_1-C_4-alkylgruppe, en primær amino-, alkylamino-, aralkylamino-, dialkylamino-, amido-, arylamino-, diarylaminogruppe eller -CH_2O-C_1-C_4-alkyl;

R_2 betyder hydrogen eller C_1-C_3.alkyl;

R_3 er ens og betyder OH eller OCH_3;

R_4 betyder hydroxy;

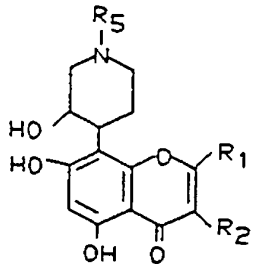
R_5 betyder CH_3;

m betyder tallet 2; og

n betyder tallet 1;

eller disse forbindelsers farmakologisk uskadelige syreadditionssalte, til fremstilling af et lægemiddel med en virkning mod tumorer.

2. Anvendelse af forbindelser ifølge krav 1 med den almene formel



(Ia)

i hvilken

R_1 betyder hydrogen eller C_1-C_3-alkyl, naphthyl, eventuelt med halogen, C_1-C_4-alkyl, C_1-C_4-alkoxy, hydroxy, carboxy, COO-Alkyl, $CONH_2$, CONH-Alkyl, $CON(Alkyl)_2$, nitro, trifluormethyl, amino, C_1-C_4-alkylamino, di-C_1-C_4-alkylamino, aromatiske heterocykler, såsom pyridylgrupper, og polycykliske aromatiske grupper, såsom naphthylgrupper, substitueret aryl eller en C_3-C_9-heterocyklisk gruppe;

R_2 betyder hydrogen eller C_1-C_3-alkyl; og

R_5 betyder CH_3;

eller deres farmakologisk uskadelige syreadditionssalte.

3. Anvendelse af forbindelser med formlen Ia ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at R_1 betyder phenyl, thienyl, pyridyl, chlorphenyl, dichlorphenyl, methylphenyl, aminophenyl, bromphenyl, hydroxyphenyl eller naphthyl, R_2 betyder hydrogen; og R_5 betyder methyl; eller disse forbindelsers farmakologisk uskadelige syreadditionssalte.