



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 272 085 A5

4(51) C 07 D 495/04

A 61 K 31/38

A 61 K 31/445

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 07 D / 312 923 4

(22) 15.02.88

(44) 27.09.89

(31) 8702025

(32) 17.02.87

(33) FR

8716516

27.11.87

(71) siehe (73)

(72) Badorc, Alain; Fréhel, Daniel, FR

(73) SANOFI, Paris, FR

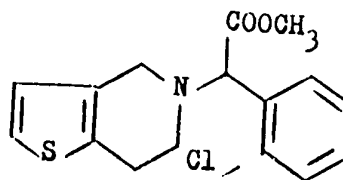
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung des rechtsdrehenden Isomeren von alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester

(55)

Alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester-Herstellung, Arzneimittel, Plättchenstörungen

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung des rechtsdrehenden Isomeren der Verbindung der Formel und seiner pharmazeutisch akzeptablen Salze, dadurch gekennzeichnet, daß man die racemische Verbindung durch eine optische aktive Säure in einem Lösungsmittel in ein Salz überführt, schrittweise Rekristallisationen des Salzes bis zum Erhalten eines Produktes mit konstantem Drehvermögen durchführt und anschließend das rechtsdrehende Isomer aus seinem Salz durch eine Base freisetzt. Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden als Arzneimittel zur Behandlung und Vorbeugung von Plättchenstörungen verwendet. Formel



Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung des rechtsdrehenden Isomeren von alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester und seiner pharmazeutisch akzeptablen Salze, dadurch gekennzeichnet, daß man den racemischen alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester durch eine optisch aktive Säure in einem Lösungsmittel in ein Salz überführt, schrittweise Rekristallisationen des Salzes bis zum Erhalten eines Produktes mit konstantem Drehvermögen durchführt, anschließend das rechtsdrehende Isomer aus seinem Salz durch eine Base freisetzt und gegebenenfalls die Salzbildung mit einer pharmazeutisch akzeptablen Säure durchführt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die optisch aktive Säure die linksdrehende 10-Camphorsulfonsäure ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Rekristallisationen in Aceton durchgeführt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Salzbildung in Aceton durchgeführt wird.

Verfahren zur Herstellung des rechtsdrehenden Isomeren von  $\alpha$ -(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester

#### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung des rechtsdrehenden Isomeren von  $\alpha$ -(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester, der in der Medizin als Arzneimittel verwendet wird.

#### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Im französischen Patent Nr. 82.12599 (Nr. der Veröffentlichung 25 30 247) wird die racemische Mischung der oben genannten Verbindungen beschrieben.

#### Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung des rechtsdrehenden Isomeren von  $\alpha$ -(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c) thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester bereitgestellt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen gegenüber dem Stand der Technik bereits bekannten Verbindungen einen besseren therapeutischen Effekt auf.

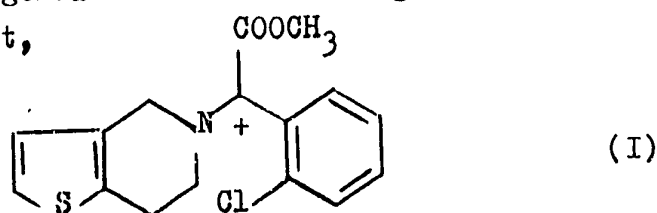
Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen hergestellte Arzneimittel werden aufgrund ihrer interessanten In-

hibitoreigenschaften hinsichtlich der Plättchenaggregation, die in den Mechanismus der Bildung von arteriellen und venösen Thrombosen eingreifen, vorteilhaft bei der Behandlung und Vorbeugung von Plättchenstörungen verabreicht, die durch extrakorporale Blutkreisläufe oder als Folge von Atherom-Komplikationen verursacht werden.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verbindungen mit verbesserter Plättchen-Antiaggregationswirkung sowie verbesserter antithrombotischer Wirkung zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß werden Verbindungen der folgenden Formel I hergestellt,



in der der Kohlenstoff ein asymmetrisches Kohlenstoffatom ist. Tatsächlich stellt diese Formel zudem das beanspruchte rechtsdrehende Molekül dar sowie sein linksdrehendes Enantiomer. Es wird nachstehend mit Id das erfindungsgemäß beanspruchte rechtsdrehende Enantiomer und mit I das linksdrehende Enantiomer bezeichnet.

Es ist bekannt, daß das Drehvermögen einer Verbindung von dem Lösungsmittel abhängig ist, in dem es gemessen wird und von seiner Konzentration in diesem Lösungsmittel. Das rechtsdrehende Isomer gemäß der Erfindung besitzt ein positives Drehvermögen in Lösung von Methanol.

Unerwarteterweise besitzt nur das rechtsdrehende Enantiomer Id

eine anti-Aggregations-Wirkung auf Blutplättchen, das linksdrehende Enantiomer I ist inaktiv. Außerdem ist das inaktive linksdrehende Enantiomer I das weniger gut tolerierte von den zwei Enantiomeren.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Additionssalze der Verbindungen der Formel (Id) mit pharmazeutisch akzeptablen Mineralsäuren oder organischen Säuren.

Die Verbindung der Formel (Id) ist ein Öl, während sich ihr Hydrochlorid in Form eines weißen Pulvers präsentiert. Die öligen Produkte sind im allgemeinen schwer zu reinigen und man bevorzugt natürlich für die Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen kristalline Produkte, die im allgemeinen durch Rekristallisation gereinigt werden.

Man hat jedoch im vorliegenden Fall festgestellt, daß einige Salze der Verbindung der Formel (Id) im allgemeinen in amorpher Form ausfallen und/oder daß sie hygroskopisch sind, was ihre Handhabung im industriellen Maßstab erschwert. Man hat also die Salze der in der Pharmazie klassischen Carbon- und Sulfonsäuren hergestellt, wie die von Essigsäure, Benzoesäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Citronensäure, Weinsäure, Gentisinsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Benzensulfonsäure und Laurylsulfonsäure, sowie das Salz der Dobesinsäure (Fp = 70 °C) und das der para-Toluensulfonsäure (Fp = 51 °C), dessen Reinigung sich als besonders heikel erweist.

Man hat unter den Salzen der organischen Säuren und der Mineralsäuren mit dem rechtsdrehenden Isomer der Verbindung der Formel Id Salze gefunden, die einfach kristallisieren sowie nicht hygroskopisch und ausreichend wasserlöslich sind, damit ihre Verwendung als Wirkstoffe in Medikamenten besonders vorteilhaft ist.

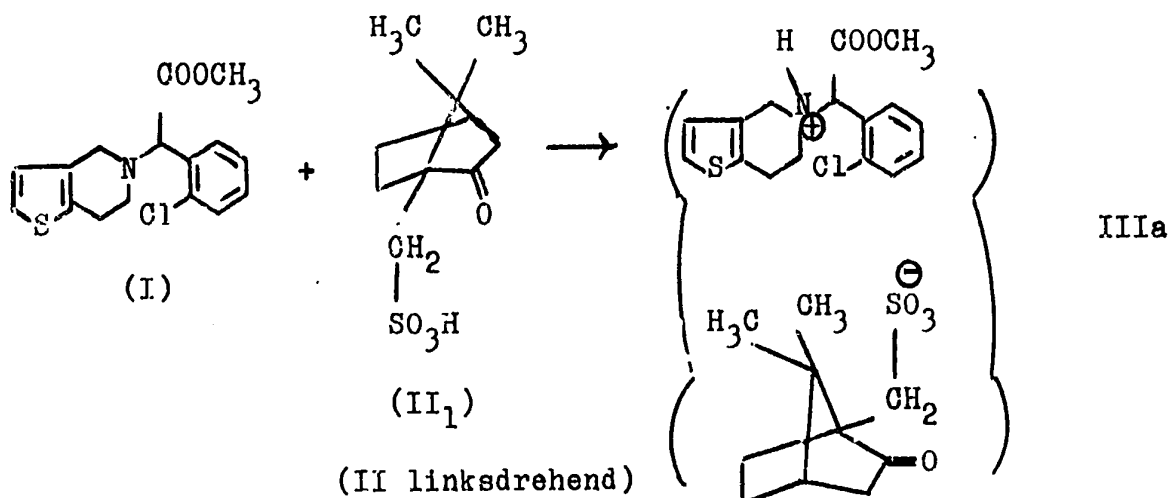
Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere das Hydrogensulfat, das Taurocholat und das Hydrobromid des rechtsdrehenden Enantiomers des alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäuremethylesters.

Diese Salze werden in klassischer Art und Weise hergestellt, durch Einwirkung der entsprechenden Säure auf die Base in Lösung eines Lösungsmittels, in dem sie spontan ausfallen oder nach Zugabe eines Lösungsmittels, in dem sich das Salz nicht löst.

Das rechtsdrehende Isomer von alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(2,3 -o)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäuremethylester kann durch Salzbildung aus der racemischen Verbindung mittels einer optisch aktiven Säure in einem Lösungsmittel, schrittweise Rekristallisationen des Salzes bis zum Erhalten eines Produktes mit konstantem Drehvermögen und anschließende Freisetzung des rechtsdrehenden Isomeren aus seinem Salz durch eine Base hergestellt werden, wobei das rechtsdrehende Isomer gegebenenfalls mit einer pharmazeutisch akzeptablen Säure in ein Salz umgewandelt wird.

Die optisch aktive Säure kann vorteilhafterweise die linksdrehende 10-Camphosulfonsäure sein. Man kann für die Salzbildung und die Rekristallisation ein einziges Lösungsmittel verwenden, in diesem Fall eignet sich Aceton am besten.

Die linksdrehende chirale 10-Camphosulfonsäure der Formel (II<sub>1</sub>) wird in einem inerten Lösungsmittel mit der racemischen Mischung der Formel (I) gemäß dem folgenden Reaktionsschema zur Reaktion gebracht:

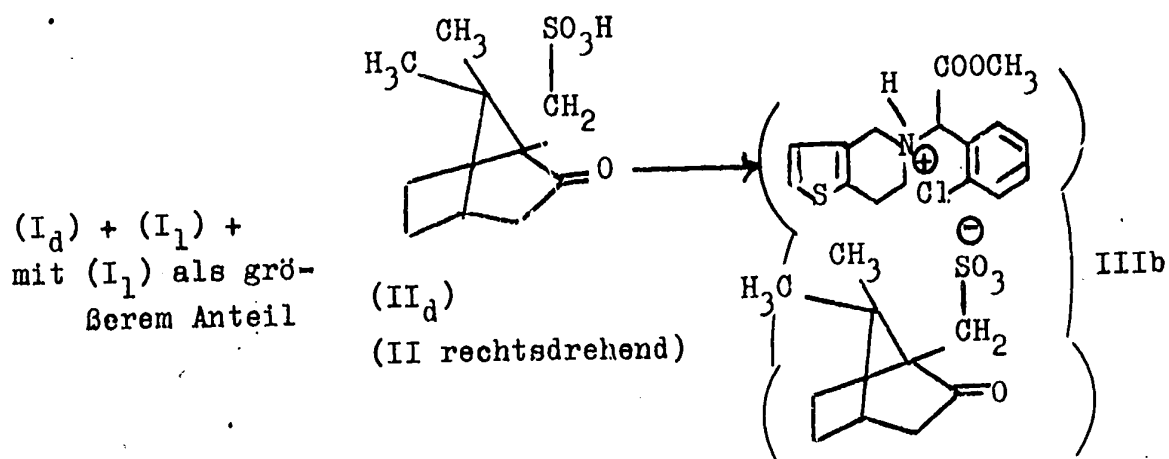


Die Salzbildung kann in Lösungsmitteln wie den Alkoholen, den Ketonen und Dimethylformamid durchgeführt werden. Das Salz fällt spontan aus oder wird durch Aussalzen oder Verdampfen des Lösungsmittels isoliert. Es bildet sich eine Mischung der zwei Diastereoisomeren der Formel (IIIa). Durch schrittweise Rekristallisation<sup>ny</sup> in einem Lösungsmittel wie Aceton wird der Niederschlag mit dem rechtsdrehenden Isomer der Verbindung (I) angereichert. Nach jeder Rekristallisation wird das Drehvermögen  $[\alpha]_D^{20}$  des Niederschlags bei einer Temperatur von 20 °C in Methanol und bei einer Konzentration zwischen 1,5 und 2 g/ 100 ml gemessen. Sobald sich der Wert  $[\alpha]_D^{20}$  nicht mehr verändert, setzt man die Base der Formel (Id) aus dem Salz (IIIa) durch Einwirkung einer Base wie Natriumhydrogencarbonat oder Kaliumhydrogencarbonat im wäßrigen Medium bei Temperaturen zwischen 5 °C und 20 °C frei.

Das Eindampfen des Filtrates der ersten Rekristallisationsstufe IV nach der Filtration der Kristalle des ausgefallenen Salzes (IIIa) ergibt eine Mischung, die mit dem Salz des Enantiomeren (I<sub>1</sub>) angereichert ist. Die alkalische Behandlung dieser Mischung der diastereoisomeren Salze mit einer schwachen Base wie Natrium- oder Kaliumhydrogen-

carbonat in wäßriger Lösung bei Temperaturen zwischen 5 °C und 20 °C führt zu einer Mischung der zwei Enantiomeren ( $I_d$ ) + ( $I_l$ ), angereichert mit dem linksdrehenden Enantiomeren ( $I_l$ ).

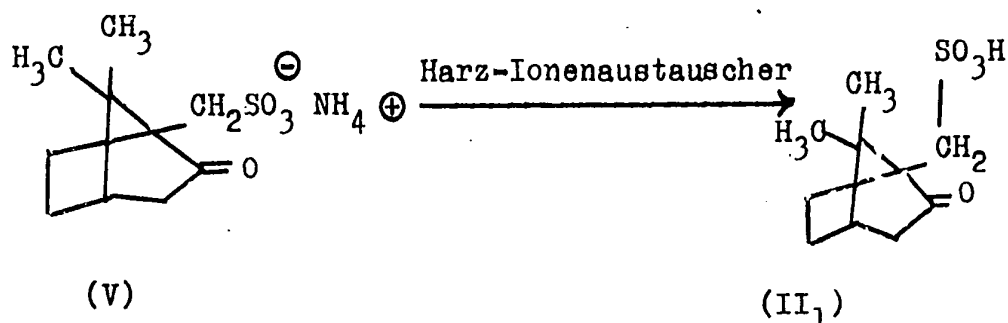
Man setzt diese Mischung ( $I_d$ ) + ( $I_l$ ), die an dem Enantiomeren ( $I_l$ ) angereichert ist, mit der rechtsdrehenden 10-Camphosulfonsäure, bezeichnet als ( $II_d$ ), in einem Lösungsmittel um, gemäß dem folgenden Reaktionsschema:



Die Mischung der erhaltenen kristallinen diastereoisomeren Salze ( $III_b$ ) wird in Aceton so lange rekristallisiert, bis das Drehvermögen  $[\alpha]_D^{20}$  des Niederschlages konstant ist. Man bestimmt wie zuvor das Drehvermögen von  $[\alpha]_D^{20}$  des diastereoisomeren Salzes ( $III_b$ ) nach jeder Rekristallisation.

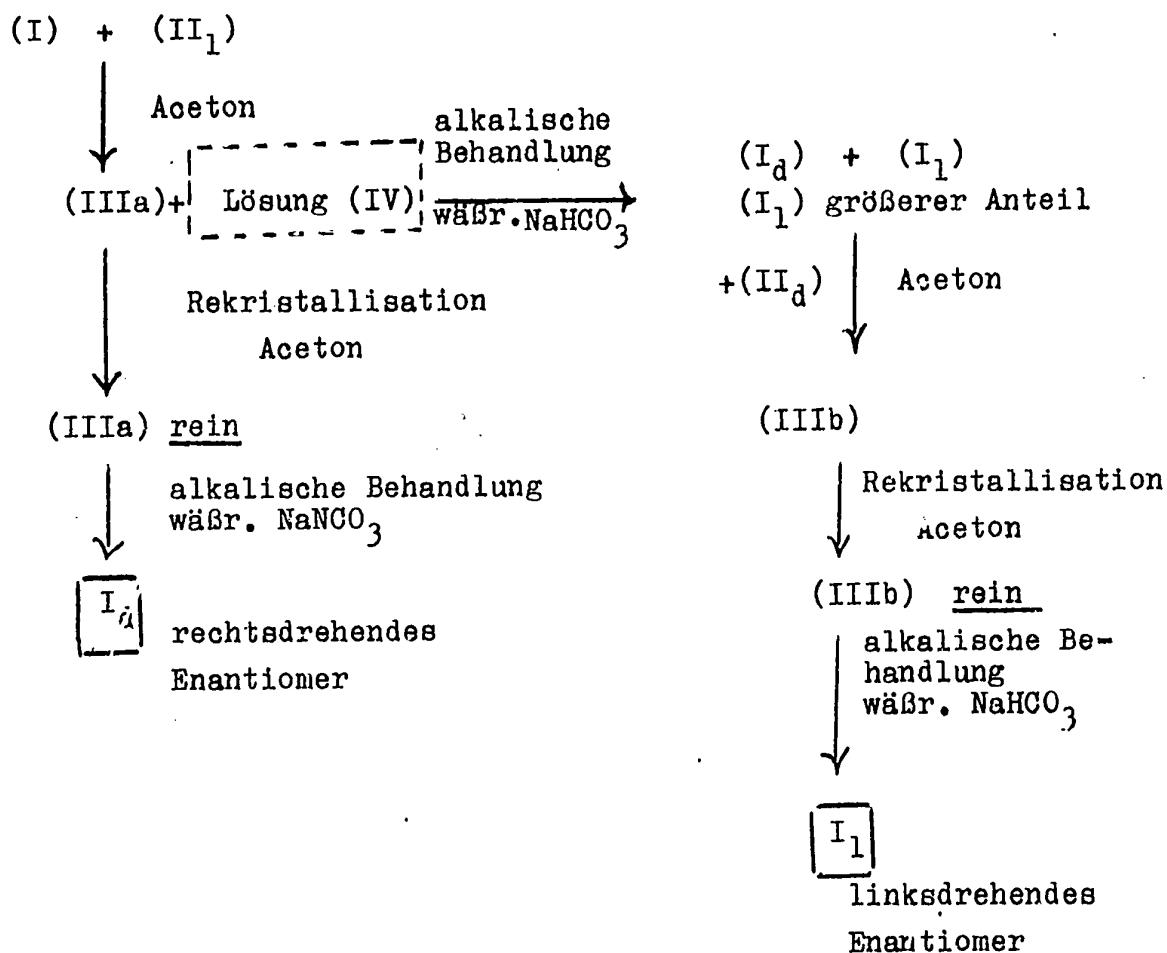
Die Freisetzung des Stereoisomeren ( $I_l$ ) aus seinem Salz wird in klassischer Art und Weise wie bei der Verbindung ( $Id$ ) durchgeführt.

Die linksdrehende 10-Camphosulfonsäure ( $II_l$ ) kann aus dem handelsüblichen Ammonium-10-camphosulfonat der Formel (V) gemäß dem folgenden Reaktionsschema erhalten werden:



Man chromatographiert eine wäßrige Lösung des Ammoniumsalzes (V) über ein Harz Amberlite IRN-77. Nach der Lyophilisierung des Eluates gewinnt man die 10-Camphosulfonsäure der Formel (II<sub>1</sub>).

Die Gesamtheit des Verfahrens ist unten schematisiert:



Jedes der reinen Enantiomeren ( $I_d$ ) und ( $I_l$ ) kann nach klassischen Methoden in ein Salz überführt werden; beispielsweise werden die Hydrochloride durch Zugabe einer Lösung von Chlorwasserstoffgas in Diethylether zu einer Lösung von ( $I_d$  oder  $I_l$ ) in Diethylether hergestellt.

Die Bestimmung der Enantiomeren-Reinheit vom rechtsdrehenden Enantiomer ( $I_d$ ) und vom linksdrehenden Enantiomer ( $I_l$ ) erfolgt nach folgenden Methoden:

- NMR-Spektroskopie des Protons mit Adjunktion einer chiralen Seltenen Erde,
- Flüssig-Hochdruckchromatographie unter Verwendung einer chiralen stationären Phase.

a) NMR-Spektroskopie des Protons mit Adjunktion einer chiralen Seltenen Erde

Die Enantiomeren-Reinheit (optische Reinheit) wurde durch NMR-Spektroskopie  $^1\text{H}$  60 MHz in Anwesenheit des chiralen Komplexes einer Seltenen Erde bestimmt, gemäß der von G.M. WHITESIDES et al. (J. Am. Chem. Soc. 1974, 96, 1038) beschriebenen Methode.

Bei dem racemischen Produkt (I) erscheint der sich an dem Asymmetriezentrum, in  $\alpha$ -Stellung zur Esterfunktion, befindende Wasserstoff als Singulett (chemische Verschiebung  $\delta = 4.87$  ppm, in  $\text{CDCl}_3$  als Lösungsmittel). Die Adjunktion des Komplexes der Seltenen Erde  $\text{Eu}(\text{tfc})_3$  [tris-(trifluormethyl-3-hydroxymethylen)-Europium-d-camphorat (III)] in die Sonde, die die Lösung des Racemats (I) in  $\text{CDCl}_3$  enthält, führt zur Spaltung des Ausgangs-Singuletts in zwei gut voneinander getrennte Singuletts, die dem Proton von jedem der zwei Enantiomeren ( $I_d$ ) und ( $I_l$ ) entsprechen. Bei einem molaren Verhältnis Komplex Seltene Erde/

Verbindung (I) = 0,4 beträgt die Trennung zwischen den zwei Singulettts 6 Hz.

Mit jedem der zwei hergestellten Enantiomeren ( $I_d$ ) und ( $I_l$ ) wurde die gleiche Prozedur wie für das Racemat (I) durchgeführt. Die geringste chemische Verschiebung entspricht dem Proton des rechtsdrehenden Enantiomers ( $I_d$ ) und die höchste Verschiebung dem des linksdrehenden Enantiomers ( $I_l$ ).

Die Genauigkeit der Methode wurde im Vergleich mit den Spektren NMR<sup>1</sup>H (60 MHz) bestimmt, die mit oder ohne Adjunktion des Komplexes der Seltenen Erde erhalten wurden, und zwar für jedes der zwei Enantiomere ( $I_d$ ) und ( $I_l$ ) in reiner Form oder in Mischung mit ansteigenden Mengen des anderen Enantiomers. Es wurde festgestellt, daß es möglich ist, mehr als 5 Gew.% des einen Enantiomers in Mischung mit den anderen zu bestimmen.

#### b) Flüssig-Hochdruckchromatographie unter Verwendung einer chiralen stationären Phase

Der Versuch wurde mit einer Flüssigchromatographie HP-1084 unter Verwendung eines UV-Detektors bei 215 nm durchgeführt. Die chirale stationäre Phase war Kieselerde DEAE (10 Mikrometer), gepfropft mit einer 1-Alpha-glycoproteinsäure (0,4 x 100 mm) (ENANTIOPAC R-LKB). Die mobile Phase bestand aus einer Mischung wäßriger Phosphat-Puffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8 mM), die 0,1 M NaCl und 15 % Isopropanol (v/v) enthielt und auf einem pH-Wert von 7,4 eingestellt war. Der Durchsatz wurde auf 0,3 ml/Minute festgelegt und die Temperatur der Kolonne auf 18 °C bis 20 °C gehalten.

Unter diesen Bedingungen hat das rechtsdrehende Enantiomere ( $I_d$ ) eine Retentionszeit von 45 Minuten und das linksdrehende ( $I_l$ ) eine solche von 35 Minuten.

Die Genauigkeit der Bestimmung der optischen Reinheit der zwei Enantiomeren wurde mittels Chromatographie von jedem der zwei hergestellten Enantiomeren ( $I_d$ ) und ( $I_l$ ) eingeschätzt, sowohl allein, als auch in Mischung mit ansteigenden Mengen des anderen Enantiomeren. Es wurde dabei festgestellt, daß es möglich war einfach zu bestimmen:

- 2 % (Gewicht/Gewicht) des Enantiomeren ( $I_d$ ) im Enantiomeren ( $I_l$ ),
- 4 % (Gewicht/Gewicht) des Enantiomeren ( $I_l$ ) im Enantiomeren ( $I_d$ ).

Unter diesen Bedingungen kann man den Schluß ziehen, daß die optische Reinheit der zwei gemäß den Beispielen erhaltenen Enantiomeren ( $I_d$ ) und ( $I_l$ ) mindestens 96 % für das rechtsdrehende Enantiomer ( $I_d$ ) und mindestens 98 % für das linksdrehende Enantiomer ( $I_l$ ) beträgt.

#### Ausführungsbeispiel

Die folgenden nicht einschränkenden Beispiele werden zur Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung gegeben.

#### Beispiel 1

Salze des rechtsdrehenden alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylesters

##### a) linksdrehende 10-Camphosulfonsäure

Man präpariert eine Kolonne mit Amberlite-Harz IRN-77, die man mittels Durchleiten von 1N-Salzsäure behandelt, und wäscht dann diese Kolonne sauren Harzes mit reichlich Wasser. Man löst das linksdrehende Ammonium-10-camphosulfonat in wenig Wasser und gibt es über die zuvor präparierte Harzkolonne. Dann eluiert man mit Wasser. Die die Säure enthaltenden Elutionsfraktionen werden lyophilisiert.

Weiß Kristalle,  $F_p = 198^\circ C$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -20,53$   
( $C = 2,075$  g/100 ml Wasser)

##### b) Salz der $\ell$ -10-Camphosulfonsäure vom alpha-(4,5,6,7-Tetra-

hydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester (SR 25990 B)

Man löst 32 g (0,0994 Mol) racemischen alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylester in 150 ml Aceton. Dann setzt man 9,95 (0,0397 Mol) linksdrehende 10-Camphosulfonsäure-monohydrat hinzu. Die homogene Mischung wird anschließend stehen gelassen bei Umgebungstemperatur. Nach 48 Stunden erscheinen einige Kristalle. Man konzentriert die Reaktionsmischung auf 50 ml und läßt sie abermals 24 Stunden lang bei Umgebungstemperatur stehen. Die erhaltenen Kristalle werden filtriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet (Ausbeute = 55 % in bezug auf das racemische Ausgangspr-odukt).

Weiße Kristalle,  $F_p = 165^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} = + 24,67$   
(C = 1,58 g/100 ml; Methanol)

Die zuvor erhaltenen Kristalle werden wieder in wenig siedendem Aceton gelöst (50 ml). Die nach Abkühlung erhaltenen Kristalle werden filtriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet (Ausbeute: 88 %).

Weiße Kristalle,  $F_p = 165^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} = + 24,75$   
(C = 1,68 g/100 ml; Methanol)

c) rechtsdrehender alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester

Man löst 12 g (0,022 Mol) des in b) erhaltenen reinen Produkts in wenig Wasser. Man kühlt auf eine Temperatur von  $5^\circ\text{C}$  und stellt die erhaltene wäßrige Lösung mit einer gesättigten wäßrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung alkalisch ein. Dann extrahiert man die erhaltene alkalische wäßrige Phase mit Dichlormethan. Die organischen Extrakte werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Eindampfen

des Lösungsmittels hinterläßt ein farbloses Öl (quantitative Ausbeute). Öl,  $[\alpha]_D^{20} = + 51,52$ , ( $c = 1,61$  g/100 ml; Methanol)

d) alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlor-phenyl)-essigsäure-methylester-Hydrochlorid (rechtsdrehend) (SR 25990 A)

Man löst 7 g (0,0228 Mol) alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylester (rechtsdrehend) in 100 ml Diethylether. Dann gibt man 30 ml N-HCl in Diethylether hinzu und filtriert die erhaltenen Kristalle ab. Die Kristalle werden mit Diethylether gewaschen und getrocknet (Ausbeute: 94 %)

weiße Kristalle,  $F_p = 117^\circ\text{C}$   $[\alpha]_D^{20} = + 62,23$  ( $c = 1,82$  g/100 ml; Methanol)

e) alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylester-Hydrogensulfat (rechtsdrehend) (SR 25990 C)

Man gibt 800 ml einer gesättigten wäßrigen Natriumbicarbonat-Lösung zu einer Suspension von 200 g SR 25990 B in 800 ml Dichlormethan. Nach Rühren werden die organische Phase dekantiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in 500 ml eisgekühltem Aceton gelöst und man gibt tropfenweise 20,7 ml konzentrierte Schwefelsäure (93,64 %;  $d = 1,83$ ) hinzu. Der entstandene Niederschlag wird dann mittels Filtration isoliert, mit 1000 ml Aceton gewaschen und anschließend im Vakuumtrockenschrank bei einer Temperatur von  $50^\circ\text{C}$  getrocknet.

Man erhält auf diese Weise 139 g weiße Kristalle, analytisch rein vom Schmelzpunkt  $184^\circ\text{C}$ .

Rohformel:  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNO}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$   $[\alpha]_D^{20} = + 55,10$  ( $c = 1,891$  g/100 ml; Methanol)

f) alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylester-Hydrobromid (rechtsdrehend) (SR 25990 D)

Man gibt 150 ml einer wäßrigen Natriumbicarbonatlösung zu einer Suspension von 20 g SR 25990 B in 200 ml Dichlormethan. Der nach Abtrennung der organischen Phase, Trocknung und Verdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand wird in 150 ml Diethylether oder Diisopropylether gelöst, und man gibt tropfenweise 4,4 ml einer 48%igen (Gew./Vol.) wäßrigen Bromwasserstoffsäure-Lösung hinzu. Der gebildete Niederschlag wird isoliert. Nach Trocknung erhält man 14,4 g Kristalle vom Schmelzpunkt 111 °C (Ausbeute 99 %).

13,4 g dieser Kristalle werden in einer Mischung von Isopropylether (100 ml) und Isopropanol (150 ml) rekristallisiert, um 10,2 g des analytisch reinen Hydrobromids zu ergeben: Fp 140 °C, Rohformel  $C_{16}H_{16}ClNO_2S$ ,  $HBr \text{ } [\alpha]_D^{20} = + 59,23$  (C = 2,09 g/100 ml; Methanol)

g) alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylester-Taurocholat (rechtsdrehend) (SR 25990 E)

Man chromatographiert über das Harz Amberlite IRN 77 das Natriumsalz der Taurocholsäure, indem man mit Wasser eluiert. Die erhaltenen Fraktionen werden lyophilisiert.

Man stellt 3 g (0,0054 Mol) SR 25990 B mit 200 ml einer gesättigten, wäßrigen Natriumbicarbonat-Lösung alkalisch ein und extrahiert mit Dichlormethan. Die organische Phase wird dekantiert, über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingedampft. Die erhaltene Base wird in 30 ml Isopropanol aufgenommen, und man gibt zu dieser Lösung 2,8 g (0,0054 Mol) Taurocholsäure, gelöst in 100 ml Isopropanol. Man beläßt die Mischung unter Rühren eine Nacht lang bei Umgebungstem-

peratur und dampft dann bis zur Trockne ein. Der Rückstand wird in Ether verfestigt. Man erhält 3,5 g beigefarbene Kristalle,  $F_p = 120^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} = +39,53$  ( $C = 1,791\text{ g/100 ml}$ ; Methanol)  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNO}_2\text{S}$ ,  $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_7\text{S}$ ; Analyse C,H,N übereinstimmend.

## Beispiel 2

Salze des linksdrehenden alpha-(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylesters

### a) Salz der d-10-Camphosulfonsäure (SR 25989 B)

Man verdampft das Lösungsmittel der in Beispiel 1b) erhaltenen acetonischen Lösung nach Abtrennung von SR 25990 B.

Dann nimmt man den Rückstand in Wasser und Diethylether auf. Die etherische Phase wird dekantiert. Die wäßrige Phase wird auf eine Temperatur von  $5^\circ\text{C}$  abgekühlt und mit einer gesättigten, wäßrigen Natriumbicarbonat-Lösung alkalisch eingestellt. Man extrahiert die alkalische wäßrige Phase mit Diethylether. Die etherischen Extrakte werden vereinigt und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

Das Eindampfen hinterläßt ein Öl, das man mittels Filtration über ein Kieselerde-Bett reinigt (Eluent: Diethylether).

Man gewinnt einfarbloses Öl, zusammengesetzt aus einer Mischung von etwa 65 % des linksdrehenden Enantiomeren und 35 % des rechtsdrehenden Enantiomeren, wobei diese Verhältnisse durch NMR-Spektroskopie  $^1\text{H}$  (60 MHz) mit Adjunktion des Komplexes einer chiralen Seltenen Erde bestimmt wurden.

Man löst 16,66 g (0,0517 Mol) der auf diese Weise erhaltenen Mischung in 70 ml Aceton. Dazu gibt man dann 7,77 g (0,0310 Mol) rechtsdrehende 10-Camphosulfonsäure-Monohydrat. Die homogene Mischung wird über Nacht bei Umgebungstemperatur stehen ge-

lassen. Die erhaltenen Kristalle werden filtriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet (Ausbeute = 44 % in bezug auf die Mischung). Die erhaltenen Kristalle werden in wenig Aceton (60 ml) unter Rückfluß gelöst. Der nach Abkühlung auf Umgebungstemperatur erhaltene Niederschlag wird filtriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Weiße Kristalle,  $F_p = 167^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -24,85$ , ( $C = 1,79$  g/100 ml; Methanol).

b)  $\alpha$ -(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylester (linksdrehend)

Man löst 11,3 g (0,0204 Mol) des in a) erhaltenen 10-Camphosulfonats in wenig Wasser. Man kühlt auf eine Temperatur von  $5^\circ\text{C}$  und stellt die erhaltene wäßrige Lösung mit einer gesättigten wäßrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung alkalisch ein. Man extrahiert die alkalische wäßrige Phase mit Dichlormethan. Die organische Lösung wird getrocknet und das Lösungsmittel verdampft. Man isoliert ein farbloses Öl (Ausbeute quantitativ).

Öl  $[\alpha]_D^{20} = -50,74$  ( $C = 1,58$  g/100 ml; Methanol)

c)  $\alpha$ -(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylester-Hydrochlorid (linksdrehend) (SR 25989 A)

Hergestellt gemäß der in Beispiel 1d) beschriebenen Verfahrensweise, Ausbeute : 94 %

weiße Kristalle,  $F_p = 117^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -62,56$  ( $C = 1,80$  g/100 ml; Methanol)

d)  $\alpha$ -(4,5,6,7-Tetrahydro-(3,2-c)-thieno-5-pyridyl)-(2-chlorphenyl)-essigsäure-methylester (linksdrehend) (SR 25989 C)

Man stellt 70 g (0,126 Mol) des wie oben in a) erhaltenen Camphonates SR 25 989 B mit einer gesättigten wäßrigen Natriumbicarbonat-Lösung alkalisch ein, und zwar in Anwe-

senheit von Dichlormethan. Die organische Phase wird dekantiert, über Sulfat getrocknet und bis zur Trockne eingedampft.

Zu dem in 300 ml Aceton aufgenommenen Rückstand gibt man tropfenweise 7,2 ml (0,126 Mol) konzentrierte Schwefelsäure. Nach Rühren filtriert man die gebildeten Kristalle ab und wäscht sie mit Aceton.

Man erhält 47,8 g weiße Kristalle.

Fp = 182 °C  $[\alpha]_D^{20} = -51,61$  (C = 2,044 g / 100 ml; Methanol)

Analyse (C, H, N) Übereinstimmend.

#### Pharmakologische Untersuchung

Die Antiaggregations-Aktivität und die Toxizität der neuen Verbindungen wurden mit denjenigen der racemischen Mischung verglichen, beschrieben in dem französischen Patent Nr. 82.12599 (Nr. der Veröffentlichung 25 30 247).

Im folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchung beschrieben sowie andere offensichtliche Vorteile der Erfindung, nämlich daß die Salze des rechtsdrehenden Isomers einen besseren therapeutischen Index besitzen als das Salz der racemischen Mischung. Tatsächlich weist das linksdrehende Isomer praktisch keine Plättchen-Antiaggregationswirkung auf und seine Toxizität liegt deutlich höher als die seines rechtsdrehenden Homogen. Die Plättchen-Antiaggregationswirkung und die antithrombotische Wirkung der Verbindungen wurden an der Ratte mittels klassischer Methoden untersucht. Man bestimmte, ex-vivo, die Wirkung auf die durch ADP oder Kollagen induzierte Plättchenaggregation.

Die Produkte in ethanolischer Lösung (200 mg/ml), verdünnt mit Wasser, das Gummi arabicum enthält (5 %, Gew./Vol.), wurden auf oralem Weg an Gruppen von 5 weiblichen Ratten des Stammes CD-COBS mit einem Gewicht von jeweils 250 - 300 g verabreicht, und zwar in einem Verhältnis von 10 ml Suspension pro Kilogramm und zwei Stunden vor der Blutentnahme.

Die Entnahmen in Natriumcitrat in wäßriger Lösung (3,8 %; 1 Vol./9 Vol. Blut) wurden bei durch Diethylether anästhesierten Tieren mittels Punktion der abdominalen Aorta durchgeführt. Das an Plättchen reiche Plasma wurde anschließend mittels Zentrifugieren zu 200 g während 10 Minuten isoliert.

Die Aggregation wird durch Zugabe von 2  $\mu$ l Aggregationslösung zu 400  $\mu$ l an Plättchen reichem Plasma induziert. Die verwendeten Aggregationslösungen waren: eine wäßrige Lösung von handelsüblichem ADP (Boehringer Mannheim) in Konzentration von 500  $\mu$ M (Endkonzentration 2,5  $\mu$ M) und eine Lösung von handelsüblichem Kollagen (Sigma, Typ I) zu 0,25 g/100 ml in 3%iger Essigsäure (Vol./Vol.) (Endkonzentration 12,5  $\mu$ g/ml).

Die Plättchenaggregation wurde verfolgt gemäß der von G.V.R. Born in Nature 194, S. 927 (1967) beschriebenen Methode mit einem Aggregometer Coultronics® bei einer Temperatur von 37 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 900 Umdrehungen min<sup>-1</sup>.

Bei der ADP-Aggregation liefert das Aggregometer eine Kurve, die die Plättchenaggregation darstellt, gemessen durch die Veränderung der optischen Dichte. Die Höhe dieser Kurve wird als Höhe der Aggregation definiert. Der Prozentsatz der Aggregation ist das Verhältnis zwischen der gemessenen Höhe der Aggregation und der Höhe, die 100 % Aggregation x 100 entspricht. Der Prozentsatz der Inhibierung wird bestimmt durch das Verhältnis:

$$\frac{\text{Höhe der Kontroll-Aggregation} - \text{Höhe der produzierten Aggregation}}{\text{Höhe der Kontroll-Aggregation}} \times 100$$

Die bei der ADP-Aggregation für das Hydrochlorid der racemischen Mischung (PCR 4099), für die Hydrogensulfate des rechtsdrehenden Isomers (SR 25990 G) und des linksdrehenden Isomers

(SR 25989 C) einerseits, das PCR 4099 und die Hydrochloride<sup>d</sup> des rechtsdrehenden Isomers (SR 25990 A) und des linksdrehenden Isomers (SR 25989 A) andererseits erhaltenen Resultate sind in der Tabelle I aufgeführt. Sie zeigen, daß das linksdrehende Isomer inaktiv ist und daß das rechtsdrehende Isomer mindestens so aktiv ist wie das Racemat.

TABELLE I

| Produkt          | Dosis<br>mg/kg<br>p.o. | Menge der<br>verabreich-<br>ten Base | % Aggre-<br>gation | % Inhi-<br>bierung | P <sup>KK</sup> |
|------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| Kontrolle        |                        |                                      | 42,4 +/-1,5        |                    |                 |
| PCR 4099         | 4,48                   | 3,84                                 | 29,8 +/-2,4        | 30                 | 0,01            |
| (race-<br>misch) | 8,97                   | 7,69                                 | 17,2 +/-2,2        | 59                 | 0,001           |
|                  | 17,9                   | 15,38                                | 11,1 +/-2,3        | 74                 | 0,001           |
| SR 25989C        | 20                     | 15,38                                | 41,0 +/-1,5        | 3                  | n.s.            |
|                  | 40                     | 30,76                                | 37,1 +/-1,7        | 13                 | n.s.            |
| SR 25990C        | 1,25                   | 0,96                                 | 39,4 +/-1,3        | 7                  | n.s.            |
|                  | 2,5                    | 1,92                                 | 28,4 +/-2,3        | 33                 | 0,01            |
|                  | 5                      | 3,84                                 | 14,0 +/-1,6        | 67                 | 0,001           |
|                  | 10                     | 7,69                                 | 8,5 +/-1,6         | 80                 | 0,001           |

|           |    |      |             |    |       |
|-----------|----|------|-------------|----|-------|
| Kontrolle |    |      | 33,8 +/-2,3 |    |       |
| SR 25990E | 10 | 3,84 | 9,6 +/-3    | 72 | 0,001 |
|           | 20 | 7,69 | 4 +/-1,6    | 88 | 0,001 |

| Höhe <sup>KKK</sup><br>der Aggregation |      |       |          |    |       |
|----------------------------------------|------|-------|----------|----|-------|
| Kontrolle                              |      |       | 103 +/-5 |    |       |
| PCR 4099                               | 2,5  | 2,14  | 86 +/-5  | 17 | 0,05  |
| (race-<br>misch)                       | 5    | 4,28  | 72 +/-8  | 30 | 0,05  |
|                                        | 12,5 | 10,71 | 32 +/-9  | 69 | 0,001 |
| SR 25989A                              | 25   | 22,46 | 101 +/-1 | 2  | n.s.  |
| SR 25990A                              | 2,5  | 2,25  | 67 +/-7  | 35 | 0,01  |
|                                        | 5    | 4,49  | 26 +/-5  | 75 | 0,001 |
|                                        | 12,5 | 11,23 | 19 +/-4  | 82 | 0,001 |
|                                        | 25   | 22,46 | 11 +/-1  | 89 | 0,001 |

<sup>K</sup> Mittel der Ergebnisse +/- mittlere Standardabweichung (ESM)

<sup>KK</sup> Test von Student

<sup>KKK</sup> Höhe der Aggregation in mm: Mittel +/- ESM (n=5)

n.s. nicht signifikant

Bei der Kollagen-Aggregation ist der Prozentsatz der Inhibierung die Differenz der Kurven, die die Veränderung der optischen Dichte darstellen, in Abhängigkeit von der Zeit für die Kontrolle und das zu testende Produkt, dividiert durch die Neigung für die Kontrolle und multipliziert mit 100. Die in der Tabelle II aufgeführten Resultate zeigen auch, daß nur das rechtsdrehende Isomer aktiv ist, während die Salze vergleichbare Aktivitäten besitzen.

TABELLE II

| Produkt                      | Dosis<br>mg/kg<br>p.o. | Menge der<br>verabreich-<br>ten Base | Neigung                                                      | % Ini-<br>bierung    | P <sup>xx</sup>                 |
|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| Kontrolle                    |                        |                                      | 4,8 +/-0,3                                                   |                      |                                 |
| PCR 4099<br>(race-<br>misch) | 4,48<br>8,97<br>17,9   | 3,84<br>7,69<br>15,38                | 3,6 +/-0,2<br>2,7 +/-0,3<br>1,5 +/-0,3                       | 25<br>44<br>69       | 0,05<br>0,01<br>0,001           |
| SR 25989C                    | 20<br>40               | 15,38<br>30,76                       | 4,3 +/-0,2<br>4,0 +/-0,2                                     | 10<br>17             | n.s.<br>n.s.                    |
| SR 25990C                    | 1,25<br>2,5<br>5<br>10 | 0,96<br>1,92<br>3,84<br>7,69         | 4,5 +/-0,3<br>4,1 +/-0,2<br>2,3 +/-0,1<br>1,7 +/-0,3         | 6<br>15<br>52<br>65  | n.s.<br>n.s.<br>0,001<br>0,001  |
| Kontrolle                    |                        |                                      | 3,5 +/-0,1                                                   |                      |                                 |
| SR 25990E                    | 10<br>20               | 3,84<br>7,69                         | 2,1 +/-0,5<br>1,4 +/-0,4                                     | 40<br>60             | 0,05<br>0,01                    |
| Kontrolle                    |                        |                                      | 3,97 +/-0,29                                                 |                      |                                 |
| PCR 4099<br>(race-<br>misch) | 2,5<br>5<br>12,5       | 2,14<br>4,28<br>10,71                | 3,13 +/-0,33<br>2,94 +/-0,34<br>2,19 +/-0,42                 | 21<br>26<br>45       | n.s.<br>0,05<br>0,01            |
| SR 25989A                    | 25                     | 22,46                                | 4,32 +/-0,29                                                 | 10                   | n.s.                            |
| SR 25990A                    | 2,5<br>5<br>12,5<br>25 | 2,25<br>4,49<br>11,23<br>22,46       | 3,05 +/-0,19<br>1,24 +/-0,22<br>0,86 +/-0,14<br>0,74 +/-0,13 | 23<br>69<br>78<br>81 | 0,05<br>0,001<br>0,001<br>0,001 |

<sup>xx</sup> Test von Student

n.s. nicht signifikant

Es wurde auch die antithrombotische Aktivität der Verbindungen im Test der venösen Thrombose an der Spirale untersucht, beschrieben von Kumada T. und Coll. in Thromb. Res. 18, S. 189 (1980).

Die weiblichen Ratten vom gleichen Typ wie zuvor, im Verhältnis von 10 Tieren pro Gruppe, wurden mit Diethylether anästhesiert und ihre Kellervene nach abdominaler Inzision isoliert.

In die Öffnung dieser Vene wurde knapp unterhalb der renalen Abzweigung, absteigend zu den Hüftvenen und ohne die Wandung zu verletzen, eine Metallspirale eingebracht, bestehend aus einem zahnärztlichen Stopfmaterial von 21 mm Länge, gehandelt von Dyna (Frankreich), Größe 30. Die Spirale wird über eine Länge von 19 bis 20 mm implantiert und überragt die Außenseite und das wieder verschlossene Abdomen um 1 mm.

Die Thrombi bilden sich schnell und fünf Stunden später wird das Abdomen unter Pentobarbitalanästhesie wieder eröffnet, die Ligaturen werden oberhalb und unterhalb der Spirale gesetzt, die ihrerseits nach längsverlaufender Inzision der Vene wieder herausgezogen wird, wonach man den isolierten Thrombus wiegt.

Die in der Tabelle III aufgeführten Resultate zeigen, daß das linksdrehende Isomer in diesem Test inaktiv ist, und zwar im Gegensatz zum rechtsdrehenden Isomer und zum Racemat.

TABELLE III

| Produkt   | verabreichte<br>Dosis mg/kg<br>p.o. | Menge<br>der<br>Base | Gewicht<br>der<br>Thrombi <sup>*</sup> | Verände-<br>rung % | P <sup>***</sup> |
|-----------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------------------|--------------------|------------------|
| Kontrolle |                                     |                      | 3,9 +/-0,3                             |                    |                  |
| PCR 4099  | 4,48                                | 3,84                 | 2,17 +/-0,24                           | 44                 | 0,001            |
| (race-    | 8,97                                | 7,69                 | 1,39 +/-0,15                           | 64                 | 0,001            |
| misch)    | 17,9                                | 15,38                | 1,00 +/-0,19                           | 74                 | 0,001            |
| SR 25989C | 40                                  | 30,76                | 4,17 +/-0,42                           | -7                 | n.s.             |
| SR 25990C | 1,25                                | 0,96                 | 3,11 +/-0,32                           | 20                 | n.s.             |
|           | 2,5                                 | 1,92                 | 2,29 +/-0,22                           | 41                 | 0,01             |
|           | 5                                   | 3,84                 | 1,71 +/-0,24                           | 56                 | 0,01             |
|           | 10                                  | 7,69                 | 1,26 +/-0,19                           | 67                 | 0,01             |
|           | 20                                  | 15,38                | 1,20 +/-0,13                           | 69                 | 0,01             |
| Kontrolle |                                     |                      | 3,78 +/-0,36                           |                    |                  |
| SR 25990E | 10                                  | 3,84                 | 1,48 +/-0,15                           | 60                 | 0,001            |
|           | 20                                  | 7,69                 | 1,18 +/-0,15                           | 68                 | 0,001            |

<sup>\*</sup> = Gewicht der Thrombi in mg +/- mittlere Standardabweichung  
p = Test U von Kruskal-Wallis

Für die toxikologische Untersuchung wurden die Verbindungen auf oralem Weg in Form einer Suspension verabreicht, die das gleiche Volumen an Wasser mit einem Zusatz von Gummi arabicum (10 %, Gew/Vol.) enthielt. Die Tiere waren Gruppen von jeweils 10 weiblichen Ratten vom Stamm Sprague Dawley, mit einem Gewicht von je 120 bis 135 Gramm, die nüchtern gehalten wurden.

Die Anzahl toter Tiere wurde 14 Tage nach der Verabreichung des zu untersuchenden Produktes ermittelt. Die auf diese Weise bestimmten letalen Dosen, ausgedrückt im Gewicht des verabreichten Salzes, sind in der Tabelle IV aufgeführt. Diese

Resultate zeigen einerseits, daß die Toxizität der racemischen Mischung nahe bei der des linksdrehenden Isomers liegt, während das rechtsdrehende Isomer deutlich weniger toxisch ist, und andererseits, daß die Toxizität von den Eigenschaften der zur Salzbildung verwendeten Säure abhängt.

TABELLE IV

| Produkte                     | D 10 | D 50<br>( )         | D 90 | absolute letale<br>Dosis |
|------------------------------|------|---------------------|------|--------------------------|
| PCR 4099<br>(race-<br>misch) | 1318 | 1615<br>(1448-1747) | 1979 | 2000                     |
| SR 25989A                    | 1259 | 1702<br>(1443-1797) | 2299 | 2000                     |
| SR 25990A                    | 3055 | 4316<br>(3569-5705) | 6137 | 5000                     |
| SR 25990C                    | 2257 | 2591<br>(2372-2805) | 2974 | 4000                     |
| SR 25990D                    | 2634 | 4268<br>(3581-6012) | 6914 | 5000                     |

( ) = Vertrauens-Intervall

Die soeben dargestellte pharmakologische Untersuchung hat klar ergeben, daß interessante Inhibitoreigenschaften hinsichtlich der Plättchenaggregation bei der Verbindung I<sub>d</sub> vorliegen und daß diese Aktivität bei ihrem Isomer I<sub>1</sub> völlig fehlt.

Das erfindungsgefähre Arzneimittel kann für die orale Verabreichung in Form von Tabletten, dragierten Tabletten, Kapseln, Tropfen, Granulaten oder Sirup vorliegen. Es kann auch für die rektale Verabreichung in Form von Suppositorien

und für die parenterale Verabreichung in Form von Injektions-Lösungen vorliegen.

Jede Einheitsdosis enthält vorteilhafterweise 0,001 g bis 0,100 g des erfindungsgemäßen Derivates, die täglich zu verabreichenden Dosen können zwischen 0,001 g und 0,500 g Wirkstoff schwanken, wobei sie vom Alter des Erkrankten und der Schwere der zu behandelnden Erkrankungen abhängig sind.

Nachfolgend werden als nicht einschränkende Beispiele einige pharmazeutische Formulierungen des erfindungsgemäßen Arzneimittels angegeben.

1. Tabletten

Wirkstoff 0,010 g

Grundmasse: Lactose, Puderzucker, Reisstärke, Algininsäure, Magnesiumstearat

2. Dragierte Tabletten

Wirkstoff 0,005 g

Grundmasse: Magnesiumstearat, Maisstärke, Gummi arabicum, Schellack, Weißzucker, Glucose, Weißwachs, Carnaubawachs, Paraffin, neue Coccine

3. Kapseln

Wirkstoff 0,025 g

Grundmasse: Magnesiumstearat, Maisstärke, Lactose

4. Injektionslösung

Wirkstoff 0,050 g

isotonisches Lösungsmittel ad 3 ml

5. Suppositorien

Wirkstoff 0,030 g

halbsynthetische Triglyceride ad 1 Suppositorium