



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149284 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

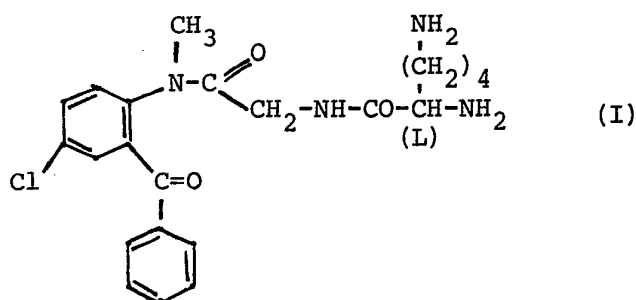
-
- (21) Patentansøgning nr.: 3739/75 (51) Int.Cl.⁴: C 07 K 5/06
(22) Indleveringsdag: 19 aug 1975
(41) Alm. tilgængelig: 21 feb 1976
(44) Fremlagt: 21 apr 1986
(86) International ansøgning nr.: –
(30) Prioritet: 20 aug 1974 GB 36567/74 21 maj 1975 GB 21821/75
- (71) Ansøger: F. *HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT; Basel, CH.
(72) Opfinder: Cedric Herbert *Hassall; GB, William Henry *Johnson; GB, Antonin *Kroehn; GB, Carey Ernest *Smithen; GB, William Anthony *Thomas; GB.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co

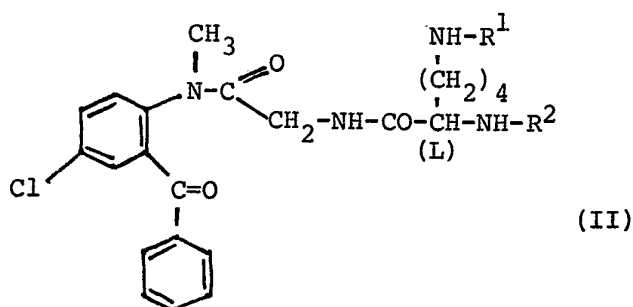
-
- (54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid eller syreadditionssalte deraf samt forbindelser til anvendelse som udgangsforbindelser ved fremgangsmåden

0 Den foreliggende opfindelse angår en analogi-
 fremgangsmåde til fremstilling af den hidtil ukendte
 forbindelse L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-
 -N-methylamid eller hidtil ukendte syreadditionssalte
 5 deraf, og opfindelsen angår endvidere hidtil ukendte
 forbindelser til anvendelse som udgangsmaterialer ved
 fremgangsmåden, nemlig de i krav 3's kendetegnende
 del med formlen (IIa) betegnede forbindelser.

10 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling
 af L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methyl-
 amid med formlen



20 eller syreadditionssalte deraf er ejendommelig ved, at
 man i overensstemmelse med i og for sig kendte metoder
 fraspalter de beskyttende grupper, der er til stede i en
 forbindelse med den almene formel



30 i hvilken R^1 og R^2 hver betegner en amino-beskyttende
 gruppe, hvorpå man om ønsket omdanner den opnåede fri
 base til et syreadditionssalt deraf eller omdanner et
 fremkommet syreadditionssalt til den frie base eller
 til et andet syreadditionssalt.

0

Ifølge opfindelsen er det særlig hensigtsmæssigt, at der fremstilles L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid-dihydrochlorid, eftersom denne forbindelse i praksis er velegnet som virksom bestanddel i farmaceutiske præparater.

5

De amino-beskyttende grupper R^1 og R^2 i en forbindelse med formlen (II) kan være vilkårlige amino-beskyttende grupper, der er kendt inden for peptidkemien. Særligt egnede aminobeskyttelsesgrupper til den foreliggende opfindelses formål er aralkoxycarbonylgrupper, navnlig benzyloxycarbonylgruppen, og tert.butoxycarbonylgruppen. Aminobeskyttelsesgrupperne kan imidlertid også være formyl-, trityl- eller trifluoracetylgrupper.

10

Fjernelsen af de amino-beskyttende grupper R^1 og R^2 gennemføres ifølge i og for sig kendte metoder; dette betyder sådanne metoder, der er i aktuel anvendelse, eller som beskrives i litteraturen til fjernelse af beskyttelsesgrupper. Ifølge en foretrukken udførelsesform for den foreliggende fremgangsmåde er de amino-beskyttende grupper sådanne, som kan fjernes ved hydrolyse. Således kan f.eks. en aralkoxycarbonylgruppe, f.eks. benzyloxycarbonyl, eller en tertiær butoxycarbonylgruppe fraspaltes ved behandling med en blanding af hydrogenbromid og eddikesyre. Den tertiære butoxycarbonylgruppe kan også fraspaltes ved behandling med hydrogenchlorid i et organisk opløsningsmiddel, f.eks. dioxan, eller ved behandling med trifluoreddikesyre. En benzyloxycarbonyl- eller tert.butoxycarbonylgruppe kan også fraspaltes ved behandling med bortrichlorid eller bortribromid i et indifferent organisk opløsningsmiddel, f.eks. dichlormethan.

15

20

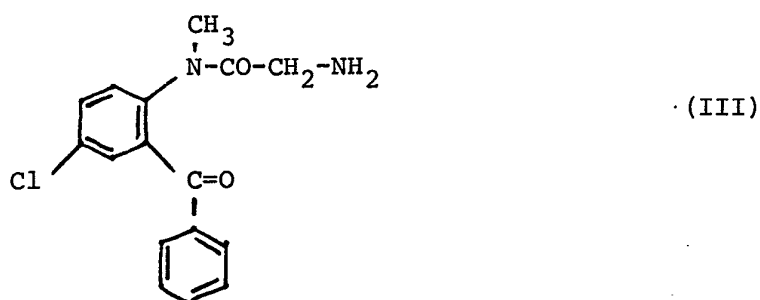
25

30

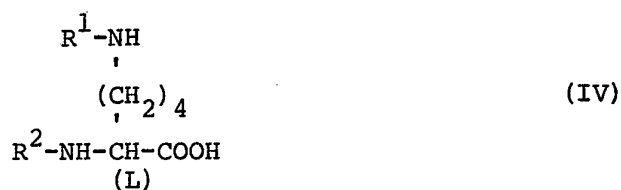
Udgangsmaterialerne med den almene formel II, hvoraf som nævnt de, der har den i krav 3's kendetegnende del angivne almene formel (IIa), også er genstand for opfindelsen, kan fremstilles ved en række forskellige metoder.

35

Således opnås der f.eks. et udgangsmateriale med formelen II ved, at aminen med formelen



10 kondenseres med en på passende måde beskyttet aminosyre med den almene formel



20 i hvilken R^1 og R^2 har den tidligere angivne betydning, eller med et reaktivt derivat deraf.

25 Kondensationen kan udføres ifølge i og for sig kendte metoder inden for peptidkemi, f.eks. ifølge den blandede anhydrid-, azid-, aktiverede ester- eller syrechloridmetode.

30 Ifølge én metode kan aminen med formelen III kondenseres med en på passende måde beskyttet aminosyre med formelen IV, i hvilken den endestillede carboxyfunktion foreligger i form af en blandet anhydridgruppe dannet med en organisk eller uorganisk syre. Aminosyren, som bærer en fri carboxyfunktion, behandles hensigtsmæssigt med en tertiær base såsom en tri-(lavere

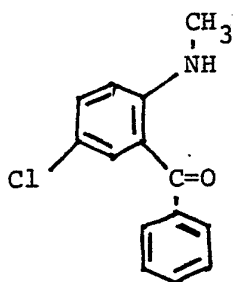
0 alkyl)-amin, f.eks. triethylamin, eller N-ethylmorpholin,
i et indifferent organisk opløsningsmiddel, f.eks. tetra-
hydrofuran, dichlormethan eller 1,2-dimethoxyethan,
hvorefter det fremkomne salt ved en lav temperatur
5 omsættes med en chlormyresyreester, f.eks. ethyl-
eller isobutylesteren. Det således fremkomne blandede
anhydrid kondenseres derefter hensigtsmæssigt in situ
med aminen med formlen III.

10 Ifølge en anden metode kan aminen med formlen III
kondenseres med en passende beskyttet aminosyre med formlen
IV, hvori den endestillede carboxygruppe foreligger i
form af et syreazid. Omsætningen gennemføres i et indiffe-
rent, organisk opløsningsmiddel, f.eks. dimethylformamid
eller eddikeester ved en lav temperatur.

15 Ved en yderligere metode kan aminen med formlen
III kondenseres med en passende beskyttet aminosyre
med formlen IV, hvori den endestillede carboxyfunktion
foreligger i form af en aktiv estergruppe, f.eks. p-nitro-
phenyl-, 2,4,5-trichlorphenyl- eller N-hydroxysuccinimid-
20 estergruppen. Denne kondensation gennemføres hensigts-
mæssigt ved ca. -20°C i et indifferent, organisk op-
løsningsmiddel, f.eks. dimethylformamid.

25 Ifølge en anden metode kan aminen med formlen III
kondenseres med en passende beskyttet aminosyre med
formlen IV, hvori den endestillede carboxyfunktion
foreligger som et syrechlorid. Denne kondensation gennem-
føres fortrinsvis i nærværelse af en base og ved en lav
temperatur.

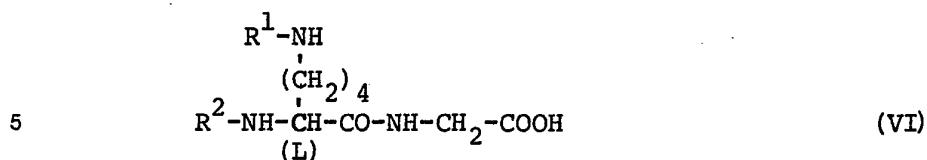
30 Alternativt kan udgangsmaterialerne med formlen
II fremstilles ved kondensation af forbindelsen med
formlen



(V)

0

med et passende beskyttet dipeptid med den almene formel



5 i hvilken R^1 og R^2 har den ovenfor angivne betydning, eller med et reaktivt derivat deraf, under anvendelse af en af de ovenfor beskrevne metoder i forbindelse med kondensationen af aminen med formlen III med en beskyttet aminosyre med formlen IV eller et reaktivt derivat deraf.

10 Aminen med formlen III kan f.eks. opnås ved kondensation af forbindelsen med formlen V med en passende beskyttet glycin eller et reaktivt derivat og påfølgende fraspaltning af beskyttelsesgruppen på den ovenfor beskrevne måde.

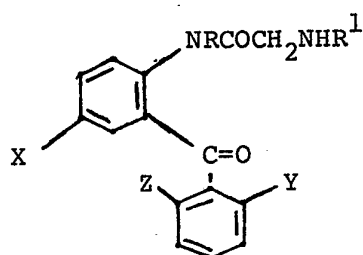
L-Lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid med formlen I danner syreadditionssalte med uorganiske syrer, f.eks. hydrogenhalogenidsyrer, såsom saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovlsyre, phosphorsyre og salpetersyre, og med organiske syrer, f.eks. eddikesyre, ravsyre, glycolsyre, mælkesyre, gluconsyre, vinsyre, citronsyre, maleinsyre, æblesyre, fumarsyre, methansulfonsyre, paratoluensulfonsyre, oxalsyre, ascorbinsyre, benzoesyre, hydroxyethansulfonsyre og 1,2-diethansulfonsyre. De fremstillede syreadditionssalte er de farmaceutisk acceptable. Syreadditionssaltene kan fremstilles efter i og for sig kendte metoder, f.eks. ved behandling af basen med en egnet syre. Et additionssalt kan også omdannes til et andet syreadditionssalt ved behandling med en egnet anionbytter, f.eks. Amberlite[®] IRA-401 i chloridform.

25 30 35 L-Lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid med formlen I og syreadditionssaltene deraf har sedativ, muskelafslappende og antikonvulsiv virkning.

0

Af særlig interesse er de farmaceutisk acceptable syreadditionssalte, der er vandopløselige, idet de let kan indgives ved injektion, f.eks. inden for tandlægevidenskaben til indledning af anæstesi og i
5 behandlingen af akutte konvulsive forstyrrelser samt ved Status epilepticus.

Fra USA-patentskrift nr. 3.455.985 og fra dansk patentansøgning nr. 4940/69 (fremlæggeskrift nr. 132.495) kendes der glycinamid-derivater med fri
10 α -aminogruppe, hvilke derivater har en struktur, der minder om den her omhandlede forbindelsesstruktur. Det L-lysyl-glycinamid-derivat, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, udviser imidlertid i sammenligning med de fra de ovennævnte skrifter
15 kendte forbindelser overraskende nok væsentlige fordele, navnlig høj vandopløselighed for syreadditionssaltene, god aktivitet med hurtig indtræden af virkningen efter parenteral indgivelse samt god aktivitet såvel ved oral som ved parenteral indgivelse, jfr. den følgende tabel
20 med resultater af sammenligningsforsøg, hvor A er forbindelsen ifølge eksempel 1, B er forbindelsen ifølge eksempel 68 i USA-patentskrift nr. 3.455.985, C er det tilsvarende methyl-derivat, og D og E er forbindelser, der falder ind under formlen for slutprodukterne ifølge
25 dansk patentansøgning nr. 4940/69.

Tabel

Test for muskelafslappende/antikonvulsiv aktivitet

Forbindelse	X	Y	Z	R	R ¹	Test 1 Antileptazol ED ₅₀ mg/kg	Test 2 Hældende sigte PD ₅₀ mg/kg	Test 3 Roterende stav ED ₅₀ mg/kg p.o.	Test 4 Antimetra- zol ED ₅₀ mg/kg p.o./i.v.	Vandoplø- selighed
A	Cl	H	H	CH ₃	L-Lys	1,2 i.v.	51 p.o.	11	2,2 p.o. 2,3 i.v.	>25%
B	Cl	H	H	H	H	11 p.o.	-	-	-	5%
C	Cl	H	H	CH ₃	H	1 i.p.	-	-	-	5%
D	Cl	Cl	Cl	CH ₃	H	-	285	165	inaktiv i.p. (200 i.p.)	2%
E	Cl	Cl	Cl	H	H	-	inaktiv p.o. (500 p.o.)	-	-	2% (i ethanol)

Test 1 og 4 er til hinanden svarende tests udført under forskellige betingelser (Leptazol=Metrazol).

0

L-Lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid med formlen I og de farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf kan anvendes som lægemidler, f.eks. i form af farmaceutiske præparater, som indeholder den nævnte forbindelse eller et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf sammen med et farmaceutisk bæremateriale, der er foreneligt dermed. De farmaceutiske præparater kan være faste stoffer, f.eks. tabletter, dragées og kapsler, eller kan foreligge i flydende form, f.eks. som opløsninger, suspensioner eller emulsioner. Farmaceutiske præparater, som er tilpasset til injektionsformål, er de foretrukne.

De doser, i hvilke D-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid med formlen I og dets farmaceutisk acceptable syreadditionssalte kan indgives, kan varieres efter patientens behov og efter den behandlede læges retningslinier. En daglig dosis på fra ca. 0,01 mg/kg til ca. 1mg/kg er imidlertid den foretrukne.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres i de følgende eksempler.

20

Eksempel 1

(A) Fremstilling af udgangsmaterialet:

(a) 20,9 g N-benzoyloxycarbonylglycin suspenderes i 1500 ml tør 1,2-dimethoxyethan, og suspensionen afkøles til -20°C . Der tilsættes 10,1 g N-methylmorpholin og 13,7 g isobutylchloroformiat, og den fremkomne opløsning omrøres i 1 time ved -20°C og filtreres derpå. Filtratet (som holdes ved fra -10°C til 0°C) sættes i løbet af flere timer portionsvis til en tilbagesvalende opløsning af 24,55 g 5-chlor-2-methylaminobenzophenon i 200 ml 1,2-dimethoxyethan. Den fremkomne reaktionsblanding koges natten over og inddampes til tørhed i vakuum. Den gule remanens opløses i ethylacetat, vaskes med to dele vand og én del mættet natriumchloridopløsning, tørres over vandfrit magnesiumsulfat og inddampes derpå

35

0

i vakuum. Ved søjlechromatografi af denne remanens på Florisil under anvendelse af blandinger af benzen og chloroform som løbemidler fås der 35 g (80%) rent 2-(N-benzyloxycarbonylamino)-N-(2-benzoyl-4-chlor-phenyl)-N-methylacetamid som en bleggul gummi.

5

Analyse for $C_{24}H_{21}ClN_2O_4$ (436,9):

Beregnet: C = 65,98%, H = 4,85%, N = 6,41%.

Fundet: C = 65,91%, H = 5,03%, N = 6,51%.

10

43,7 g 2-(N-benzyloxycarbonylamino)-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylacetamid opløses i 200 ml af en 30%'s opløsning af hydrogenbromid i iseddike, og den fremkomne reaktionsblanding omrøres natten over ved stuetemperatur. Blandingen sættes langsomt til et stort overskud (2000 ml) af tør diethylether, idet der omrøres kraftigt. Det udskilte produkt får lov at afsætte sig, og de ovenstående væsker dekanteres fra. Remanensen rives med 150 ml acetone, og produktet fraskilles ved filtrering, vaskes i rækkefølge med en mindste mængde af acetone og tør diethylether og tørres derpå i vakuum, hvorved der fås 29,5 g (77%) 2-amino-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylacetamid-hydrobromid som et hvidt hygroskopisk pulver med smeltepunkt 194-195°C (sønderdeling).

25

Analyse for $C_{16}H_{16}BrClN_2O_2$ (383,7):

Beregnet: C=50,10%, H=4,21%, N=7,30%, Br ionisk=20,83%.

Fundet: C=49,98%, H=3,83%, N=7,15%, Br ionisk=21,14%.

0

(b) 84 g N-benzyloxycarbonylglycin suspenderes i 500 ml alkoholfri chloroform, og suspensionen afkøles til -20°C . Den omrørte suspension behandles i løbet af 15 minutter portionsvis med 90 g phosphorpentachlorid, hvorefter omrøringen fortsættes, indtil der opnås en klar opløsning. Derefter sættes den kolde blanding i løbet af 30 minutter dråbevis til en kold (-5°C), kraftigt omrørt emulsion bestående af 82 g 5-chlor-2-methylaminobenzophenon, 347 g kaliumbicarbonat, 700 ml chloroform og 1400 ml vand. Den fremkomne blanding omrøres yderligere i 1 time ved -5°C og derefter natten over ved stuetemperatur. Derpå afbrydes omrøringen, hvorefter de flydende faser får lov at skille ud. Chloroformlaget vaskes tre gange med 500 ml vand pr. gang og inddampes i vakuum. Der fås 150,7 g af en viskos, gul gummi, der, som vist ved fysiske metoder, hovedsagelig består af rent (mere end 95%'s) 2-(N-benzyloxycarbonylamino)-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylacetamid.

10

Det i henhold til det foregående afsnit fremkomne produkt opløses i 650 ml af en 30%'s opløsning af hydrogenbromid i iseddike og behandles på samme måde som beskrevet i afsnit (a) i dette eksempel, hvorved der fås 2-amino-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylacetamid-hydrobromid i et totaludbytte på 77% ud fra 5-chlor-2-methylaminobenzophenon.

20

(c) 5,11 g $\text{N}^{\alpha}, \text{N}^{\epsilon}$ -bisbenzyloxycarbonyl-L-lysin-N-hydroxysuccinimidester opløses i 50 ml tørt dimethylformamid. Den fremkomne opløsning afkøles til -20°C og behandles med 4,8 g 2-amino-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylacetamid-hydrobromid (fremstillet som beskrevet ovenfor under (b)) og derpå dråbevis med 1,44 g N-ethylmorpholin. Blandingen omrøres kraftigt ved -20°C i 1 time og derpå natten over ved stuetemperatur. Opløsningsmidlet fordampes i vakuum, remanensen opløses i 150 ml tørt ethylacetat, og den fremkomne fældning, 2,0 g N-ethylmorpholin, skilles fra ved filtrering. Filtratet ekstraheres med 4 portioner på hver 25 ml 2 N saltsyre, hvorved der fjernes ca. 1,6 g 7-chlor-

25

30

35

0

-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2-H-1,4-benzodiazepin-2-on, og den tilbageblevne organiske fase vaskes med vand, derpå med 2 portioner på hver 50 ml mættet natriumchloridopløsning, tørres over vandfrit magnesiumsulfat og inddampes i vakuum, hvorved der fås 6,4 g af en bleggul, olie- og gummiagtig remanens.

5

Denne remanens opløses i chloroform og underkastes søjlechromatografi på Florisil under anvendelse af chloroform til elueringen. Ved inddampning af ensartede fraktioner fås der 5,8 g rent (N^α,N^ε-bisbenzyloxycarbonyl-L-lysyl)-glycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid i form af en næsten farveløs, lysfølsom gummi. $[\alpha]_D^{20} = -9,3^\circ$ (c=1 i ethanol).

10

15

Analyse for C₃₈H₃₉ClN₄O₇ (699,2):

Beregnet: C = 65,28%, H = 5,62%, N = 8,02%, Cl = 5,07%.

Fundet: C = 64,90% H = 5,56%, N = 7,84%, Cl = 5,25%.

(B) Fremgangsmåden ifølge opfindelsen:

20

(i) (N^α,N^ε-bisbenzyloxycarbonyl-L-lysyl)-glycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid omdannes under anvendelse af en 30%'s opløsning af hydrogenbromid i isedike til L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid-dihydrobromid, som fås som et hygroskopisk pulver med smeltepunkt 145-160°C (sønderdeling); $[\alpha]_D^{20} = +15,6^\circ$ (C = 1 i vand).

25

Analyse for C₂₂H₂₉Br₂ClN₄O₃ (592,8):

Beregnet: C = 44,58%, H = 4,93%, N = 9,45%, Br ionisk = 26,96%.

30

Fundet: C = 43,58%, H = 5,17%, N = 9,21%, Br ionisk = 27,43%. H₂O = 0,99%.

Vandfri: C = 44,02%, H = 5,11%, N = 9,30%, Br ionisk = 27,70%.

35

0

Ved behandling af dette dihydrobromid i vandig opløsning ved passage over et overskud af en anionbytterharpiks, såsom Amberlite[®] IRA-401 på chloridform og påfølgende lyofilisering af eluatet fås der i kvantitativt udbytte

5 L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid-dihydrochlorid som et hygroskopisk, hvidt, lysfølsomt pulver med smeltepunkt 125-145°C (langsom sønderdeling);

$[\alpha]_D^{20} = +19,3^\circ$ (c = 1 i vand).

10

Analyse for $C_{22}H_{29}Cl_3N_4O_3$ (503,86):

Beregnet: C = 52,45%, H = 5,80%, N = 11,12%, Cl = 21,12%.

Fundet: C = 51,58%, H = 5,80%, N = 11,18%, Cl = 20,80%;

$H_2O = 0,99\%$.

Vandfri: C = 52,10%, H = 5,75%, N = 11,29%, Cl = 21,10%.

15

(ii) 1,4 g (N^a, N^e -bisbenzyloxycarbonyl-L-lysyl)-glycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid opløses i 30 ml tør dichlormethan, hvorefter opløsningen afkøles til ca. -70°C og derpå behandles med 2 ml forafkølet bortrichlorid under omrøring. Blandingen omrøres under vandfri betingelser i 30 minutter ved ca. -70°C og bringes derpå i løbet af 2 timer langsomt på stuetemperatur. Reaktionsblandingen inddampes til tørhed i vakuum, remanensen genopløses i 30 ml frisk tørret dichlormethan, og opløsningen inddampes på ny til tørhed i vakuum. Dette gentages to gange med

25 dichlormethan og derpå fire gange med methanol for at fjerne de resterende borforbindelser som flygtigt trimethylborat. En koncentreret methanolisk opløsning af remanensen sættes under kraftig omrøring langsomt til en opløsning af

30 750 mg vandfri diethylether. Det hygroskopiske faste stof samles ved filtrering og tørres i vakuum. Dette produkt opløses i 30 ml vand, udrystes med 3 x 20 ml ethylacetat (til fjernelse af spor af 5-chlor-2-methylaminobenzophenon), hvorefter den vandige opløsning lyofiliseres. Der fås 0,7 g

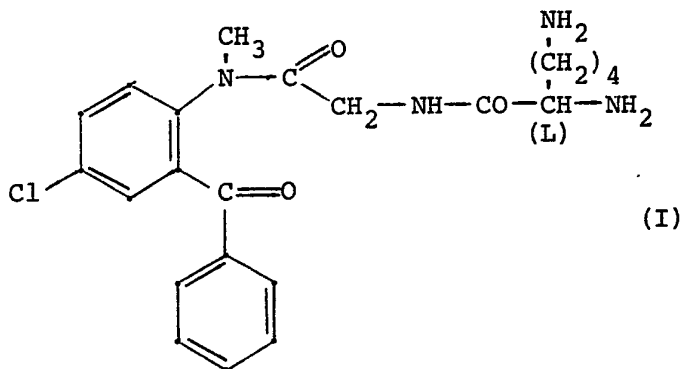
35 L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid-dihydrochlorid, som er identisk med det i afsnit (i) i dette eksempel beskrevne produkt.

0

P a t e n t k r a v .

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlorphenyl)-N-methylamid med formelen

5

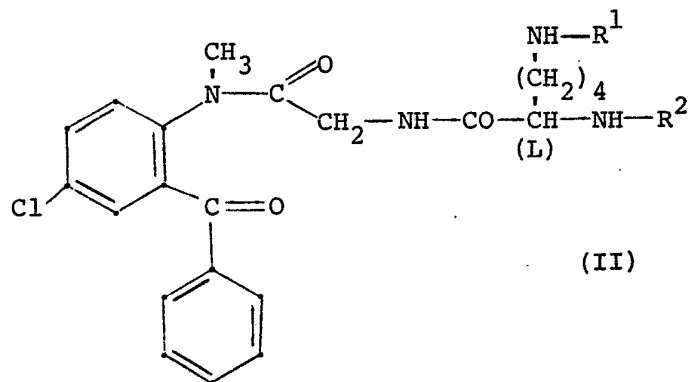


10

15

eller syreadditionssalte deraf, k e n d e t e g n e t v e d, at man i overensstemmelse med i og for sig kendte metoder fraspalter de beskyttende grupper, der er til stede i en forbindelse med den almene formel

20



25

i hvilken R^1 og R^2 hver betegner en amino-beskyttende gruppe, hvorpå man om ønsket omdanner den opnåede fri base til et syreadditionssalt deraf eller omdanner et fremkommet syreadditionssalt til den frie base eller til et andet syreadditionssalt.

30

35

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t v e d, at der fremstilles L-lysylglycin-N-(2-benzoyl-4-chlor-

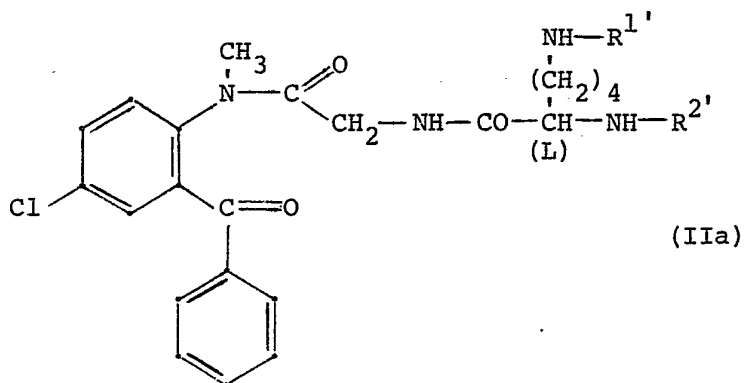
0

phenyl)-N-methylamid-dihydrochlorid.

3. Forbindelser til anvendelse som udgangsforbindelser ved fremgangsmåden ifølge krav 1, kendet og tegnet ved, at de har den almene formel

5

10



15

i hvilken $R^{1'}$ og $R^{2'}$ hver betegner en amino-beskyttende gruppe valgt blandt aralkoxycarbonyl, tert.butoxycarbonyl, formyl, trityl og trifluoracetyl.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 4940/69 (patent nr. 132495), 3564/75
 DE offentliggørelsesskrift nr. 2233682
 US patenter nr. 3455985, 3763179.