



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **167802**

(13) **B**

(51) Int Cl⁵ C 07 D 281/02, C 07 D 417/02

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr 885435
(22) Inng. dag 07.12.88
(24) Løpedag 07.12.88
(41) Alm. tilgj. 09.06.89
(44) Utlegningsdag 02.09.91
(62)

(86) Int. inng. dag og søknadsnummer

(85) Videreføringsdag

(30) Prioritet 08.12.87, FR, 8717044

(71/73) Søker/Innehaver Synthelabo, 58, rue de la Glacière, F-75013 Paris, FR

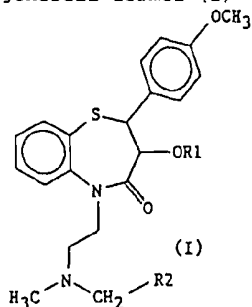
(72) Oppfinner(e) Alistair Lohead, Paris, FR
Jean-Claude Muller, Morsang S/Orge, FR
Christian Hoornaert, Paris, FR
Colombe Denys, Bourg la Reine, FR
(74) Fullmektig J.K. Thorsens Patentbureau AS, Oslo

(54) **Benevnelse** Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive benzotiazepinderivater.

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag**

Forbindelser med generell formel (I)



hvor R1 representerer et hydrogenatom eller en C₂-C₄-alkanoyl-gruppe, og R2 representerer en fenylgruppe som eventuelt bærer fra en til tre substituenten valgt blant halogenatomene og gruppene metylendioksy, etylendioksy og C₁-C₄-alkoksy, og deres addisjonssalter med farmasøytisk tålbare syrer.

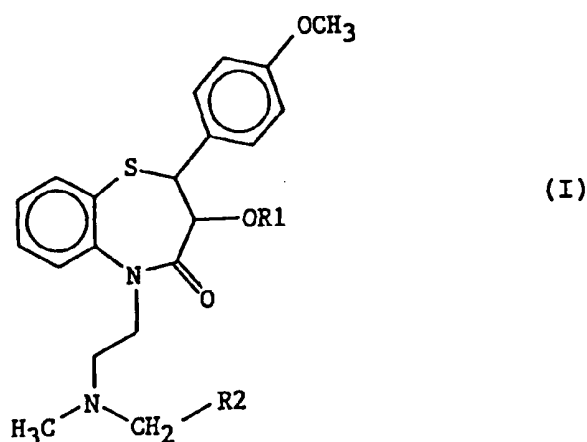
Forbindelsene har terapeutisk anvendelse.

Deres fremstilling er beskrevet.

167802

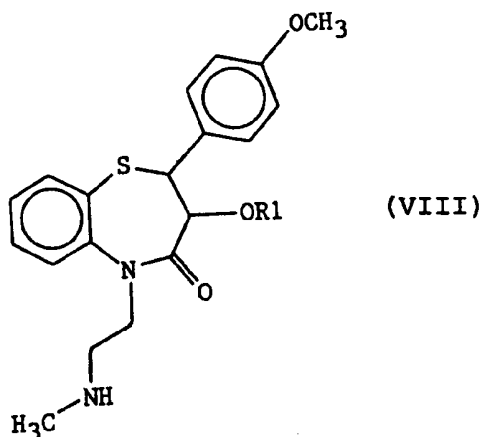
1

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en analogi-
fremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive
benzotiazepinderivater med generell formel (I):



hvor

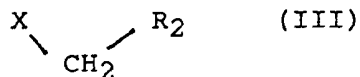
R1 er et hydrogenatom eller en C₂-C₄-alkanoylgruppe,
R2 er en fenyylgruppe som eventuelt bærer fra en til tre
substituenten valgt blant halogenatomene og gruppene metylen-
dioksy, etylendioksy og C₁-C₄-alkoksy, i form av rene
diastereoisomerer eller deres blandinger og terapeutiske
tålbare salter derav, og det særegne ved fremgangsmåten i
henhold til oppfinnelsen er at en forbindelse med formel
(VIII):



hvor R1 er som angitt over, omsettes med et halogenert
derivat med formel (III):

167802

2



hvor R_2 er som angitt over og X er et halogenatom, hvorpå de oppnådde forbindelser som ønsket omdannes til terapeutisk tålbare salter derav.

Disse og andre trekk ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen fremgår av patentkravet.

Forbindelsene med generell formel (I) kan være i form av frie baser eller syreaddisjonssalter. Karbonatomene i stillingene 2 og 3 er asymmetriske, og forbindelsene kan også eksistere i forskjellige diastereoisoimere, racemiske eller optisk rene former.

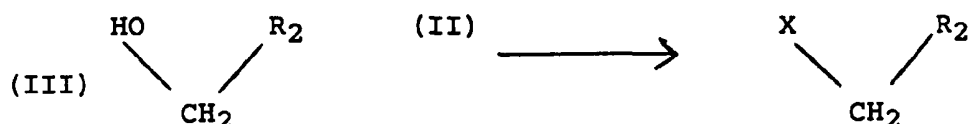
Den ovennevnte reaksjon hvor det anvendes et halogenert derivat med formel (III) hvori X er et halogenatom som klor eller brom er klassisk og gjennomføres således under kjente betingelser som i f.eks. et aprotisk løsningsmiddel som aceton eller 2-butanon ved tilbakeløpstemperatur i nærvær av en base for å binde frigjort syre, f.eks. kaliumkarbonat, og eventuelt i nærvær av en faseoverføringskatalysator som tetra-n-butylammoniumjodid.

Det vil forstås at en forbindelse med formel (I) hvori R_1 er et hydrogenatom kan omdannes til en forbindelse med formel (I) hvori R_1 er en alkanoylgruppe ved hjelp av en vanlig acylering og den inverse omdannelse er mulig ved hjelp av hydrolyse.

Benzotia-zepinonene med generell formel (VIII) er f.eks. beskrevet i Chem. Pharm. Bull., 26, 2889 (1978), J. Pharmacobio. Dyn., 7, 24 (1978) og J. Cardio. Pharmacol., 7, 152 (1984).

Forbindelsen med formel (III) er beskrevet i litteraturen og er i de fleste tilfeller kommersielt tilgjengelig. Når denne forbindelse ikke er kommersielt tilgjengelig fremstilles den

på enkel måte som vist i det etterfølgende ved å gå ut fra alkoholer med formel (II):



hvor R_2 og X er som angitt over.

De etterfølgende eksempler illustrerer detaljert fremstillingen av en forbindelse i overensstemmelse med oppfinnelsen.

Element-mikroanalyser og IR- og NMR-spektra bekrefter strukturene av de oppnådde forbindelser.

Eksempel

(+)-cis-acetyloksy-3 (metoksy-4 fenyl)-2 [[N-[(metylen-dioksy-3,4 fenyl)-2 metyl]-metylamino]-2 etyl]-5 dihydro-2,3 5H-benzotiazepin-1,5 on-4

I en kolbe på 250 ml innføres 4 g (0,00915 mol) (+)-cis-(2S,3S)-acetyloksy-3 (metoksy-4 fenyl)-2 (metylamino-2 etyl)-

5 dihydro-2,3 benzotiazepin-1,5 on-4, 3 g (0,0366 mol) kaliumkarbonat, 2,3 g (0,0137 mol) α -klor-metylendioksy-3,4 metylbenzen og 100 ml 2-butanon og blandingen oppvarmes med tilbaketilbake i 24 timer. Blandingens filtreres, filtratet avdampes og restoljen renses ved kromatografi på en silikakolonne ved eluering med en blanding 97/3 av diklormetan/-metanol. Den rene fraksjon oppløses i 60 ml etanol, behandles med 0,76 g oksalsyre, saltet som presipiteres filtreres og rekrystalliseres i etanol. Til slutt isoleres 2,71 g (+)-cis-acetyloksy-3 (metoksy-4 fenyl)-2 [[N-[(metylen-dioksy-3,4 fenyl)-2 metyl]-metylamino]-2 etyl]-5 dihydro-2,3 5H-benzotiazepin-1,5 on-4-oksalat. Smeltepunkt: 71°C.

167802

4

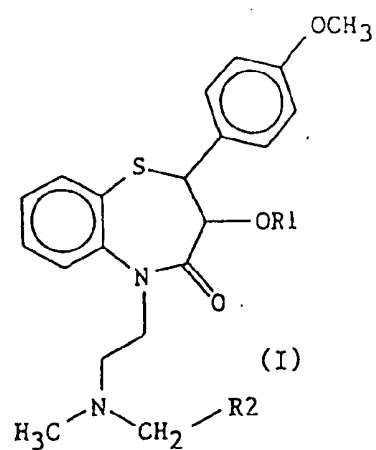
Følgende tabell viser kjemiske strukturer og fysiske egenskaper for noen av forbindelsene som er fremstilt i overensstemmelse med oppfinnelsen.

Forbindelsene ble underkastet farmakologiske forsøk som viser deres interesse som terapeutisk anvendbare forbindelser.

Et første forsøk viser at forbindelsene er kalsiumantagonister. Anvendt forsøksprotokoll er en variant av den som er anvendt av Godfraind et Kaba (1969), ("Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle", Br.J. Pharmac., 36, 549-560).

Forsøkene ble utført på fragmenter av brystaorta fra kanin. Dyrene, av typen "Fauves de Bourgogne" med en gjennomsnittsvekt på 1,5 kg, ble avlivet ved at halsen ble skåret over og dyrene ble tappet for blod. Brystaorta ble fjernet raskt og plassert i en oksygenert bikarbonat-Krebs-løsning (95 % O₂ + 5 % CO₂).

Aortafragmenter med en lengde på omtrent på 1 cm ble fremstilt og innført i 20 ml preparatskåler som inneholder en oksygenert bikarbonat-Krebs-løsning (pH 7,4) ved 37°C. To metallklemmer med "U"-form i fragmentenes lengde ble innført i deres åpning.



Nr.	R1	R2	Salt *	$[\alpha]_D^{20}$ (°) c, MeOH (%)	Smp (°C)
1	COCH ₃	C ₆ H ₄ -3-OCH ₃	oks.	+86,5 (0,5)	164
2	COCH ₃	C ₆ H ₃ -3,4-(OCH ₃) ₂	oks.	+84,8 (0,5)	152
3	COCH ₃	C ₆ H ₃ -3,4-OCH ₂ O	oks.	+87,5 (0,5)	71
4	COCH ₃	C ₆ H ₃ -3,5-(OCH ₃) ₂	oks.	+83,3 (0,5)	184
5	COCH ₃	C ₆ H ₃ -2,5-(OCH ₃) ₂	oks.	+89,3 (1)	108
6	COCH ₃	C ₆ H ₃ -2,3-(OCH ₃) ₂	fum.	+73,3 (1)	123
7	COCH ₃	C ₆ H ₃ -3,4-Cl ₂	oks.	+82,4 (0,5)	178
8	COCH ₃	C ₆ H ₃ -3,4-OCH ₂ CH ₂ O	oks.	+75,9 (1)	114
9	COCH ₃	C ₆ H ₂ -3,4,5-(OCH ₃) ₃	oks.	+87,6 (0,3)	162

* : oks. oksalat
fum. fumarat

167802

6

En av klemmene er festet på bunnen av skålen. Den andre, som er forbundet med en isometrisk spenningsmåler (Grass FT03), tillater en kontinuerlig registrering ved hjelp av en forsterker (Grass 7P1) av sammentrekningsresponsene for aortafragmentene ved hjelp av en registrerende oscillograf (Grass 79B). Denne metode er, i forhold til de spiralformede eller ringformede preparater, fordelaktig, da den bedre tar hensyn til strukturintegriteten av karene og bare registrerer sammentrekningsresponsen for den radiale komponent som representerer det fenomen som er av interesse sett ut fra et funksjonelt synspunkt (regulering av arterietrykket). Preparatene ble utsatt for en innledende belastning på 4 g.

Fenoksybenzamin (1 μM) og propranolol (1 μM) ble tilsatt til slutt til forskjellige Krebs-blandinger for å undertrykke sammentrekningsresponsene som er forbundet med aktiviteten av de vaskulære α - og β -adrenergiske reseptorer.

Etter en times stabilisering i bikarbonat-Krebs-løsningen ble den påtrykte spenningen på aorta nedsatt til 2 g. Etter en periode på 30 minutter ble preparatene inkubert i 10 minutter i en bikarbonat-Krebs-løsning uten kalsium og i nærvær av EDTA (200 μM) og propranolol (1 μM). Denne løsning ble byttet ut med en depolariserende Krebs-løsning (som er rik på kalium og som mangler natrium) uten kalsium og inneholdende propranolol (1 μM). Etter fem minutter ble kalsium tilsatt i en konsentrasjon på 1mM til løsningen og en stabiliseringsperiode på 30 minutter tillates slik at preparatene oppnår en stabil kontraksjon. Deretter ble forbindelsene som skal testes tilsatt til et bad i påfølgende doser, idet en oppholdstid på 30 minutter (en tid som generelt er nødvendig for oppnåelse av en horisontal sammentrekning) tas hensyn til mellom to konsentrasjoner, like til den totale forsvinning av kontraksjonen som er fremkalt av 1mM kalsium eller like til en maksimal konsentrasjon på 30 μM av produktet som undersøkes. Ved slutten av forsøket ble en supramaksimal papaverinkonsentrasjon (300 μM) tilsatt for å bestemme den mulig maksimale dekontraksjon for hvert preparat.

De absolutte verdier (i gram) av begynnelseskontraksjonen (etter 1mM CaCl_2) og av kontraksjonen etter forskjellige kumulative konsentrasjoner av de vasodilaterende forbindelser, ble oppnådd for hvert preparat ved forskjellen mellom den minste kontraksjon som observeres 30 minutter etter endelig tilsetning av 300 μM papaverin. Den prosentvise nedsettelse av kontraksjonen, i forhold til kontraksjonen som er frembragt ved hjelp av 1mM kalsium ble beregnet for hver konsentrasjon av forbindelsen og for hvert preparat, og de enkelte prosentverdier for dekontraksjonen er middelveiden $\bar{X} \pm \text{S.E.M.}$ De oppnådde middelveiden (korrigert ved hjelp av det inverse midlere standard avvik) ble analysert ved hjelp av en matematisk modell med S-kurve. Den molare konsentrasjon som bevirker 50 % dekontraksjon av responsen for kalsium (CE_{50}) ble beregnet, eller heller dens antilogaritme (pCE_{50}). For forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen er pCE_{50} -verdier i størrelsesorden 5,0 til 7,0.

Forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen er også gjenstand for et forsøk vedrørende inhibering av den spesifikke binding av "PAF", plateaktiveringsfaktor.

Dyrene som ble anvendt er kaniner med en vekt på 2,5 til 3 kg. De er bedøvet med natriumpentobarbital (0,25 mg/kg ved intravenøs tilførsel) og fikk kunstig åndedrett ved intubasjon. Blod ble tatt ut fra karotidarterien og samlet i rør inneholdende et citratbasert antikoagulasjonsmiddel. Rørene ble sentrifugert ved 100 xg i 15 minutter, og det platerike plasma ble fortynnet med to volumdeler 10 mM Tris-HCl-buffer, pH 7,5, inneholdende 150 mM natriumklorid og 2 mM Edta (buffer A). Etter sentrifugering ved 100 xg i ti minutter ved 4°C ble pelleten vasket med to volumdeler buffer A, hvorpå en ny sentrifugering ble gjennomført.

Den platerike pellet ble suspendert i en isavkjølt buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,0, inneholdende 5 mM magnesiumklorid og 2 mM EDTA), hvorpå man homogeniserer og sentrifugerer ved 30.000 xg i ti minutter ved 4°C. Denne operasjon ble

167802

8

gjentatt, den oppnådde pellet ble samlet i samme buffer, man homogeniserer og membransuspensjonen ble frosset i flytende nitrogen. For å måle inhibering av bindingen ble suspensjonen tint og den ble fortynnet med buffer for å oppnå et proteininnhold på omtrent 150 µg pr. ml.

Membranprøvene ble inkubert (30 µg protein) i nærvær av 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7,0, inneholdende 10 mM magnesiumklorid og 0,25 % (i vekt pr. volum) bovint serumalbumin, i to timer ved 25°C med 1 nM tritiumbehandlet PAF ($[^3\text{H}]$ 1-O-heksadecyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-fosforylcholin) i et sluttvolum på 1 ml. Inkubasjonen ble avsluttet og membranene ble samlet og de ble vasket hurtig med isavkjølt buffer på Whatman-filteret, idet det anvendes en cellesamler, Skatron, forbundet til en vakuumpumpe. Filtrene ble tørket og det ble foretatt en scintigrafisk spektrometribestemmelse. Den spesifikke binding ble definert som forskjellen i radioaktivitet for de observerte membraner i fravær og i nærvær av 1 µM tritium-PAF.

Inhiberingsforsøkene for bindingen ble gjennomført ved nevnte betingelser i nærvær av forskjellige konsentrasjoner av testforbindelsene. Til slutt ble konsentrasjonen CI_{50} for hver forbindelse bestemt (konsentrasjonen som inhiberer 50 % av den spesifikke binding) ved å tegne inhiberingskurver i henhold til minste kvadraters metode.

CI_{50} for forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen er i dette forsøk mellom 3 og 8 µM.

Til slutt ble det gjennomført et inhiberingsforsøk av blodplateaggregering induisert ved "PAF-aceter" (1-O-(C_{16} - C_{18} -alkyl)-2-acetyl-sn-glyceryl-3-fosforylcholin).

Forsøket ble gjennomført i henhold til metoden etter Born (J. Physiol., (1963), 168, 178-195) på blodplater fra kanin. Blodet blir tatt ut ved kardialpunktering og blandet med 3,8 % trinnatriumcitrat i et forhold på en volumdel antikoagula-

sjonsløsning pr. ni volumdeler blod. Deretter ble prøven sentrifugert ved 250 xg i ti minutter, det platerike plasma ble fjernet og platene ble deretter telt.

Resten ble underkastet sentrifugering ved 3000 xg i 15 minutter for å oppnå platefattig plasma, og det platerike plasma ble fortynnet ved hjelp av det platefattige plasma for å oppnå en suspensjon som inneholder 200.000 til 300.000 plater pr. mikroliter. Man utløser aggregering in vitro ved hjelp av "PAF-aceter" ved den maksimale konsentrasjon som er nødvendig for å oppnå en maksimal reversibel respons (normalt mellom 1,5 og 3,3 ng/ml). Variasjonene i optisk tetthet ble målt ved hjelp av et aggregometer (300 µl platerikt plasma pr. rør, 1100 t/min ved 37°C) inntil maksimal aggregering passerer.

For disse forsøk ble forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen oppløst i dimetylsulfoksyd, og de ble inkubert i to minutter ved 37°C før tilsetning av "PAF-aceter".

Antiaggregeringsvirkningen uttrykkes ved CI_{50} -konsentrasjonen, dvs. den konsentrasjon som inhiberer 50 % av aggregeringen fremkalt av "PAF-aceter".

CI_{50} for forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen er mellom 1 og 10 µM.

Resultatene for de farmakologiske forsøk viser at forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen er kalsium-antagonister og kan, i denne forbindelse, anvendes for behandling av forskjellige sykdommer for hvilke denne type legemidler er indikert.

Forbindelsene kan altså særlig anvendes som kardiovaskulære legemidler for behandling av sykdommer som krever modulatorer for transmembrane og intracellulære kalsiumbevegelser, særlig hypertensjon, smerte og kardial arytmi.

167802

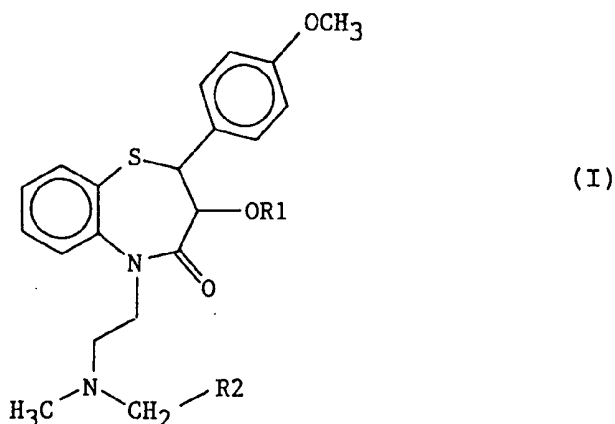
10

Forbindelsene viser dessuten antiaterogene virkninger, plateantiaggregerende virkninger, antikardialischemivirkninger, anticerebralischemivirkninger, antimigrenevirkninger, antiepileptisk virkning, antiastmatisk og antiulcerøs virkning. Innenfor det kardiovaskulære området kan de anvendes alene eller sammen med andre kjente aktive substanser som diuretika, β -blokkere, enzyminhiberingsmidler for omdannelse av angiotensin, α_1 -reseptorantagonister.

Kombinert med midler som har til hensikt å forsterke deres virkninger eller nedsette deres giftighet kan de likeledes anvendes for behandling av cancer eller ved transplantasjoner.

PATENTKRAV

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive benzotiazepinderivater med generell formel (I):



hvor

R1 er et hydrogenatom eller en C₂-C₄-alkanoylgruppe,

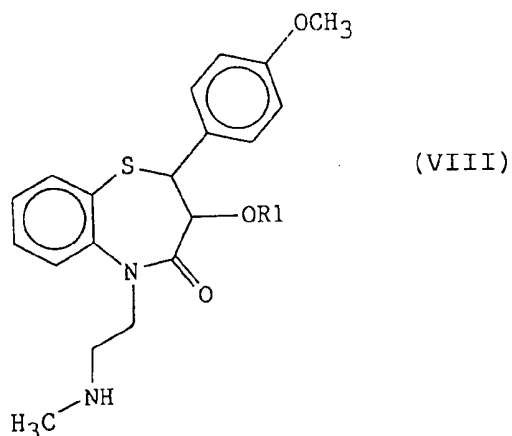
R2 er en fenylgruppe som eventuelt bærer fra en til tre substituenten valgt blant halogenatomene og gruppene metylen-dioksy, etylendioksy og C₁-C₄-alkoksy,

i form av rene diastereoisomerer eller deres blandinger og terapeutiske tålbare salter derav,

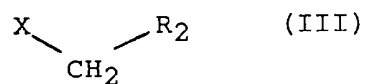
167802

11

karakterisert ved at en forbindelse med
formel (VIII):



hvor R1 er som angitt over, omsettes med et halogenert
derivat med formel (III):



hvor R2 er som angitt over og X er et halogenatom, hvorpå de
oppnådde forbindelser som ønsket omdannes til terapeutisk
tålbare salter derav.