



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 146445 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 2854/77

(51) Int.Cl.³: C 07 C 149/247

(22) Indleveringsdag: 27 jun 1977

(41) Alm. tilgængelig: 29 dec 1977

(44) Fremlagt: 10 okt 1983

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: 28 jun 1976 DE 2628911

(71) Ansøger: C.H. *BOEHRINGER SOHN; 6507 Ingelheim am Rhein, DE.

(72) Opfinder: Henri Joseph *Baille-Barrelle; FR, Maurice *Vigneron; FR, Charles *Lespagnol; FR.

(74) Fuldægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af svovlholdige N-benzyl-aminosyrer eller salte heraf

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte svovlholdige N-benzyl-aminosyrer med den almene formel I (se kravet), hvori X og Y, der kan være ens eller forskellige, hver betegner et halogenatom, R betegner en alkylgruppe med 1-3 carbonatomer, og n er et af de hele tal 1 og 2, eller deres fysiologisk acceptable additionssalte med uorganiske eller organiske syrer eller deres fysiologisk acceptable salte med uorganiske eller organiske baser eller basiske aminosyrer.

Der foretrækkes de forbindelser med den ovennævnte formel I, hvori X og Y hver er et bromatom, R er en methylgruppe, og n er 1

DK 146445 B

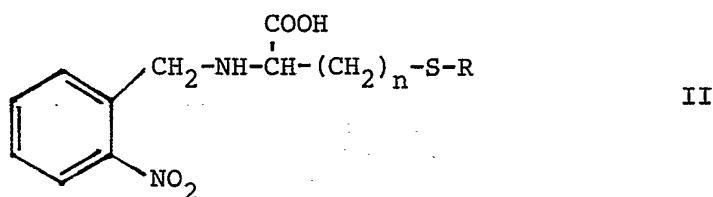
eller 2, samt deres fysiologisk acceptable additionssalte med uorganiske eller organiske syrer, såsom saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovlsyre, phosphorsyre, mælkesyre, citronsyre, vinsyre, maleinsyre, pamoésyre, decylsyre, theophyllinsulfonsyre og theophyllineddikesyre, og deres salte med basiske aminosyrer fra gruppen bestående af lysin, arginin, histidin og ornithin, navnlig med lysin.

De omhandlede forbindelser udviser meget værdifulde farmakologiske egenskaber. Man kan anvende dem til behandling af hypersekretoriske lidelser i bronchierne.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er kendetegnet ved, at man kondenserer o-nitrobenzaldehyd og en forbindelse med formelen

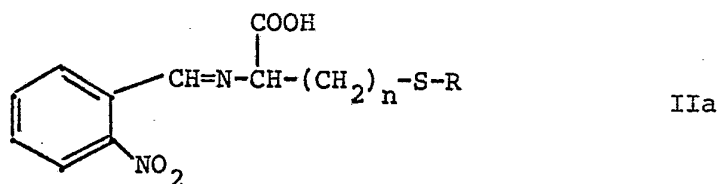


hvor R og n har de ovennævnte betydninger, og derefter direkte reducerer den dannede, ikke-isolerede Schiff'ske base i reaktionsmediet til opnåelse af et N-o-nitrobenzyleret derivat med formelen



som reduceres med molekylært hydrogen i nærværelse af en hydrogeneringskatalysator, hvorpå den opnåede forbindelse med formelen I, hvori X og Y dog begge er hydrogen, halogeneres til opnåelse af den tilsvarende forbindelse, hvori X og Y er halogen, fortrinsvis chlor eller brom, hvorefter man, om ønsket, til fremstilling af additionssalte af de omhandlede forbindelser I med uorganiske eller organiske syrer eller salte med uorganiske eller organiske baser eller basiske aminosyrer omsætter den pågældende forbindelse med den ønskede syre, base eller aminosyre under sædvanlige betingelser.

Den ovennævnte Schiff'ske base har formelen



hvor R og n har de ovennævnte betydninger.

Forbindelserne med den almene formel II, hvori R og n har sam-

me betydninger som for den almene formel I, samt forbindelserne med den almene formel IIa udgør hidtil ukendte værdifulde mellemprodukter til fremstilling af forbindelserne med den almene formel I.

En af de omhandlede forbindelser, nemlig N-[(2-amino-3,5-dibrom)benzyl]-methionin, i det følgende betegnet forbindelse A, sammenlignedes med kendte forbindelser, nemlig S-carboxymethyl-cystein (SCMC) og N-[2-amino-3,5-dibrom-benzyl]-N-methylcyclohexylaminhydrochlorid (bromhexinhydrochlorid eller Bisolvon[®]). Denne undersøgelse vedrører virkningen af de forskellige forbindelser overfor en bronchial hypersekretion, som fremkaldtes ved irritation.

Marsvin, som i tre på hinanden følgende dage havde indåndet ammoniakdamp, der leveredes af en forstøver i en bestemt og reguleret mængde, behandlede med forskellige forbindelser og blev derpå, straks efter den sidste inhalation af ammoniakdamp, iagttaget i en uge.

Efter aflivning og udtagning af lungeblokkene, fiksering af vævet, parenchymsnit, farvning ved trichrometoden ifølge Masson (Hematoxylin-Fuchsin-Ponceau og anilinblåt) og ved P.A.S. Bleu Alcian (særlig farvning af mucopolysaccharider) blev bedømmelsen af lungeparenchymsnittene udført "blindt". På denne måde kunne de forskellige virkninger af de studerede forbindelser bevises, og nærmere bestemt ved sammenligning med de iagttagelser, som man havde gjort med de marsvin, der havde indåndet ammoniakdamp og ikke var blevet behandlet. Der udførtes en statistisk undersøgelse efter den ikke-parametriske prøve ifølge Mann-Whitney (se S. Siegel i "Non-parametric statistics for the behavioral Science" (1956) side 116,- Intern. Student Edition - McGraw-Hill Book Cie. Inc.).

Den samlede undersøgelse udførtes med 174 hanmarsvin, som var trefarvede og vejede mellem 350 og 450 g. Den udførtes i to eksperimenteringsblokke, idet hver blok foruden behandlede dyr omfattede 3 sunde marsvin og 12 "NH₃-syge" marsvin.

De statistiske undersøgelser, der udførtes over resultaterne af P.A.S. Bleu Alcian-farvningen, er anført i nedenstående tabeller:

Tabel I

Udførte sammenligninger (mængder i mg/kg)	I de store bronchiers område					
	B + M + A*		A**		S***	
	a	b	a	b	a	b
Forbindelse A 468,7	1,71	NS	0,71	NS	0,38	NS
Bisolvon® 468,7	2,29		1,29		0,79	
Forbindelse A 187,5	1,79	0,02	0,63	0,002	0,67	NS
SCMC 468,7	3,71		1,50		1,13	
Forbindelse A 468,7	1,71	0,10	0,38	NS	0,38	0,002
SCMC 937,4	2,92		1,13		1,25	

* = Mængde celledslim: i det nedre (B) + mellemste (M) og øvre område (A)

** = Slim i det øvre område

*** = Sekreteret slim

a = Gennemsnitligt index: jo lavere det er, desto aktivere er produktet

b = Sandsynlighed (arbejdshypotese: findes der en virkningsforskelle mellem de pågældende produkter?)

NS = P > 0,10 (NS står for ikke signifikant og P for sandsynlighed).

Tabel II

Udførte sammenligninger (mængde i mg/kg)	I bronchiolernes område					
	B + M + A*		A**		S***	
	a	b	a	b	a	b
Forbindelse A 468,7	0,67	NS	0,13	NS	0,17	NS
Bisolvon® 468,7	1,17		0,46		0,17	
Forbindelse A 187,5	0,88	0,05	0,42	0,02	0,17	0,05
SCMC 468,7	2,21		0,83		0,67	
Forbindelse A 468,7	0,67	0,02	0,13	0,002	0,17	NS
SCMC 937,4	1,71		0,83		0,25	

Tabel III

Udførte sammenligninger (mængder i mg/kg)	I det samlede område af "de store bronchier og bronchiolerne"					
	B + M + A*		A**		S***	
	a	b	a	b	a	b
Forbindelse A 468,7	2,38	NS	0,83	0,10	0,54	NS
Bisolvon® 468,7	3,46		1,75		0,96	
Forbindelse A 187,5	2,67	0,02	1,04	0,002	1,08	0,10
SCMC 468,7	5,79		2,46		1,79	
Forbindelse A 468,7	2,38	0,02	0,83	0,002	0,54	0,02
SCMC 937,4	4,63		1,96		1,50	

Undersøgelse af resultaterne, som de er angivet i tabellerne I, II og III, gør det muligt at vurdere virkningen af produkterne på slimsekretionen, sådan som den åbenbares på vævssnittene ved P.A.S. Bleu Alcian-farvningen. Denne slimsekretion er fremfor alt anført på grund af betydningen af slimmen i det øvre område i de bægerformede celler og som følge af betydningen af det sekreterede slim for den bronkiale forgrening.

Når man for første gang undersøger mængden af de neutrale mucopolysaccharider, der er farvet med P.A.S. Bleu Alcian i området af bronkiernes og bronkiolernes epithelceller kan man for dosen 486,7 mg/kg indordne forbindelserne i følgende rækkefølge (tabel III):

Forbindelse A, bromhexin , S.C.M.C.

For slimsekretionen i den bronkiale forgrening (tabel I) gælder samme klassifikation.

De angivelser, der fremgår af tabellerne I, II og III, viser at - selvom der mellem bromhexin og forbindelse A ved dosen på 468,7 mg/kg ikke manifesterer sig nogen statistisk betydningsfuld forskel for slimmen i området af de store bronchier og bronchiolerne - de gennemsnitlige indices altid er svagere ved 468,7 mg/kg for forbindelse A, og at man når sandsynlighedsniveauet på 0,10 til gunst for forbindelsen A, når man betragter slimmen i det øvre område af de samlede "store bronchier og bronchioler".

Fremfor alt beviser disse statiske sammenligninger overlegenheden af forbindelse A over S.C.M.C., såvel ved svag dosis for de to forbindelser (det være sig ved 187,5 mg/kg af forbindelse A for 468,7

mg/kg af S.C.M.C.) som ved stærk dosis (468,7 mg/kg af forbindelse A for 937,4 mg/kg af S.C.M.C.). Dette forhold er tydeligt i området af de store bronchier og i bronchiolerne eller i det samlede område "store bronchier og bronchioler".

Konklusion af den farmakologiske undersøgelse.

Den gentagne indånding af ammoniakdampe fremkalder hos marsvinet en betydelig relativ slimsekretion, navnlig i epithelområdet af de store bronchier og bronchiolerne. Forbindelse A nedsætter denne sekretion tydeligt og på mere påfaldende måde end sammenligningsforbindelserne.

Toxicitet.

Undersøgelsen af toxiciteten udførtes på hanlige, trefarvede marsvin af en vægt på 400 g. Disse dyr fik otte på hinanden følgende indgifte, i et 24 timers interval, af et dispersivt middel (vandig opløsning af carboxymethylcellulose beriget til 0,25% med "Tween[®] 80" - befugtningsmiddel - i et forhold på 0,2%) plus det undersøgte aktive stof i et forhold på 1200 mg/kg.

Forsøgene udførtes med N-(2-amino-3,5-dibrom-benzyl)-methionin. Ingen dyr døde i iagttagelsestidsrummet. Deraf kan man således slutte, at de omhandlede forbindelser ikke er toksiske i sædvanlig dosering.

De omhandlede forbindelser kan hovedsageligt anvendes til behandling af hypersekretoriske lidelser i bronchierne samt til behandling af de karakteriserede besværligheder i nærværelse af en sej slim, hvis naturlige udskillelse er vanskelig. Derfor kan de omhandlede forbindelser anvendes til behandling af stærk og kronisk bronchitis, af bronchorrhoeer, bronchiektasier, lungeemphysem, asthma og alle lidelser, der bevirker en patologisk sekretion. De omhandlede aktive forbindelser kan indgives oralt i daglige doser på fra 20 til 80 mg.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

N-(2-Amino-3,5-dibrom-benzyl)-methionin.

a) N-(2-Nitro-benzyl)-methionin.

I en natriumhydroxidopløsning, som man har opnået ved opløsning af 134 g natriumhydroxid i pastilform i 3,5 l vand, indfører man lidt efter lidt 500 g methionin og 560 g o-nitrobenzaldehyd. Man omrører i 1 time ved stuetemperatur og derpå i 2 timer ved 30-35°C.

Derefter afkøles reaktionsblandingen til 15°C , og der tilsættes 57 g natriumborhydrid i små portioner, idet man holder temperaturen ved ca. 15°C . Efter endt omsætning lader man blandingen henstå natten over. Man vasker reaktionsblandingen med ether, fraskiller den vandige fase, som man syrner til pH 3 med saltsyre, fracentrifugerer det opnåede bundfald, vasker det med lidt vand og tørrer det i et ventileret tørreskab ved 60°C .

Udbytte: 800 g lysegule krystaller (84% af det teoretiske udbytte beregnet på methioninet), smp.: 180°C .

b) N-(2-Amino-benzyl)-methionin.

I en tæt med en virksom omrører forsynet beholder opløser man 780 g N-(2-nitro-benzyl)-methionin i en blanding af 5 l methanol og 280 cm^3 30%'s natriumhydroxidopløsning. Derefter tilsætter man 100 g Raney-nikkel og hydrogenere under et tryk på ca. 70 g/cm^2 . Temperaturen stiger efterhånden til ca. 60°C og falder igen, når reaktionen er afsluttet. Man afkøler til stuetemperatur, frafiltrerer Raney-nikkelet og neutraliserer det methanoliske filtrat med eddikesyre. Aminoforbindelsen fælder langsomt ud. Man lader blandingen henstå natten over, centrifugerer, vasker med en lille mængde methanol og tørrer i et ventileret tørreskab ved 60°C . Udbytte: 570 g flødefarvede krystaller (80% af det teoretiske udbytte), smp. 217°C .

c) N-(2-Amino-3,5-dibrom-benzyl)-methionin.

Ved en temperatur på $60-65^{\circ}\text{C}$ opløser man 90 g N-(2-amino-benzyl)-methionin i 9 l eddikesyre. Efter tilsætning af 9 g jernpulver indfører man langsomt, idet man opretholder en temperatur på $62-65^{\circ}\text{C}$, en opløsning af 45 cm^3 brom i 500 cm^3 eddikesyre. Efter endt indføring omrører man i endnu 15 minutter, og derpå fjerner man eddikesyren ved destillation under lavt tryk til tørhed. Man opnår en tyk olie, hvortil man efter hinanden sætter 500 g knust is og en opløsning af 300 cm^3 natriumhydroxidopløsning, 30%'s, i 1,8 l vand. Man omrører 1/2 time, frafiltrerer det dannede jernhydroxid og neutraliserer filtratet med saltsyre. Det rå N-(2-amino-3,5-dibrom-benzyl)-methionin fælder ud i form af store orangefarvede krystaller. Man fracentrifugerer disse krystaller, vasker dem med vand og tørrer i et ventileret tørreskab ved 60°C , hvorved man opnår 150 g af råproduktet (kvantitativt udbytte).

Produktet renses ved chromatografi på silicagel (3 kg, til eluering benytter man følgende blanding: chloroform/methanol/ammoniak: 80/15/5). Den N-(2-amino-3,5-dibrom-benzyl)-methioninet indeholdende fraktion giver efter neutralisering med eddikesyre 40 g af dette produkt i ren tilstand (udbytte: 27,5% af det teoretiske, smp.: 209°C).

Eksempel 2

N-(2-Amino-3,5-dibrom-benzyl)-methionin-hydrochlorid.

150 g N-(2-amino-3,5-dibrom-benzyl)-methionin suspenderes i 650 ml isopropylalkohol. Under omrøring opvarmer man til 80°C, og under fortsat omrøring tilsætter man ca. 30 ml saltsyre af en vægtfylde på 1,18 g/cm³, således at man opnår en opløsning med pH 1. Man iagttager en overgang til væske efterfulgt af en øjeblikkelig bundfældning. Idet man rører videre, afkøler man til 10°C, fracentrifugerer det dannede bundfald og vasker det med 80 ml iskoldt isopropylalkohol. Efter tørring i et ved 60°C ventileret tørreskab opnår man 147 g af det ønskede produkt i form af hvide krystaller, som smelter ved 212°C.

Eksempel 3

N-(2-Amino-3,5-dibrom-benzyl)-methionin-maleat.

100 g N-(2-amino-3,5-dibrom-benzyl)-methionin opløstes varmt i 500 ml eddikesyre, hvorefter man under omrøring og opvarmning til kogning tilsætter 28 g maleinsyre. Efter opløsning afkøler man til 20°C under fortsat omrøring, fracentrifugerer det udfældede produkt, vasker med en lille mængde eddikesyre og derpå med isopropylsyre og opnår efter tørring i et ved 60°C ventileret tørreskab 107 g af det ønskede produkt i form af hvide krystaller, som smelter ved 205°C.

Eksempel 4

N-(2-Amino-3,5-dibrom-benzyl)-S-methyl-cystein.

a) N-(2-Nitro-benzyl)-S-methyl-cystein.

Denne forbindelse fremstilledes som i eksempel 1 a) ved omsætning af S-methyl-cystein og o-nitrobenzaldehyd i nærværelse af natriumhydroxidopløsning og efterfølgende reduktion af den Schiff'ske base, som opnåedes med natriumborhydrid. Smp.: 155°C.

b) N-(2-Amino-benzyl)-S-methyl-cystein.

Denne forbindelse fremstilledes efter den under 1 b) beskrevne fremgangsmåde ved reduktion af N-(2-nitro-benzyl)-S-methyl-cystein med hydrogen under tryk i nærværelse af natriumhydroxid og Raney-nikkel. Smp.: 193°C.

c) N-(2-Amino-3,5-dibrom)-benzyl-S-methyl-cystein.

Ved anvendelse af den i eksempel 1c) beskrevne fremgangsmåde opnår man det ønskede produkt ved omsætning af brom og N-(2-amino-benzyl)-S-methyl-cystein. Smp.: 240°C.

Eksempel 5

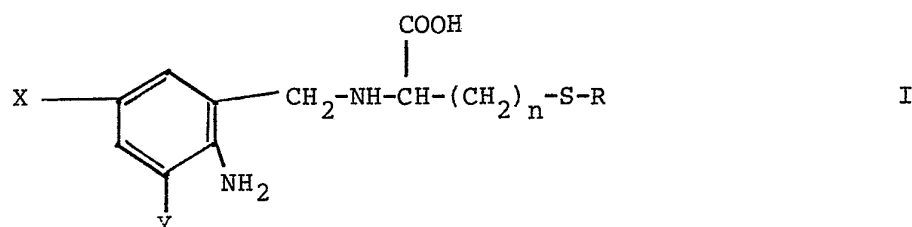
Lysinsalt af N-(2-amino-3,5-dibrombenzyl)-methionin.

Man opvarmer en blanding af 146 g (0,01 mol) L(+)-lysin-base og 412 g (0,01 mol) N-(2-amino-3,5-dibrombenzyl)-methionin i 200 cm³ 80%’s methanol under tilbagesvaling. Den varme opløsning filtreres for at fjerne uopløselige partikler.

Filtratet inddampes under formindsket tryk og optages to gange i 10 cm³ absolut alkohol, hvorefter der inddampes til tørhed. De opnåede krystaller tørres i vakuum. Man opnår 3,5 g af et hygroskopisk salt (udbytte 95%) uden tydeligt smeltepunkt. Der finder sønderdeling sted, og produktet bliver pastaagtigt ved ca. 100°C. Det er opløseligt i vand og alkohol.

P A T E N T K R A V

Analogifremgangsmåde til fremstilling af svovlholdige N-benzyl-aminosyrer med den almene formel I



hvor X og Y, der kan være ens eller forskellige, hver betegner et halogenatom,

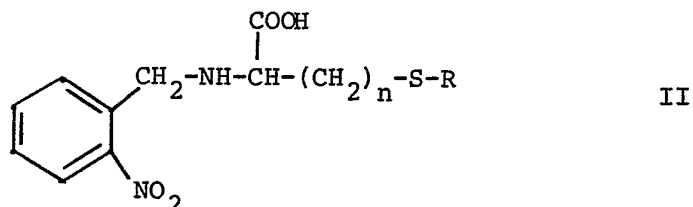
R betegner en alkylgruppe med 1-3 carbonatomer, og

n er et af de hele tal 1 og 2,

eller deres fysiologisk acceptable additionssalte med uorganiske eller organiske syrer eller deres fysiologisk acceptable salte med organiske eller uorganiske baser eller basiske aminosyrer, k e n d e t e g n e t ved, at man kondenserer o-nitrobenzaldehyd og en forbindelse med formelen



hvor R og n har de ovennævnte betydninger, og derefter direkte reducerer den dannede, ikke-isolerede Schiff'ske base i reaktionsmediet til opnåelse af et N-o-nitrobenzyleret derivat med formlen



som reduceres med molekylært hydrogen i nærværelse af en hydrogenringskatalysator, hvorpå den opnåede forbindelse med formel I, hvor X og Y dog begge er hydrogen, halogeneres til opnåelse af den tilsvarende forbindelse, hvor X og Y er halogen, fortrinsvis chlor eller brom,

hvorefter man, om ønsket, til fremstilling af additionssalte af de omhandlede forbindelser I med uorganiske eller organiske syrer eller salte med uorganiske eller organiske baser eller basiske aminosyrer omsætter den pågældende forbindelse med den ønskede syre, base eller aminosyre under sædvanlige betingelser.

Fremdragne publikationer:
