

¹⁴C-Markierung des neuen Antiasthmaticums Flezelastin

J. Engel, A. Bork, I. Fleischhauer, B. Kutscher und M. Liefänder

Frankfurt (Main), ASTA Medica AG

Eingegangen am 21. Januar bzw. 6. August 1993

Herrn Dr. Ansgar von Schlichtegroll zum 70. Geburtstag gewidmet

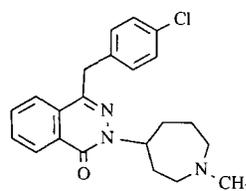
¹⁴C-Labeling of the New Antiasthmatic Flezelastine

Abstract. Flezelastine is a new phthalazinone derivative with antiasthmatic/antiallergic activity. For pharmacokinetic studies ¹⁴C-labeled flezelastine was synthesized starting with [7,8-

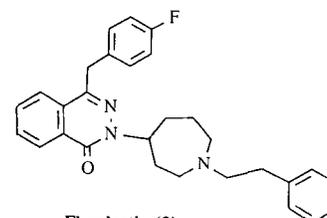
¹⁴C]-phthalic anhydride. In a convergent synthesis 1.5 g of double ¹⁴C-labeled flezelastine hydrochloride (ASTA code: D-18024) with a specific activity of 3 MBq/mg was obtained.

Von unserer Gruppe wird seit einigen Jahren die Substanzklasse der Phthalazinone im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antiasthmatica/Antiallergika bearbeitet. Mit Azelastin (**1**) [1] wurde ein Wirkstoff mit antihistaminischen [2], Mastzellen-stabilisierenden [3], bronchodilatierenden [4] sowie antientzündlichen Eigenschaften [5] gefunden. Neben einem starken H1-antagonistischen Effekt [2] hemmt Azelastin die Freisetzung der bronchokonstriktorischen Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ sowie des chemotaktischen Leukotriens LTB₄ und des pro-inflammatorischen Interleukins-1 [6]. Die bronchodilatierende Wirkung wird über den ausgeprägten selektiven intrazellulären Calcium-Antagonismus erklärt.

Mit Flezelastin (**2**) gelang uns die Synthese eines Phthalazinon-Derivates mit im Vergleich zu Azelastin verstärkter Bronchodilatation und größerer Inhibition der Leukotrien-Freisetzung bei herabgesetzter H1-antagonistischer Wirkung [7]. Der selektive intrazelluläre Calcium-Antagonismus wurde gegenüber Azelastin ebenfalls verstärkt. Somit sollte Flezelastin eine stärkere Beeinflussung des entzündlichen Geschehens beim Asthma-Patienten bewirken und darüber hinaus ein geringeres sedierendes Potential besitzen [8]. Flezelastin-Hydrochlorid (ASTA-Code: D-18024) befindet sich z. Zt. in der klinischen Erprobung. Für die Durchführung von Metabolismus- und Kinetik-Studien war die Synthese der ¹⁴C-markierten Substanz erforderlich. In Analogie zu Azelastin wurde eine Markierung im Phthalazinonteil des Moleküls gewählt [9].



Azelastin (1)

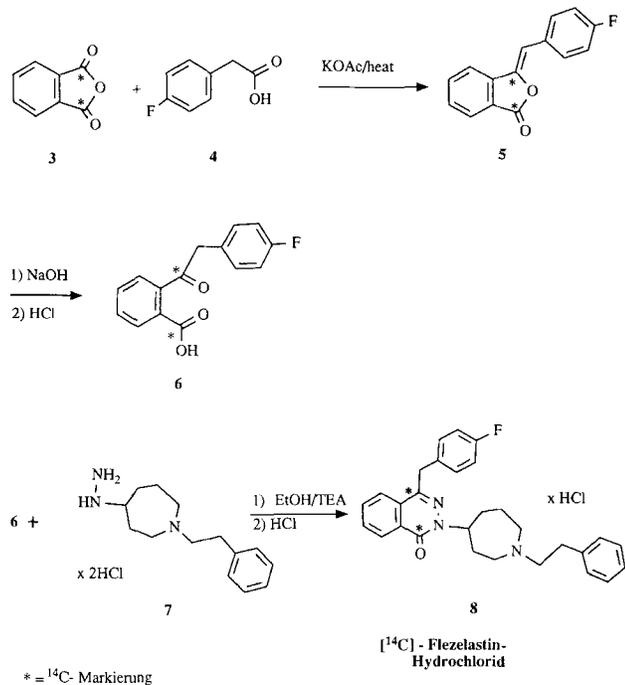


Flezelastin (2)

¹⁴C-Markierung

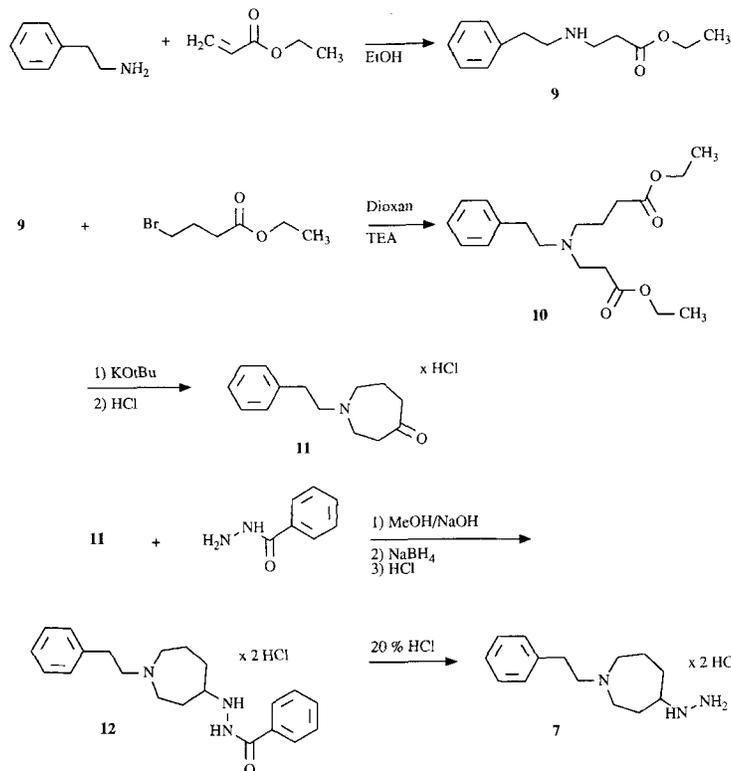
Für die ¹⁴C-Markierung im Phthalazinonteil bot sich das kommerziell erhältliche [7,8-¹⁴C]-Phthalsäureanhydrid (**3**) als Ausgangsmaterial an. In Analogie zur ¹⁴C-Azelastin-Synthese wird es mit 4-Fluorphenyl-essigsäure (**4**) in Gegenwart von Kaliumacetat zu [¹⁴C]-4-Fluorbenzylidenphthalid (**5**) umgesetzt [10]. Durch alkalische Hydrolyse und anschließendes Ansäuern erhielt man [¹⁴C]-2-(4-Fluorphenylacetyl)-benzoesäure (**6**). Die Kondensation von **6** mit 4-Hydrazino-1-(2-phenylethyl)-hexahydro-1H-azepin-Dihydrochlorid (**7**) ergab 4-[(4-Fluorphenyl)-methyl]-2-[hexahydro-1-(2-phenylethyl)-1H-azepin-4-yl]-1-(2H)-phthalazinon (vgl. [1b]). Die freie Base wurde in Dichlormethan gelöst und mit wäßriger Salzsäure in [¹⁴C]-Flezelastin-Hydrochlorid (**8**) überführt. Es wurden 1,5 g **8** mit einer Radioaktivitätsausbeute von 4.7 GBq (42 % bezügl. **3**) erhalten (Schema 1).

Die Ausgangsverbindung **7** ist gemäß Schema 2 erhältlich.



Schema 1

Durch nucleophile Addition von 2-Phenylethylamin an Acrylsäureethylester wurde 3-(2-Phenylethylamino)



Schema 2

propionsäureethylester (**9**) erhalten [11]. Die Reaktion mit 4-Brombuttersäureethylester führt zum N-Alkylierungsprodukt **10**, das dann – im Sinne einer Dieckmann-Kondensation – zum 7-Ring-Keton umgesetzt wurde. 1-(2-Phenylethyl)-hexahydro-1H-azepin-4-on wurde als Hydrochlorid **11** isoliert.

Zur Einführung der Hydrazinofunktion wurde das Keton **11** mit Benzoylhydrazin zur Schiff'schen Base umgesetzt und mit NaBH₄ zum Benzoylhydrazid-Dihydrochlorid **12** reduziert. Die Benzoylfunktion ließ sich in saurem Milieu abspalten, wobei **7** isoliert wurde.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktsapparatur nach Dr. Tottoli (Fa. Büchi) bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Elementaranalysen wurden mit dem Elementaranalyser der Fa. Carlo Erba, Modell 1106, ausgeführt. Die IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer-IR-Spektrometer 883 aufgenommen. Die Massenspektren wurden mit dem Spektrometer Finnigan-MAT 8230 (Direktverdampfung, Ionisation: EI und CI) gemessen. Für die ¹H-NMR-Spektren wurden die Spektrometer AM250 (250 MHz) und AMX 500 (500 MHz) der Fa. Bruker eingesetzt. Die ¹³C-NMR-Spektren wurden mit dem AM250-Spektrometer (Fa. Bruker) bei 62,9 MHz aufgenommen. Als innerer Standard wurde jeweils Tetramethylsilan verwendet.

3-(2-Phenylethylamino)-propionsäureethylester (**9**)

Zu 63,8 g (0,5 mol) 2-Phenylethylamin in 400 ml Ethanol wurden 50,1 g (0,5 mol) Acrylsäureethylester zugetropft. Man ließ

20 h bei Raumtemperatur rühren. Dann wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand im Vakuum destilliert.

Kp.: 116–118°C/0,3 Torr (vgl. [11])

Ausb.: 99 g (90 %)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,2 (t, 3H, –CH₃); 1,3 (br. s, 1H, NH); 2,5 (t, 2H, NH–CH₂); 2,7–2,95 (m, 6H, Ph–CH₂, NH–CH₂–CH₂–CO); 4,1 (q, 2H, OCH₂); 7,1–7,3 (m, 5 ar. H)

N-(2-Phenylethyl)-*N*-(2-carbethoxyethyl)-4-aminobuttersäureethylester (**10**)

225,8 g (1,0 mol) **9** und 111,3 g (1,1 mol) Triethylamin wurden in 250 ml Dioxan zum Sieden erhitzt. Dann ließ man innerhalb von 1 h 225,9 g (1,1 mol) 4-Brombuttersäureethylester zutropfen und erhitze weitere 8 h. Das entstandene Triethylammoniumbromid wurde abgesaugt und die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mit Wasser versetzt und viermal mit *t*-Butylmethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Ausb.: 304 g (91 %)

C ₁₉ H ₂₉ NO ₄ (335,4)	ber.: C 68,03 gef.: C 68,55	H 8,71 H 8,92	N 4,18 N 4,55
	/68,88	/9,00	/4,51

IR (Öl): 3000, 2820, 1730, 1180, 700 cm⁻¹

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,25 (t, 6H, 2x-CH₃); 1,7 (m, 2H, N–C–CH₂–C–CO–); 2,25 (t, 2H, N–C–C–CH₂–CO–); 2,4 (t, 2H, N–C–CH₂–CO–); 2,5 (t, 2H, N–CH₂–C–CO); 2,7 (m, 4H, Ph–CH₂–CH₂); 2,8 (t, 2H, N–CH₂–C–CO); 4,1 (m, 4H, 2x-O–CH₂); 7,1–7,3 (m, 5 ar. H)

1-(2-Phenylethyl)hexahydro-1*H*-azepin-4-on-Hydrochlorid (**11**)

177 g (0,50 mol) des Diesters **10**, gelöst in 100 ml Xylol, wurden zu der siedenden Lösung von 63 g (0,55 mol) Kalium-*t*-butanolat in 500 ml Xylol getropft. Gleichzeitig wurde der entstehende Alkohol abdestilliert. Nach beendeter Zugabe wurde 1 h weiterdestilliert. Die noch warme Reaktionslösung wurde mit wäßriger HCl (ca. 24 %) mehrmals extrahiert. Nach Einengen der vereinigten salzsauren Extrakte wurde der Rückstand mehrmals mit *n*-Butanol versetzt, wieder eingengt und schließlich mit *n*-Propanol ausgerührt.

Rohausbeute: 124,5 g

Das Rohprodukt enthielt noch anorganische Bestandteile und wurde aus 2-Propanol umkristallisiert.

Ausb.: 65,7 g (49 %)

Fp. 196–197°C

C ₁₄ H ₁₉ NO × HCl (253,8)	ber.: C 66,26 gef.: C 66,09	H 7,94 H 8,07	N 5,52 N 5,58
	/66,19	/8,52	/5,54

MS (EI): *m/e* = 217 (M⁺, C₁₄H₁₉NO); 126 (M⁺-Benzyl; 100 %)

MS (CI): *m/e* = 218 ([M+H]⁺, 100 %)

IR (KBr): 2940, 2580, 1720 (C=O), 1460, 750, 700 cm⁻¹

¹H-NMR (500 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 2,0 (m, 1H); 2,2 (m, 1H); 2,5–2,75 (m, 3H); 3,1 (m, 2H); 3,2–3,4 (m, 4H); 3,5 (m, 1H); 3,65 (m, 2H); 7,2–7,4 (m, 5 ar. H); 11,75 (br. s, 1H, NH⁺)

¹³C-NMR (62,9 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 19,04, 29,29, 38,45, 41,35, 48,47, 55,34, 56,39 (jeweils 1 C); 126,62 (1 ar. C); 128,47, 128,59 (jeweils 2 ar. C); 136,95 (1 ar. C); 209,14 (C=O)

1-(2-Phenylethyl)-hexahydro-1*H*-azepin-4-yl-benzoylhydrazid-Dihydrochlorid (**12**)

14,7 g (0,108 mol) Benzoylhydrazin und 26,7 g (0,105 mol) Keton **11** wurden in 125 ml Methanol bei Raumtemperatur 4 h gerührt. Dann wurde eine Lösung von 5 g (0,125 mol) NaOH in 70 ml Methanol unter Eiskühlung zugegeben. Nach 15 min. Rühren gab man innerhalb von 30 min – ebenfalls unter Eiskühlung – 6,2 g (0,162 mol) NaBH₄ portionsweise hinzu und rührte 1 h bei 0–5°C sowie 4 h bei Raumtemperatur nach. Die Reaktionslösung wurde unter Eiskühlung langsam mit 50 ml isopropanolischer HCl (ca. 4 m) aufgenommen (heftige Reaktion!). Man saugte den Niederschlag ab und engte die Lösung am Rotationsverdampfer ein. Der Rückstand wurde mit H₂O aufgenommen und mit *t*-Butylmethylether extrahiert (Entfernung unpolarer Verunreinigungen). Die wäßrige Phase wurde mit NH₃ (25 %ig) versetzt und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen lieferten nach dem Trocknen und Einengen einen viskosen Rückstand, der in Aceton gelöst und mit isopropanolischer HCl versetzt wurde. Der Niederschlag wurde abgesaugt, gewaschen und getrocknet (55°C/200 Torr).

Ausb.: 28,3 g (65 %)

Fp.: 235–237°C

C ₂₁ H ₂₇ N ₃ O × 2HCl (410,40)	ber.: C 61,46 gef.: C 61,99	H 7,12 H 7,30	N 10,24 N 10,32
	/62,07	/7,25	/10,33

IR (KBr): 3400, 2940, 1680, 700 cm⁻¹

¹H-NMR (250 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 1,7–2,5 (m, 6H); 3,0–3,8 (m, 9H); 7,15–7,4 (m, 5 ar. H); 7,45–7,7 (m, 3 ar. H); 7,9–8,05 (m, 2 ar. H); 9,4 (br. s, NH); 11,4 (br. s, NH); 11,85 (d, NH)

4-Hydrazino-1-(2-phenylethyl)-hexahydro-1*H*-azepin-Dihydrochlorid (**7**)

37,4 g (0,09 mol) **12** wurden in 65 ml Wasser suspendiert. Nach der Zugabe von 150 ml konz. HCl (36 %) wurde das Reaktionsgemisch 4,5 h unter Rühren zum Sieden erhitzt. Dann kühlte man es im Eisbad und saugte die ausgefallene Benzoesäure ab. Die salzsaure Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand zweimal mit *n*-Butanol versetzt und wieder eingengt. Das ölig-viskose Rohprodukt wurde aus ca. 500 ml Ethanol umkristallisiert. Die abfiltrierten Kristalle wurden mit *t*-Butylmethylether gewaschen und bei 60°C/200 Torr getrocknet.

Ausb.: 23,5 g (84 %)

Fp.: 149–153°C

C ₁₄ H ₂₃ N ₃ × 2HCl (306,29)	ber.: C 54,89 gef.: C 53,88	H 8,23 H 8,25	N 13,72 N 13,51
	/53,89	/9,00	/13,41

¹H-NMR (500 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 1,5–2,5 (m, 6H); 3,0–3,7 (m, 9H); 5,0 (br. s, NH); 7,2–7,4 (m, 5 ar. H); 9,4 (br. s, NH); 10,4 (br. s, NH); 11,3 (br. s, NH)

Der Austausch der stickstoffgebundenen Protonen erlaubt keine aussagekräftige Integration des Spektrums.

[¹⁴C]-2-(4-Fluorphenylacetyl)-benzoesäure (**6**)

5,55 mmol (849 mg) [7,8-¹⁴C]-Phthalsäureanhydrid (**3**) mit einer Aktivität von 11,1 GBq (Firma Amersham, Braunschweig) wurden mit 1,20 mmol (178 mg) Phthalsäureanhydrid, 7,30 mmol (1125 mg) 4-Fluorphenyllessigsäure (**4**) und 0,70 mmol (70 mg) Kaliumacetat 3 h auf 220–235°C erhitzt.

Die erstarrte, noch warme Schmelze wurde mit 10 ml 5 m Natronlauge versetzt und 2,5 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde filtriert und das alkalische Filtrat in eine Vorlage von 20 ml 10%iger Salzsäure getropft. Die Säure **6** wurde abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und im Vakuum bei 45–50°C getrocknet.
Ausb.: 1200 mg (ca. 68,5% bez. **3**).

[¹⁴C]-Flezelastin-Hydrochlorid (**8**)

4,8 mmol 2-(4-Fluorphenylacetyl)-benzoesäure (1200 mg **6** + 40 mg nicht markierte Säure) und 5,3 mmol (1614 mg) Hydrazin-Derivat **7** wurden in 50 ml Ethanol p. a. gelöst, mit 11,3 mmol (1,6 ml) Triethylamin versetzt und 4 h unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand mit 30 ml Wasser und 0,5 ml 25%iger Ammoniaklösung versetzt und 4-mal mit insgesamt 100 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 15 ml Wasser überschichtet. Man tropfte 5 ml 10%ige Salzsäure zu und mischte 15 min durch kräftiges Rühren. Nach Trennung der Phasen wurde die wäßrige Lösung mit 20 ml Dichlormethan geschüttelt, die vereinigten organischen Phasen durch Zugabe von Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der feste Rückstand wurde in 15 ml 2-Propanol gelöst, wieder eingeeengt und nochmals in 5 ml 2-Propanol bei erhöhter Temperatur gelöst. Die Lösung wurde mit wenigen Impfkristallen Flezelastin-Hydrochlorid versetzt und ca. 15 h bei 4°C aufbewahrt. Die ausgefallenen Kristalle wurden abgesaugt, mit wenig 2-Propanol gewaschen und im Vakuum bei 60–65°C getrocknet.

Ausb.: 1557 mg (66% bez. **6**).

Gesamtaktivitätsausbeute: 4,7 GBq (42,3% d. Th.)

Das Derivat enthielt keine radiochemischen Verunreinigungen.

Spez. Aktivität: 3 MBq/mg = 1,4856 GBq/mmol.

Die DC-Bestimmung (CHCl₃:CH₃OH:NH₃ = 95:4:1) ergab einen chem. Gehalt von 92%.

Literatur

- [1] a) M. Molliere, J. Engel, *Drugs of Today* **23** (1987) 203;
b) G. Scheffler, J. Engel, B. Kutscher, W. S. Sheldrick, P. Bell, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **321** (1988) 205
- [2] H.-J. Zechel, N. Brock, D. Lenke, U. Achterrath-Tuckermann, *Arzneim. Forsch.* **31** (II) (1981) 1184
- [3] N. Chand, J. Pillar, W. Diamantis, J. L. Perhach, R. D. Sofia, *Eur. J. Pharmacol.* **96** (1983) 277
- [4] J. P. Kemp, E. O. Meltzer, H. A. Orgel, *J. Allergy Clin. Immunol.* **79** (1987) 893
- [5] a) U. Achterrath-Tuckermann, C. H. Weischer, I. Szelenyi, *Pharmacology* **36** (1988) 265;
b) I. Paegelow, H. Werner, I. Szelenyi, *Agents and Actions* **32** (1991) 56
- [6] I. Szelenyi, U. Achterrath-Tuckermann, J. Schmidt, E. Minker, I. Paegelow, *Agents and Actions (Suppl.)* **34** (1991) 295
- [7] J. Engel, G. Scheffler, B. Kutscher, D. Sofia, I. Szelenyi, U. Achterrath-Tuckermann (Vortragsabstract DA 23), *Arch. Pharm. (Weinheim)* **322** (1989) 665
- [8] I. Szelenyi, persönliche Mitteilung
- [9] G. Scheffler, H. Beckel, E. Schaumlöffel, *Arzneim.-Forsch.* **33** (II) (1983) 1515
- [10] R. Weiss, *Org. Syn., Coll. Vol.* **2** (1943) 61
- [11] H. Dorn, A. Zubek, G. Hilgetag, *Chem. Ber.* **98** (1965) 3377

Korrespondenzanschrift:

Dr. I. Fleischhauer

ASTA Medica Aktiengesellschaft

Weismüllerstraße 45

D-60314 Frankfurt am Main