(19) Országkód:
HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS TALÁLMÁNYI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:
211 271 A9

(21) A kérelem ügyszáma: P/P 00421
(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 23.
(30) Elsőbbségi adatok:
93/12669 1993. 06. 18. GB

Az alapul szolgáló szabadalom
száma: 94/4346 országkódja: ZA
Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak
az oltalmi idő számítása szempontjából
figyelembe veendő kezdő napja: 1994. 06. 17.
Az oltalom e naptól számított 20 évig tartható fenn.

A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(51) Int. Cl.[6]
C 07 D 233/64
A 61 K 31/41

(72) Feltalálók:
Karjalainen, Arja Leena, Oulu (FI)
Virtanen, Raimo Einari, Rusko (FI)
Parhi, Seppo Sulevi Lennart, Kiviniemi (FI)
Karjalainen, Arto Johannes, Oulu (FI)
Eloranta, Maire Marjatta, Oulu (FI)
Haapalinna, Antti Sakari, Turku (FI)

(73) Szabadalmas:
Orion-Yhtymä Oy, Espoo (FI)

(74) Képviselő:
DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Új optikai izomerek**

Az átmeneti oltalom az 1., 4. és 7. igénypontokra vonatkozik.

A leírás terjedelme: 8 oldal (ezen belül 4 lap ábra)

HU 211 271 A9

Új optikai izomerek

A találmány 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol új optikai izomerjeire, ezek gyógyászatilag elfogadható sóira, továbbá az említett vegyületek alkalmazására és előállítására vonatkozik. Mindkét optikai izomer hatásos kognitív rendellenességek kezelésére, bár némileg eltérő farmakológiai profillal rendelkeznek. A két izomer közül az (–)-enantiomer az előnyösebb, mert szélesebb terápiás felhasználási területű, mint a (+)-enantiomer. Így rendkívül erős antagonista hatású az α_2-adrenoceptorok vontkozásában bármiféle α_1-agonizmus nélkül, ugyanakkor a (+)-enantiomer csak közepesen antagonista hatású az α_2-adrenoceptorok vonatkozásában, ugyanakkor teljes mértékben α_1-agonista. Mindkét enantiomernek jó a perorális biológiai hozzáférhetősége.

Korábban például a 183 492, 247 764 és 372 954 számú európai közrebocsátási iratokban ismertettek értékes α_2-adrenoceptor antagonistákat. A 91/18886 számú PCT-közrebocsátási iratban bizonyos indán-imidazol-származékok, különösen az atipamezole alkalmazását ismertetik korral együttjáró memóriaromlás és más kognitív rendellensségek kezelésére. A PCT/FI92/00349 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben olyan új, hosszan tartó hatású 4-(5)-szubsztituált indán-imidazol-származékok csoportját ismertetik, amelyek felhasználhatók kognitív rendellenességek kezelésére. Ezeknek az indán-imidazol-származékoknak az egyike a 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol racemátja, mely vegyület az indángyűrű 2-helyzetében aszimmetrikus szénatomot tartalmaz, miként ez az (I) képletből kitűnik.

A 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol optikailag aktív enantiomerjei előállíthatók például úgy, hogy racém 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazolt diasztereoizomerek keverékévé alakítunk, majd ezeket frakcionált kristályosítással szeparáljuk. Tekintettel arra, hogy a 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol egy bázis, átalakítható diasztereomer sók keverékévé egy optikailag aktív savval, előnyösen L-(+)- vagy D-(–)-bórkősavval való reagáltatás útján. A diasztereoizomerek szeparálhatók ismételt kristályosítással, például vízből.

A diasztereomerek szeparálását követően a savaddíciós sók visszaalakíthatók a szabad bázisokká úgy, hogy vizes oldatukat meglúgosítjuk egy bázissal, például nátrium-hidroxiddal, majd a felszabadított bázist egy megfelelő szerves oldószerrel extraháljuk.

A 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol (–)- és (+)-enantiomerjei szerves vagy szervetlen savakkal reagálnak a megfelelő savaddíciós sókat képezve, amelyek ugyanazon terápiás hatásúak, mint a bázisok. Így az említett enantiomerek sokféle gyógyászatilag hasznosítható savaddíciós sókat, például kloridokat, bromidokat, szulfátokat, nitrátokat, foszfátokat, szulfonátokat, formiátokat, tartarátokat, maleátokat, citrátokat, benzoátokat, szalicilátokat és aszkorbátokat képezhetnek.

A 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol racemátja előállítható például úgy, hogy 4-(2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol-hidrokloridot nitrálunk egy erős nitrálószerrel, például karbamid-nitráttal kénsav jelenlétében, majd a nitrovegyületet a megfelelő aminovegyületté redukáljuk, például katalitikus hidrogénezés útján, katalizátorként platina-dioxidot vagy szénhordozós palládiumot használva. Az amino-szubsztituált vegyület azután tovább alakítható a megfelelő diazónium-fluorboráttá nátrium-nitrittel fluor-bórsavban csökkentett hőmérsékleten. A diazónium-fluor-borát ezt követően termikusan lebontható a 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol racemátjává. A találmány szerinti vegyületek beadhatók enterálisan vagy parenterálisan. Kognitív rendellenességek kezelése esetében az előnyös napi dózis 0,1 mg/kg és 10 mg/kg, különösen előnyösen 0,2 mg/kg és 1 mg/kg közötti.

Mindkét enantiomer esetében az akut toxicitás (LD_{50}) körülbelül 100 mg/kg egereknél perorálisan és körülbelül 50 mg/kg patkányoknál.

A találmány szerinti vegyülettel jellegzetesen együtt alkalmazott gyógyászati segédanyagok szilárdak vagy folyékonyak lehetnek, és a tervezett beadás módjától függően választandók meg. A gyógyászati készítményekhez a segédanyagok megválasztása rutinfeladat az adott területen járatos szakember számára.

1. α-adrenoceptor szelektivitás in vitro

Az α_2-antagonizmust patkányokból elkülönített „vas deferens" preparátum elektromosan ingerelt prosztatikus részén határozzuk meg [Virtanen és munkatársai: Arch. Int. Pharmacodyn et Ther. 297, 190-204 (1989)]. Ennél a módszernél α_2-agonista (detomidine) blokkolja az elektromosan ingerelt izomösszehúzódásokat és az α_2-antagonista hatása úgy állapítható meg, hogy az agonistát megelőzően adagoljuk és ezután meghatározzuk pA_2-értékét. Referenciaanyagként az α_2-antagonistaként ismert atipamezole-t használjuk.

Egy adott antagonistának az α_1- és α_2-receptorok közötti szelektivitásáról információ nyerése céljából meghatározzuk az α_1-receptorok vonatkozásában kifejtett gátló vagy stimuláló képességét, éspedig patkánytól származó „vas deferens" izolált mellékhere-részén. Az α_1-antagonizmus meghatározása céljából fenil-efrinnel izomösszehúzódást váltunk ki, majd a vizsgált vegyület pA_2-értékét a korábbiakban említett módon meghatározzuk. Az α_1-agonista hatást pD_2-értékként (a vizsgált vegyületnek a maximális összehúzódás 50%-át kiváltó moláris koncentrációjának a negatív logaritmusa) adjuk meg. A kapott eredményeket az 1. táblázatban adjuk meg.

1. táblázat

Racém 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol és enantiomerjei szelektivitása atipamezole-lal összehasonlításban

Kísérleti vegyület száma-	α_2-antagonizmus (pA_2 detomidinnel szemben)	α_1-antagonizmus (pA_2 fenil-efrinnel szemben)	α_1-agonizmus (pD_2)
(–)-enantiomer	9,1	6,7	nincs hatás
(+)-enantiomer	7,9	nem lett mérve	6,0 teljes agonista

Kísérleti vegyület száma-	α_2-antagonizmus (pA_2 detomidinnel szemben)	α_1-antagonizmus (pA_2 fenil-efrinnel szemben)	α_1-agonizmus (pD_2)
racemát	8,0	nem lett mérve	5,5 részleges agonista
Atipamezole	8,0	5,0	nincs hatás

2. Memóriára kifejtett hatás

Az (–)-enantiomernek a tanulásra és emlékezésre gyakorolt hatását patkányokon lineáris útvesztő feladatban tanulmányozzuk. A lineárlis útvesztő módosított változata a patkányokon az emlékezet tesztelésére általánosan alkalmazott sugaras elrendezésű (radiális) útvesztőnek. (–)-Enantiomer-hidrokloridot (0,1 mg/kg dózisban szubkután) desztillált vízben feloldunk. Desztillált vizet kontrollként is használunk. Minden injektálást 1 ml/kg térfogatban végzünk.

Kísérleti berendezés: az útvesztő alapja fából készül, alakja két egymáshoz csatlakozó keresztnek felel meg. Az útvesztő nyele (kiindulási szakasz) 90 cm hosszú és 12 cm széles. Az útvesztő további öt szakasza (célszakaszok) 50 cm hosszú és 12 cm széles. Négy célszakasz merőleges mind a kiindulási, mind az ötödik, a kiindulásival szemközt elhelyezkedő célszakaszra. A nyél és a célszakaszok mindegyik oldalát 2 cm-es perem határolja. Mindegyik célszakasz végén 1 cm mély, 3 cm átmérőjű lyuk található, mely etetőként szolgáló. A startegységet (20×20 cm) a nyaktól guillotine-ajtó választja el. Az ajtó 12 cm magas, 7 cm széles. Az ajtó kerete 20 cm magas, 20 cm széles. Az útvesztő a padló szintje felett 31 cm-re helyezkedik el egy alacsony megvilágítású kísérleti szobában, mely a kísérleti berendezésen kívül más tárgyakat tartalmaz. A célszakaszok végére elhelyezett etetőben 3 db labdacsot helyezünk el jutalomként (45 mg súlyú labdacsok, a Bio Serve Inc. termékei).

Eljárás: a tanulást megelőző két napban az állatokat táplálékmegvonásnak vetjük alá, mely a kiindulási tömeg 90%-ára való csökkentést eredményez. Ezeken a napokon végezzük az állatok kézhez szoktatását (napi háromszori kézbevétel), továbbá a kísérleti szobához és a jutalomtáplálékhoz való hozzászoktatását. A második napon végezzük az üres útvesztőhöz való szoktatást: azonos ketrecből kivett 3–5 állatot helyezünk ugyanabban az időben az útvesztőbe 10 percre. A harmadik napon a célszakasz etetőjét megtöltjük táplálékjutalommal, és a tanulási próbát (egyszerre egy állattal) elvégezzük. A patkányt a hatóanyag vagy a desztillált víz beadása után 60 perccel a startegységbe helyezzük. 10 másodperc elteltével kinyitjuk az ajtót és a patkány mindaddig explorálhat az útvesztőben, míg a táplálékjutalmat meg nem találja. A kísérlet alatt a már bejárt célszakaszokba történő újbóli belépéseket hibákként számítjuk. Feljegyezzük a valamennyi táplálékjutalom megtalálására és a helyes választásokra fordított időt, az első hiba elkövetéséig. A tanulás ezen szakaszában minden állat legalább 5 percet tölthet az útvesztőben. A tényleges emlékezet és tanulás vizslágatot az ezt követő napon kezdjük és négy napon át folytatjuk (1–4. kísérleti napon). A patkányokkal egyenként 8 tanulási próbát végzünk, kettőt naponta. A próbák közötti idő 50 perc. A hatóanyagot vagy a desztillált vizet az aznapi első próba kezdete előtt 30 perccel adjuk be. A tesztelési próbák minden másban megfelelnek a tanítási próbának. Mindkét csoportban 20 állat van.

Statisztikai feldolgozás: az eredményeket az átlag hiba/próba, átlag helyes választás/próba és átlag idő/próba (másodperc) értékekben fejezzük ki. A hatóanyagnak és a vizsgálati napnak a tanulásra és emlékezetre gyakorolt hatásának összehasonlítására többszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmazunk.

Eredmények: az (–) enantiomernek a tanulásra és emlékezetre gyakorolt hatását az 1., 2. és 3. ábrán mutatjuk be. A hatóanyag a hibázások számának csökkenését eredményezte, azaz csökken a már meglátogatott célszakaszokba történő újrabelépések száma (1. ábra). Az (–)-enantiomer növeli a kísérletben az első hiba előtti helyes választások számát is (2. ábra). Ezek alapján feltételezhető a hatóanyagnak a munkamemóriára és a koncentrálási képességre a kísérlet során gyakorolt hatása. A hatóanyag a feladatmegoldáshoz szükséges időt is csökkenteni hajlamos (3. ábra). Ez tekinthető a döntésekhez, a jelen esetben a helyes választásokhoz szükséges idő vonatkozásában kifejtett hatásnak. A hibázások száma és a feladat megoldására fordított idő csökkent és a helyes választások száma nőtt kísérletről kísérletre a kontroll csoportban is, ami a kísérletek során megnyilvánuló tanulási hatásra utal. A statisztikai elemzés nem mutat csoport versus nap interakciót, ami azt jelenti, hogy az (–)-enantiomer hatása nem függ az adott kísérlettől. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az (–)-enantiomer felnőtt patkányokban serkentőleg hat a tanulásra és az emlékezetre.

3. Optikailag aktív izomerek előállítása

Racém 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol

58 ml tömény kénsavat –10 °C-ra lehűtünk, majd hozzáadjuk 13,8 g (0,0625 mól) 4-(2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol-hidroklorid (4 689 339 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, feltalálók Karjalainen, A. J. és társai) és 7,70 g (0,0625 mól) karbamid-nitrát keverékét kis adagokban –10 °C-on. A reakció befejeződése után az oldatot jégre öntjük. Az oldatot meglúgosítjuk, majd etil-acetáttal háromszor extraháljuk. A szerves extraktumokat egyesítjük, szárítjuk és szárazra pároljuk. Így 13,0 g (91 5) 4-(2,3-dihidro-5-nitro-1H-indén-2-il)-1H-imidazolt kapunk.

A 4-(2,3-dihidro-5-nitro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol 4-(5-amino-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazollá való redukálását úgy végezzük el, hogy 11,7 g (0,0512 mól) 4-(2,3-dihidro-5-nitro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol 100 ml etanollal készült oldatához hozzáadunk 1,0 g 10% fémtartalmú szénhordozós palládium-katalizátort, majd a keveréket hidrogén-atmoszférában szobahőmérsékleten rázzuk. Amikor a redukció befejeződik, a katalizátort eltávolítjuk. A szűrletet bepárol-

juk, amikor 9,63 g (94%) mennyiségben 4-(5-amino-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazolt kapunk. A terméket flashkromatográfiás tisztításnak vetjük alá, metilén-klorid és metanol 9,5:0,5 térfogatarányú elegyével eluálva.

Jeges-sós fürdőben elhelyezünk egy olyan lombikot, amely 120 ml 48 tömeg%-os vizes fluor-bórsav-oldatot és 9,50 g (0,0475 mól) 4-(5-amino-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazolt tartalmaz, majd 0 °C-ra lehűtjük. Ezután lassan beadagoljuk 3,30 g (0,0478 mól) nátrium-nitrit 10 ml vízzel készült oldatát, miközben a hőmérsékletet 0 °C-on tartjuk. A reakcióelegyet ezután 0 °C-on egy további órán át, majd szobahőmérsékleten egy további órán át keverjük. A reakcióelegyet ezt követően toluollal kétszer szárazra pároljuk. A hőbontást elektromos fűtőköpennyel fűtött lombikban hajtjuk végre. Amikor a bór-trifluorid fehér színű füstjének képződése befejeződik, a melegítést megszüntetjük. A nyers terméket metanolban feloldjuk, az oldatot szűrjük és szárazra pároljuk. A nyers 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol hozama 9,51 g (99%). A terméket flash-kromatográfiás tisztításnak vetjük alá, eluálószerként metilén-klorid és metanol 9,5:0,5 térfogatarányú elegyét használva.

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 2,96–3,08 (2H, m, egy H-1 és egy H-3), 3,19–3,27 (2H, m, egy másik H-1 és egy másik H-3), 3,68 (1H, kvintett, ^3JHH 8,3 Hz, H-2), 6,80–6,86 (1H, m, H-6), 6,83 (1H, s, im-5), 6,92 (1H, dd, ^3JHF 8,9 Hz, ^4JHH 2,4 Hz, H-4), 7,16 (1H, dd, ^3JHH 8,1 Hz, ^4JHF 5,3 Hz, H-7), 7,59 (1H, s, im-4)

Enantiomerek szeparálása

60 °C-on 2,5 ml vízben feloldunk 0,44 g (0, 00293 mól) D-(–)-borkősavat. Az oldathoz 60 °C-on hozzáadunk a (I) képletű 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol racemátjából 1,03 g-ot (0,00509 mól) és 178 µl tömény sósavat. A reakcióelegyet 60 °C-on addig keverjük, míg tiszta oldatot kapunk. Az oldatot lassan lehűlni hagyjuk. A kivált csapadékot összegyűjtjük, majd vízből ötször átkristályosítjuk, a (–)-enantiomernek D-(–)-borkősavval alkotott, 186-187 °C olvadáspontú sóját kapva.

A (–)-enantiomernek D-(–)-borkősavval alkotott adduktját 60 °C hőmérsékleten vízben feloldjuk, majd etil-acetátot adagolunk. Ezután az oldatot meglúgosítjuk (pH 10) híg nátrium-hidroxid-oldattal. Az etil-acetátos fázist elválasztjuk, és a vizes fázist kétszer etil-acetáttal extraháljuk. Az egyesített szerves fázisokat vízzel mossuk. Az etil-acetátot elpárologtatjuk szárazra párlással és a maradékot etil-acetátból kristályosítjuk. A terméket vákuumszűréssel szűrjük, majd hideg etil-acetáttal mossuk. Olvadáspontja 139 °C (DSC), 20 °C-on metanolos oldatban fajlagos forgatóképessége –3,7° (c = 20 mg/ml).

Az (–)-enantiomer bázist feloldjuk etil-acetátban és Millipore segítségével szűrjük. A szűrletet megsavanyítjuk (pH 1) etil-acetáttal készült vízmentes sósavoldattal, és –10 °C-ra lehűtjük. A csapadékot vákuumszűréssel kiszűrjük, és etil-acetáttal mossuk. Etil-acetátból végzett átkristályosításkor a (–)-4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol hidrokloridsóját kapjuk fehér kristályos csapadékként, amelynek olvadáspontja 191 °C (DSC); kromatográfiás tisztasága 99,8% (HPLC); optikai tisztasága 99,9% (HPLC); fajlagos forgatóképessége szobahőmérsékleten vizes oldatban –3,5° (c = 20 mg/ml).

A (+)-enantiomer ugyanúgy rezolválható, mint a (–)-izomer, rezolválószerként L-(+)-borkősavat használva, amikor a (+)-enantiomernek az L-(+)-borkősavval alkotott, 187–189 °C olvadáspontú adduktját kapjuk. A bázist és a hidrokloridsót (olvadáspont 190 °C) a korábbiakban ismertetett módon állítjuk elő. A hidrokloridsó kromatográfiás tisztasága 98,7% (HPLC); optikai tisztasága 99,6% (HPLC); fajlagos forgatóképessége, szobahőmérsékleten, vizes, oldatban, +3,2° (c = 20 mg/ml).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol (–)-enantiomerje, valamint ennek gyógyászatilag elfogadható sói.

2. Eljárás a 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol (–)-enantiomerjének előállítására, *azzal jellemezve*, hogy racém 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazolt diasztereomer sókeverékké alakítunk optikailag aktív savval való reagáltatás útján, és ezután a diasztereomer só keverékét szeparáljuk frakcionált kristályosítással, és a 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol szeparált (–)-enantiomer-sóját szabad bázissá alakítjuk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az optikailag aktív sav D-(–)-borkősav.

4. A 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol (+)-enantiomerje, valamint ennek gyógyászatilag elfogadható sói.

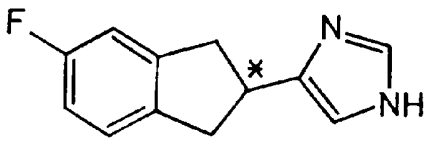
5. Eljárás a 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol (+)-enantiomerjének előállítására, *azzal jellemezve*, hogy racém 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazolt diasztereomer sókeverékké alakítunk optikailag aktív savval való reagáltatás útján, és ezután a diasztereomer só keverékét szeparáljuk frakcionált kristályosítással, és a 4-(5-fluor-2,3-dihidro-1H-indén-2-il)-1H-imidazol szeparált (+)-enantiomer-sóját szabad bázissá alakítjuk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az optikailag aktív sav L-(+)-borkősav.

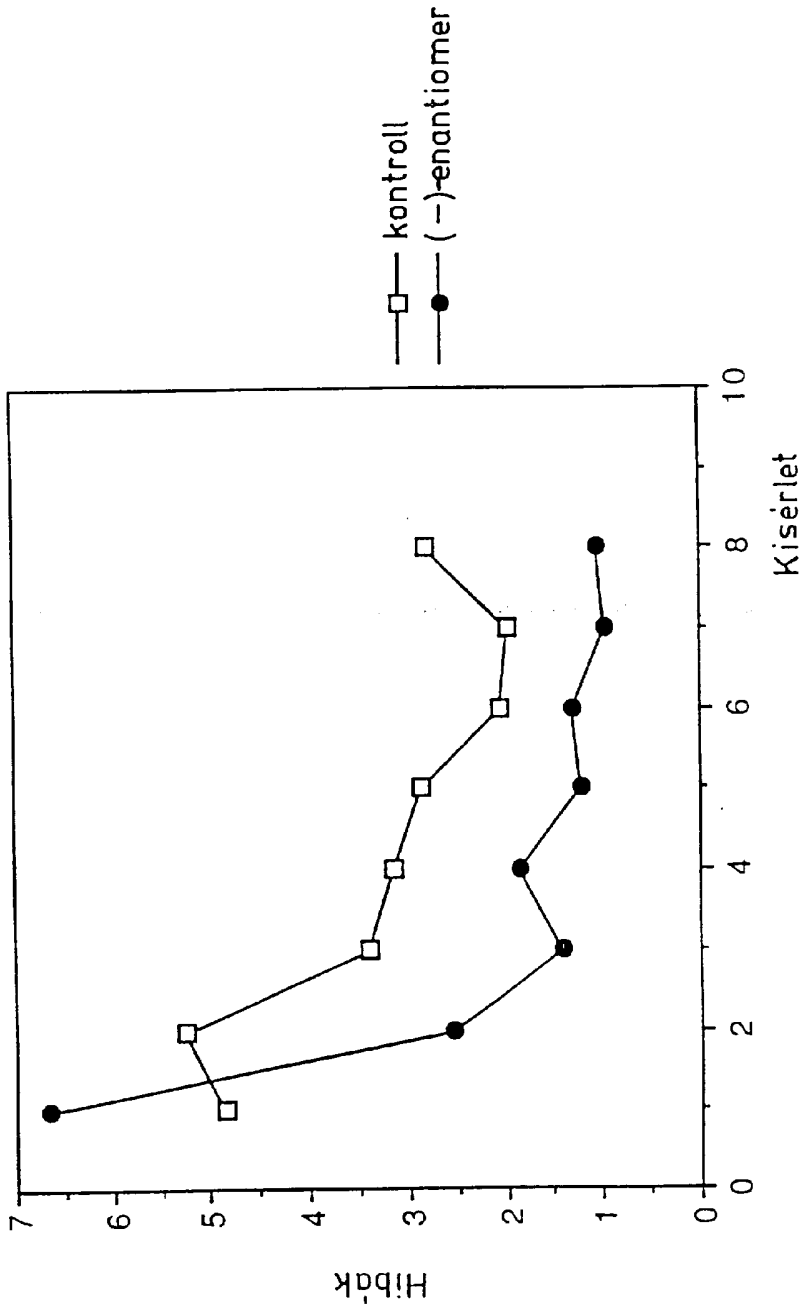
7. Új vegyület, lényegében az itt ismertetettek szerint.

8. Új módszer egy vegyület előállítására, lényegében az itt ismertetettek szerint.

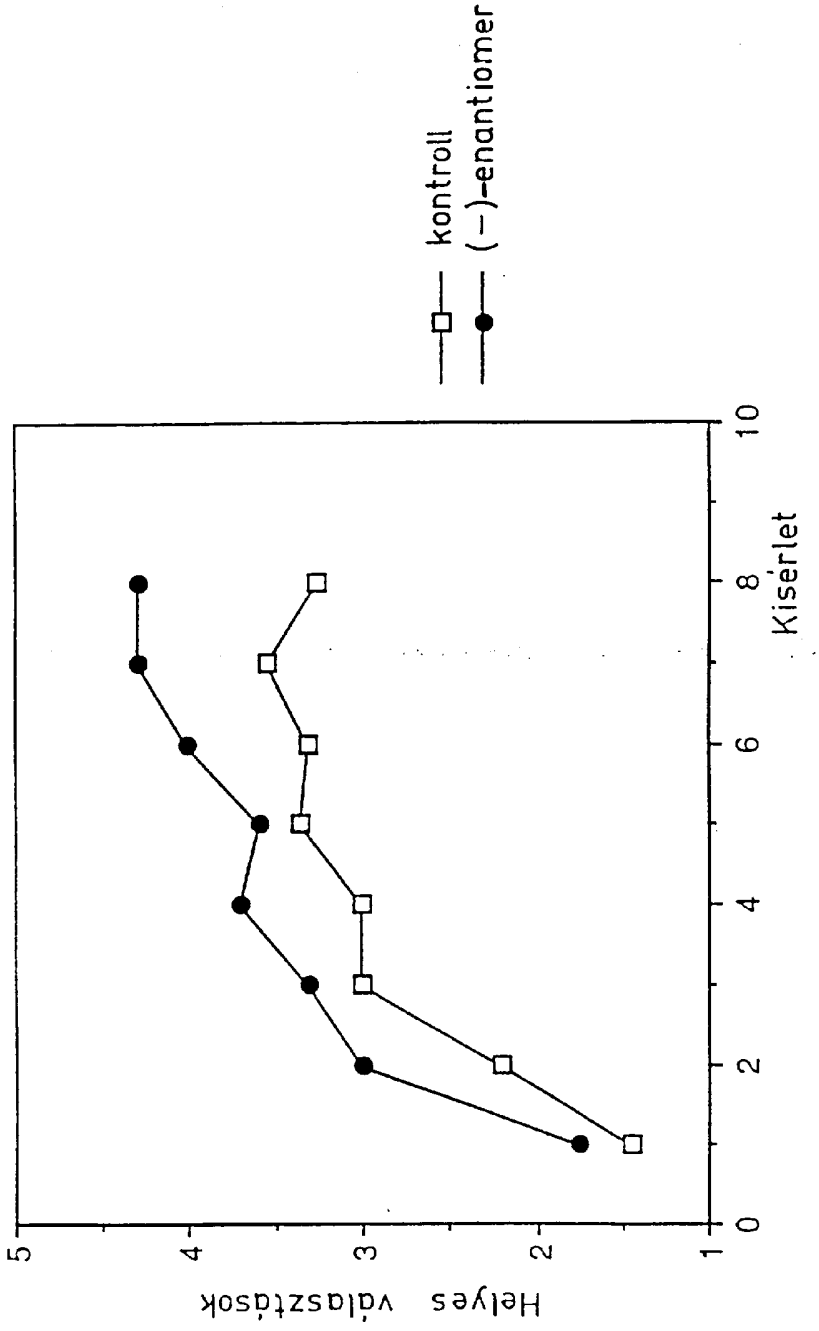
9. Új módszer egy enantiomer szeparálására, lényegében az itt ismertetettek szerint.



(I)

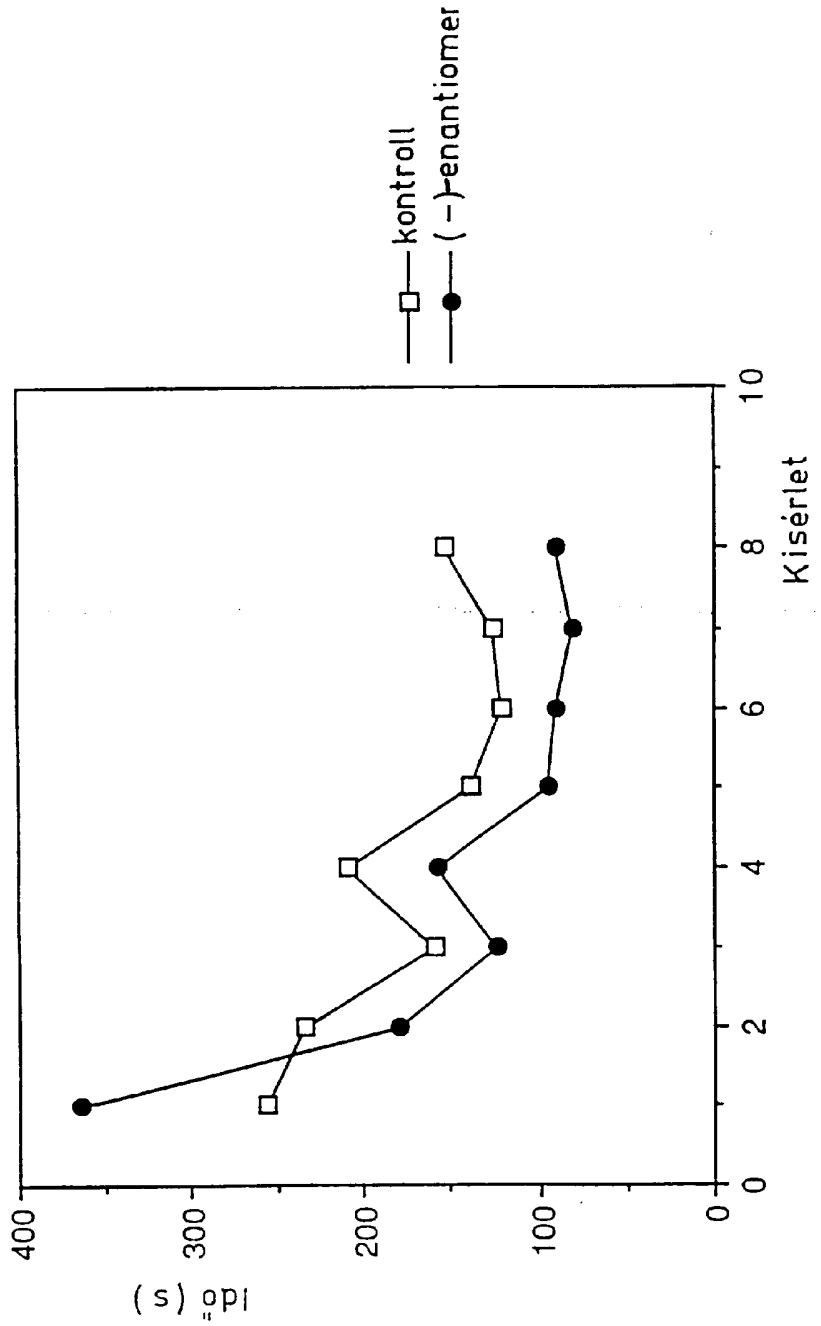


1. ábra


kontroll
(–)-enantiomer
Helyes választák
Kísérlet
0
2
4
6
8
10
1
2
3
4
5

2. ábra

Int. Cl.[6]: C 07 D 233/64



3. ábra

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Gyurcsekné Philipp Clarisse osztályvezető
ARCANUM Databases – BUDAPEST