

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **148021 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **3429/79**

(51) Int.Cl.4: **C 07 D 417/04**

(22) Indleveringsdag: **16 aug 1979**

(24) Løbedag: **18 feb 1977**

(41) Alm. tilgængelig: **16 aug 1979**

(44) Fremlagt: **04 feb 1985**

(86) International ansøgning nr.: –

(62) Stamansøgning nr.: **0734/77**

(30) Prioritet: –

(71) Ansøger: **ELI *LILLY AND COMPANY; Indianapolis, US.**

(72) Opfinder: **Charles Johnson *Paget; US, James Wesley *Chamberlin; US, James Howard *Wikel; US.**

(74) Fuldmægtig: **Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard**

(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af
5(6)-substituerede 1-thiazoliny-2-aminobenzi-
midazolforbindelser**

DK 148021 B

Forekomsten af virale sygdomstilfælde i den øvre del af luftvejssystemet er enorm. Man har beregnet, at der findes henved 1.000.000.000 tilfælde om året i USA alene. Undersøgelser udført i England (Tyrell and Bynoe, Lancet 1, 76 (1966)) har vist, at 74 % af personer med forkølelser var inficeret med rhinovira. Da der indtil nu er identificeret mere end 80 stammer af rhinovira er det ikke muligt at udvikle en praktisk rhinovirusvaccine. Her har kemoterapien vist sig at være mere velegnet.

10 En kemisk forbindelses evne til at undertrykke vira in vitro vises let ved at anvende et virusplethæmningsforsøg analogt med det, der er beskrevet af Siminoff, Applied Microbiology, 9(1), 66(1961).

15 Visse thiazolinylnbenzimidazol-forbindelser er beskrevet i følgende patentskrifter:

I USA patentskrift nr. 3 749 717 er beskrevet 1-thiazolinyln-2-(heterocyclisk)-benzimidazoler, der er nyttige som ormemidler og antiinflammatoriske midler.

20 I USA patentskrift nr. 3 825 537 er beskrevet 1-thiazolinyln-2-aminobenzimidazoler, der er nyttige som ormemidler og antiinflammatoriske midler.

25 I USA patentskrift nr. 3 833 574 er beskrevet en fremgangsmåde til fremstilling af 1-thiazolinylnbenzimidazolin-2-oner, der er nyttige som antiinflammatoriske midler.

30 Fra USA patentskrift nr. 4 008 243 er det kendt, at 1-(thiazolin-2-yl)-2-aminobenzimidazoler, der i 6-stillingen er substitueret med methoxycarbonyl eller ethoxycarbonyl eller i 5-stillingen er substitueret med ethoxycarbonyl, undertrykker væksten af rhinovirus, poliovirus, Cocksackie-virus, echovirus, Mengo-virus og influenza. Generelt er 6-isomere mere aktive end de tilsvarende 5-isomere og derfor de mest foretrukne.

De ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser, der er nært beslægtede med de fra sidstnævnte USA patentskrift kendte forbindelser, er mindst lige så virksomme som de således kendte forbindelser, også når man sammenligner
5 de bedste isomere, nemlig 6-isomerene, jfr. den efterfølgende tabel I.

Det er således et formål med opfindelsen at tilvejebringe hidtil ukendte benzimidazolforbindelser til anvendelse i
10 farmakologiske midler til at undertrykke væksten af vira, især rhinovirus, poliovirus, Coxsackievirus, echovirus, Mengovirus og influenza.

Opfindelsen angår nærmere bestemt en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte farmakologisk nyttige
15 5(6)-substituerede-1-thiazoliny-2-aminobenzimidazolforbindelser med den i kravets indledning anførte almene formel I. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte.

Betegnelsen "tautomer benzimidazol" referer til en 2-iminobenzimidazol, der på begge ringnitrogenatomer kan være substitueret med et hydrogenatom. Benzimidazolreaktanten, der er usubstitueret på det ene ringnitrogenatom, og som har en substituentgruppe i 5-stillingen i benzendelen, har en tilsvarende tautomer form, der er i ligevægt hermed, hvori substituenten alternativt sidder i 6-stillingen. Den isomere
20 blanding kan indiceres ved at nummerere de alternative positioner som 5(6).

Betegnelsen alkyl med 1-3 carbonatomer refererer til lige-kædede eller forgrenede alkylradikaler med 1-3 carbonatomer omfattende methyl, ethyl, propyl og isopropyl.
30

Alkyliden med 1-3 carbonatomer refererer til ligekædede og forgrenede radikaler med 1-3 carbonatomer omfattende methylen, ethylen, propylen og isopropylen.

Ved ovennævnte fremgangsmåde er egnede dehydratiseringsmidler stærke syrer såsom p-toluensulfonsyre, svovlsyre, trifluoreddikesyre, methansulfonsyre eller trifluormethansulfonsyre. Foretrukne opløsningsmidler til dehydratiseringsprocessen er
5 alkaner såsom hexan, aromatiske forbindelser såsom benzen eller toluen, eller chlorerede alkaner såsom methylenchlorid eller chloroform. Der anvendes normalt temperaturer på mellem ca. 25° C og kogepunktet for opløsningsmidlet.

10 Udgangsmaterialerne med formel II fremstilles som beskrevet i dansk fremlæggeskrift nr. 143 849.

Thiazolinylnbenzimidazol-forbindelserne isoleres ved kendte metoder, såsom filtrering og koncentrering af filtratet til frembringelse af krystallisation. Alternativt kan reaktionsblandingen inddampes til tørhed og remanensen behandles med
15 et egnet opløsningsmiddel såsom acetone eller methanol, til fraseparering og fjernelse af uopløselige stoffer. Opløsningen indeholdende produktet koncentrerer til krystallisation af produktet eller inddampes til opnåelse af en anden remanens, der omkrystalliseres fra f.eks. methanol. Benzimidazol-forbindelsen udvindes ved filtrering efter centrifugering.
20

5(6)-isomerene kan separeres ved fraktioneret krystallisation eller ved kolonnechromatografi. Sædvanligvis krystalliserer 6-isomeren først fra en opløsning af blandingen.

Følgende eksempler illustrerer nærmere fremstillingen af de
25 omhandlede forbindelser med formel I. Betegnelsen m/e, der anvendes ved karakterisering af forbindelserne, refererer til forholdet mellem masse og ladning af de ioner, der findes i massespektret for forbindelsen. Generelt svarer værdien til molekylvægten af hovedfraktionerne.

30 EKSEMPEL 1

1,2 g 1-(thiazolin-2-yl)-2-amino-6-(α -hydroxy- α -isopropylbenzyl)-benzimidazol opløstes i 250 ml chloroform. Til opløs-

ningen sættes 1,3 g p-toluensulfonsyre, og blandingen kogtes under tilbagesvaling i 1,5 time. Blandingen afkøledes til 25°C, vaskedes to gange med mættet vandig natriumcarbonat, tørredes og inddampedes til opnåelse af 280 mg 1-(thiazolin-2-yl)-2-amino-6-(α -isopropyliden-benzyl)-benzimidazol med smeltepunkt 242-245°C (dekomponering).

EKSEMPEL 2

Når fremgangsmåden i eksempel 1 blev gentaget under anvendelse af 1 g 1-(thiazolin-2-yl)-2-amino-6-(α -hydroxy- α -ethylbenzyl)-benzimidazol, 0,7 g p-toluensulfonsyre og 100 ml chloroform opnåedes 700 mg af det rå produkt. Dette omkrystalliseredes fra ethylacetat til opnåelse af 300 mg 1-(thiazolin-2-yl)-2-amino-6-(α -ethyliden-benzyl)-benzimidazol, der smeltede ved 186-187°C, hvorefter det størknede og smeltede igen ved 211°C. m/e 352.

Afprøvningsmetoder

Celler fra nyren af afrikanske aber (BSC-L) eller Hela celler (5-3) dyrkedes i 25 ml Falcon-kolber ved 37°C i medium 199 med 5 % inaktiveret oksefosterserum (FBS), penicillin (150 enheder, 1 ml) og streptomycin (150 μ g/ml). Når sammenflydende monolag blev dannet, fjernedes det ovenfor værende vækstmedium, og 0,3 ml af en passende fortynding af virus (echo, Mengo, Cocksackie, polio, eller rhinovirus) sættes til hver kolbe. Efter absorption i 1 time ved stuetemperatur blev det med virus inficerede cellelag overhældt med et medium indeholdende én del 1 % ionagar nr. 2 og én del dobbeltstyrke-medium 199 med FBS, penicillin og streptomycin, der indeholdt den aktive forbindelse i koncentrationer på 100, 50, 25, 12, 6, 3 og 0 μ g pr. milliliter. Kolben, der ikke indeholdt aktiv forbindelse, tjente som kontrol ved forsøget. Stamopløsninger af thiazolinyl-benzimidazol-forbindelser med formel I blev fremstillet i dimethylsulfoxid ved en koncentration på 10⁴ μ g/ml. Kolberne inkuberedes i 72 timer ved 37°C, når det drejede sig om polio, Cocksackie, echo eller Mengovirus, og 120 timer ved 32°C for

rhinovirus. Influenzavirus af typen Ann Arbor, Maryland B, Massachusetts B, Hong Kong A, Pr-8A og Taylor C (typerne A, B) inkuberedes i 72 timer ved 37° C, idet der anvendtes MDCK celler (Madin-Darby kaninmyreceller). Pletter kunne observeres i områder, hvor virus inficerede og blev reproduceret i cellerne. En opløsning af 10 % formaldehyd og 2 % natriumacetat sættes til hver kolbe for at inaktivere virus og fikse cel-
10 lelaget til overfladen af kolben. Viruspletter blev, uanset størrelse, talt efter farvning af de omgivende celleområder med krystalviolet. Pletantallet sammenlignedes med kontrolantallet for hver koncentration af aktiv forbindelse. Aktivite-
15 ten af den omhandlede forbindelse blev udtrykt som den procentvise reduktion i pletantal eller procent inhibering. Alternativt kan koncentrationen af aktiv forbindelse angives ved symbolet I_{50} , hvilket angiver den koncentration, der hæmmer dannelsen af pletterne med 50 %.

Forsøgsresultaterne er udtrykt i form af poliovirus type I inhibering, da dette virus er let at dyrke og giver ensartede forsøgsresultater. Imidlertid er virkningen af de omhandlede
20 forbindelser med formel I bekræftet over for andre viruskulturer, såsom Coxsackie (A9, A21, B5), echo virus (stammer 1-4), Mengo rhinovirus (25 stammer), Polio (type I, II, III), og influenza vira, såsom Ann Arbor, Maryland B, Massachusetts B, Hong Kong A, Pr-8A og Taylor C (typerne A,B).

25 I den efterfølgende tabel I er de ifølge eksempel 1 og 2 fremstillede forbindelser sammenlignet med forbindelserne 1-(thiazolin-2-yl)-2-amino-5-ethoxycarbonylbenzimidazol (i tabellen benævnt A), 1-(thiazolin-2-yl)-2-amino-6-methoxycarbonylbenzimidazol (i tabellen benævnt B) og 1-(thiazc-
30 lin-2-yl)-2-amino-6-ethoxycarbonylbenzimidazol (i tabellen benævnt C), som alle kendes fra dansk patentansøgning nr. 3862/76 svarende til USA patentskrift nr. 4 008 243.

Tabel I

Polio I pletreduktion med 5(6)-substituerede 1-thiazoliny1-2-aminobenzimidazol-forbindelser.

Koncentration (µg/ml)*														% plet- reduktion
For- bin- delse	HH isomer	100	50	25	12	6	3	1,5	0,75	0,35	0,17	0,08		
eks. 1	6	toxisk	toxisk	mod toxisk	mod toxisk	100	100	100	78	22	-	-	-	
eks. 2	6	100	100	100	100	100	100	100	92	67	37	24	-	
A	5	100	97	74	44	0	0	0	0	-	-	-	-	
B	6	100	100	100	100	100	83	45	18	-	-	-	-	
C	6	100	100	100	100	99	55	16	0	-	-	-	-	

* Koncentration af aktiv forbindelse i μg pr. ml.

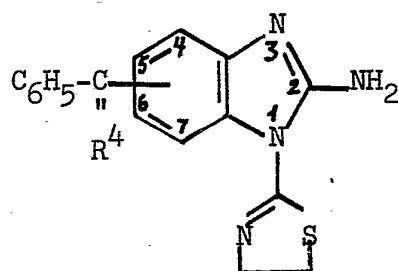
HH Tallet 5 eller 6 angiver den respektive isomer

De omhandlede 1-thiazolinylnbenzimidazol-forbindelser afprøvedes både som rene forbindelser og som isomere blandinger. Begge isomere hæmmer virusvækst, idet dog 6-isomeren generelt er mere aktiv end 5-isomeren.

- 5 De omhandlede forbindelser kan indgives oralt til varmblodede pattedyr og mennesker i doser på 1 til 300 mg/kg legemsvægt. Indgivelsen kan om nødvendigt gentages. Ifølge generel praksis kan den antivirale forbindelse indgives hver fjerde til sjette time.

P a t e n t k r a v:

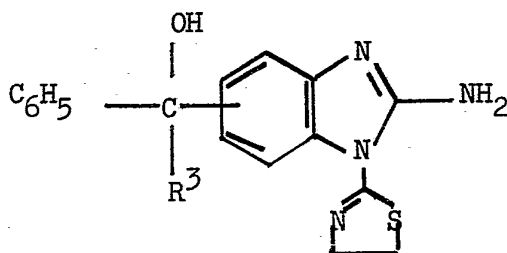
Analogifremgangsmåde til fremstilling af 5(6)-substituerede 1-thiazoliny1-2-aminobenzimidazolforbindelser med den almene formel



(I)

5 i hvilken gruppen $\text{C}_6\text{H}_5-\text{C}-$
 R^4

sidder i 5- eller 6-stillingen, og R^4 er alkyliden med 1 - 3 carbonatomer, k e n d e t e g n e t ved, at man dehydratiserer en forbindelse med den almene formel



(II)

10 hvori R^3 er alkyl med 1 - 3 carbonatomer, med en stærk syre som dehydratiseringsmiddel.

Fremdragne publikationer:

US pateht nr. 4008243.