



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 268 198

K PATENTU

(21) PV 5534-88.A
(22) Přihlášeno 28 01 88
(30) Právo přednosti od 30 01 87
DE /P 37 02 758.1/

(40) Zveřejněno 11 04 89
(45) Vydáno 31 10 90

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁴
C 07 D 513/04

(72) Autor vynálezu

(73) Majitel patentu

THORWART WERNER dr., HOCHHEIM/M.
GERBERT ULRICH dr., KELKHEIM
SCHLEYERBACH RUDOLF dr., HOFHEIM/TS.
BARTLETT ROBERT R. dr., DARMSTADT
/DE/
HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT,
FRANKFURT/M. /DE/

(54)

Způsob výroby nových substituovaných
3-fenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin
-7-onů

(57) Nové sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R^1 znamená C_{1-4} -alkyl, R^2 znamená vodík nebo C_{1-3} -alkyl a R^3 znamená vodík, C_{1-4} -alkyl nebo hydroxymethyl, se připravují tím, že se 2-halogen-1-fenyl-alkanony obecného vzorce IV, ve kterém X znamená halogen, nechají reagovat nejdříve s thiosemikarbazidem za vzniku odpovídajících 2-amino-6H-1,3,4-thiadiazinů, které se přesmyknou za kyselých podmínek na 3-amino-2-imino-2,3-dihydrothiazoly, a ty se poté cyklo-kondenzují s α -ketokarboxylovými kyselinami, popřípadě s jejich alkylestery obecného vzorce VIII, ve kterém R^4 znamená vodík nebo C_{1-3} -alkyl. Vyráběné sloučeniny se používají jako léčiva, zejména k léčení reumatických chorob.

Předložený vynález se týká způsobu výroby nových několikanásobně substituovaných 3-fenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-onů, které mají cenné farmakologické vlastnosti a mohou se používat jako účinné látky léčiv, zejména k léčbě reumatických onemocnění.

U nesteroidních antiflogistik, která se dosud výhodně používají při terapii reumatických onemocnění, se jedná téměř výlučně o poměrně silné inhibitory cyklooxygenasy, které inhibují endogenní odbourávání arachidonové kyseliny na prostaglandiny, které podporují zánětlivou reakci a bolestivou reakci. Ostatně v příčinné souvislosti s příliš vysokou inhibicí aktivity cyklooxygenasy existuje řada výrazných vedlejších účinků, jako gastrointestinální potíže, poruchy funkce ledvin a alergické reakce /například kožní alergie a astmatické případy/, které si zejména při obvykle dlouhodobém léčení vynucují přerušování léčby /srov. K. Brune, Eur. J. Rheumatol. Inflamm. 2, 335 až 349, 1982/.

Další nevýhoda těchto klasických nesteroidních antiflogistik, která je v příčinné souvislosti s popsáním mechanismem účinku, spočívá v tom, že se sice daří odstraňování nebo zmírňování příznaků bolesti, zánětu a otoku, avšak imunopatologické procesy, které jsou základem zánětlivých reumatických onemocnění, zůstávají neovlivněny a tyto látky nemohou tudíž zastavit progredující průběh nemoci.

Existuje tudíž naléhavá potřeba terapeuticky použitelných antireumatik, která by se na základě příznivějšího profilu účinnosti lišila od známých nesteroidních antiflogistik výhodně lepší snášenlivostí na straně jedné a mnohem příčinnějším zásahem do průběhu reumatického onemocnění na straně druhé. Východisko pro tento účel slibující úspěch představují taková farmaka, která zasahují intenzivněji do alternativní cesty odbourávání arachidonové kyseliny tím, že například inhibují 5-lipoxygenasu a tak zastavují exosivní tvorbu proinflammatorických leukotrienů, a rovněž vysoce reaktivní kyslíkové radikály, které jakožto mediátory zánětu rozklad buněk a tkáně v zánětlivě reumatických kloubech perpetuálně zastavují, deaktivují nebo/a restaurují vychýlený imunologický systém, a umožňují příčinně medikamentosně léčit reumatická onemocnění.

Překvapivě bylo nyní zjištěno, že zavedením určitých 3-substituovaných 5-terc-butyl-4-hydroxyfenylových skupin do polohy 3 popřípadě v poloze 2 nebo/a v poloze 6 substituovaných 7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-onů se získají sloučeniny nového typu, které na základě svých farmakologických vlastností splňují shora uvedené požadavky a jsou tudíž vynikajícím způsobem vhodné k léčení reumatických onemocnění.

Tyto sloučeniny, které jsou také žaludeční sliznicí mimořádně dobře snášenlivé, inhibují na rozdíl od dosud známých nesteroidních antiflogistik enzym 5-lipoxygenasu odbourávající arachidonovou kyselinu, zatímco ovlivňování cyklooxygenasy nebylo možné prokázat. Schopnost sloučenin deaktivovat kyslíkové radikály se projevuje například při modelu testu, ve kterém se vyvolává zánět ^R/Adriamycinem /výrobek firmy Farmitalia/, jakož i inhibicí peroxidace lipidů.

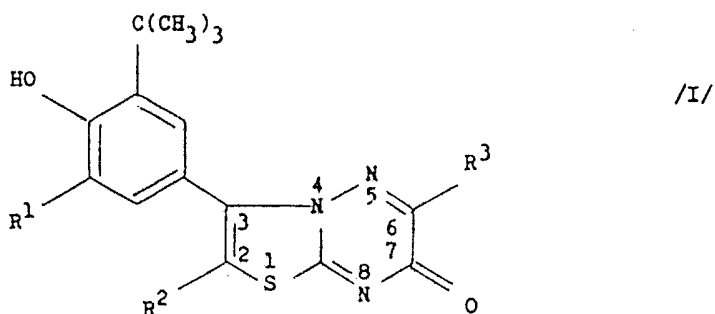
Kromě toho zasahují tyto látky výhodně do narušeného imunologického systému, jak se dá prokázat potlačením Arthusovy reakce a normalizací suprimované imunologické aktivity na patologických modelech artritidy vyvolané Freundovým adjuvans nebo kolagenem typu II.

Z literatury jsou již známy některé 7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-ony. Tak připravili F. Soliman a další na základě poptávky po antineoplasticky účinných sloučeninách 6-(3-jodstyryl)-3-methyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-5-on, aniž by však uváděli něco o jeho farmakologických vlastnostech (Pharmazie 24 (1979), str. 392 - 394). Tentýž kruhový systém s alkylovou, popřípadě fenylovou skupinou v poloze 6, vystavěli W. Klose a další (Liebigs Ann. Chem. 1984, str. 1302 - 1307); tyto sloučeniny mají herbicidní účinek. V DE-OS 31 46 300 se konečně popisuje vedle celé řady parciálně hydrogenovaných 7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-onů 3,6-difenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on a zmiňuje se odpovídající 3-methyl-6-fenylderivát, které mají být rovněž

herbicidně účinné.

Předložený vynález se naproti tomu týká způsobu výroby nových 7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4] triazin-7-onů, které obsahují v poloze 3 3-substituovanou 5-terc.butyl-4-hydroxyfenylovou skupinu a popřípadě obsahují v poloze 2 nebo/a v poloze 6 další substituenty, přičemž zavedení fenylové skupiny do polohy 6 bicyklického systému vede k úplné ztrátě účinku. Na základě svých již dříve zmíněných farmakologických vlastností hodí se tyto sloučeniny podle vynálezu pro použití v léčivech, zejména v takových, která se indikují při zánětlivých reumatických onemocněních.

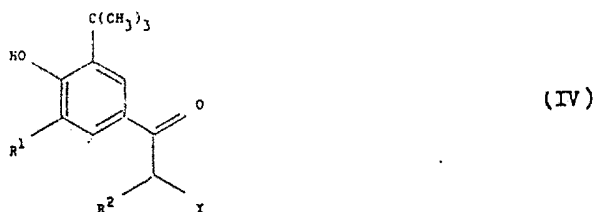
Předmětem předloženého vynálezu je tudíž způsob přípravy nových substituovaných 3-fenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4] triazin-7-onů obecného vzorce I



ve kterém

- R¹ znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku,
 R² znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku a
 R³ znamená atom vodíku, přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku nebo hydroxymethylovou skupinu.

Podle tohoto vynálezu se nové 7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4] triazin-7-ony vyrábějí tím, že se 2-halogen-1-fenylalkanony obecného vzorce IV

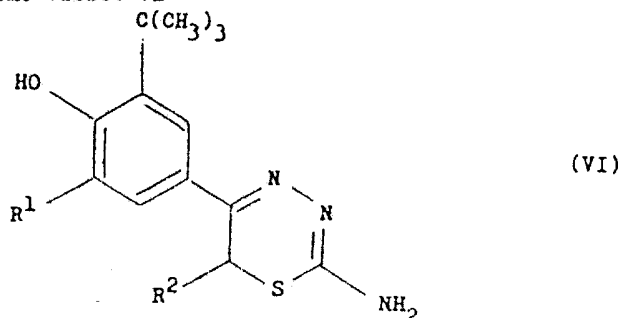


ve kterém

R¹ a R² mají významy uvedené pod vzorcem I a

X znamená atom halogenu, výhodně atom chloru nebo bromu,

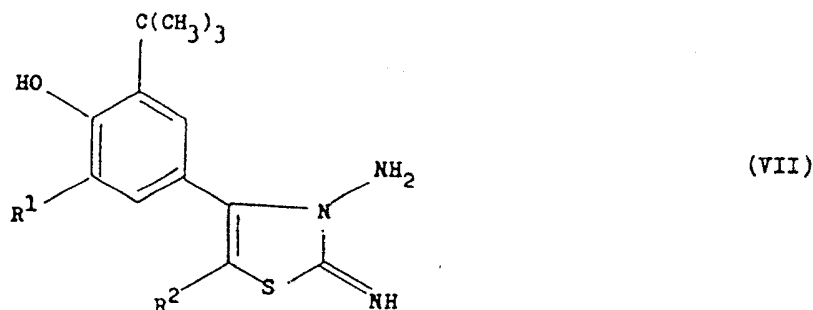
nechájí reagovat nejdříve s thiosemikarbazidem za vzniku odpovídajících nových 2-amino-6H-1,3,4-thiadiazinů obecného vzorce VI



ve kterém

 R^1 a R^2 mají shora uvedený význam,

a tyto sloučeniny se přeměňnou za kyselých podmínek na 3-amino-2-imino-2, 3-dihydro-thiazoly obecného vzorce VII



ve kterém

 R^1 a R^2 mají shora uvedený význam,

kteřé se poté cyklokondenzují s α -ketokarboxylovými kyselinami, popřípadě s jejich alkylestery obecného vzorce VIII



ve kterém

R^3 má význam uvedený pod vzorcem I a
 R^4 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku,
 za vzniku příslušných sloučenin obecného vzorce I.

R^4 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, za vzniku příslušných sloučenin obecného vzorce I.

Výhodně se připravují takové sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém buď R^1 znamená terc.- butylovou skupinu nebo R^2 a R^3 znamenají nezávisle na sobě atom vodíku nebo metylovou skupinu.

Dále jsou výhodné zejména takové sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R^1 znamená terc.-butylovou skupinu a současně R^2 a R^3 znamenají nezávisle na sobě atom vodíku nebo metylovou skupinu, jako například 3-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4] triazin-7-on.

Jako alkylové skupiny ve významu substituentů R^1 a R^3 přicházejí v úvahu methylová skupina, ethylová skupina, n-propylová skupina, isopropylová skupina, n-butylová skupina, isobutylová skupina, sek. butylová skupina a terc. butylová skupina; jako alkylové skupiny ve významu substituentu R^2 přicházejí v úvahu methylová skupina, ethylová skupina, n-propylová skupina a isopropylová skupina.

2-halogen-1-fenylalkanony obecného vzorce IV, které se používají jako výchozí látky, jsou známy z literatury nebo se dají vyrábět snadno například z 1-(3-alkyl-5-terc. butyl-4-hydroxyfenyl)-alkanonů reakcí s vhodnými halogenačními činidly podle metod, které se popisují v publikaci Houben-Weyl, sv. V/4, str. 171 až 189 /1960/.

Jako vhodné sloučeniny obecného vzorce IV lze uvést například 2-brom-1-(3,5-di-
tero.butyl-4-hydroxyfenyl)ethanom a 2-brom-1-(3-methyl-5-tero.-butyl-4-hydroxyfenyl)etha-
non, které se dají vyrábět halogenací příslušné substituovaných 1-fenylalkanonů s ele-
mentárním bromem nebo s bromidem měďnatým podle postupu L. C. Kinga a G. K. Ostruma,
J. Org. Chem. 29 (1964) str. 3459 až 3461.

K získání těch sloučenin obecného vzorce IV, ve kterém X znamená atom chloru, se hodí zejména sulfurylchlorid, který se uvádí v reakci výhodně při teplotách mezi asi 10 a -30 °C v přítomnosti inertních rozpouštědel, jako například methylenchloridu nebo chloroformu, s odpovídajícími 1-fenylalkanony. Další způsob výroby spočívá ve Friedel-Craft-

sově acylaci 2-alkyl-6-alkyl-6-terc.butylfenolů výhodně s chloracetylchloridem v přítomnosti Lewisových kyselin, jako například chloridu hlinitého nebo fluoridu boritého.

Postup podle vynálezu vede přes 2-amino-6H-1,3,4-thiadiaziny obecného vzorce VI jakožto meziprodukty, které se dají snadno připravit podle metod známých z literatury s 2-halogen-1-fenylalkanonů obecného vzorce IV a thiosemikarbazidu. Jejich přesmyk na odpovídající 3-amino-2-imino-2,3-dihydrothiazoly obecného vzorce VII se provádí výhodně v kyselém prostředí jako například v chlorovodíkové kyselině, bromovodíkové kyselině, sířové kyselině nebo octové kyselině, jakož i v jejich směsích nebo ve směsích s vodou.

Následující cyklokondenzace za vzniku sloučenin obecného vzorce I se provádí obecně bez izolace intermediárně vzniklých 3-amino-2-imino-2,3-dihydrothiazolů obecného vzorce VII tím, že se k reakční směsi přidá α -ketokarboxylová kyselina nebo její alkylester obecného vzorce VIII, jako například glyoxylová kyselina nebo pyrohroznová kyselina, popřípadě jejich methylestery nebo ethylestery, a to až ve dvojnásobku ekvimolárního množství. Teploty se přitom pohybují výhodně mezi asi 50 °C a teplotou varu právě použitého reakčního prostředí, zatímco reakční doby mohou obecně činit od asi 5 až do asi 30 hodin.

7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-ony obecného vzorce I, které se připravují postupem podle vynálezu, se hodí na základě svých cenných farmakologických vlastností při současně velmi dobré snášenlivosti zvláště pro použití jako účinné látky v léčivech, zejména v takových léčivech, která se používají k léčení zánětlivých reumatických onemocnění. Tyto látky se mohou aplikovat buď samy o sobě, například ve formě mikrekapalí, ve vzájemných směsích nebo v kombinaci s vhodnými pomocnými látkami nebo/a nosnými látkami.

Léčiva sestávají z alespoň jedné sloučeniny vzorce I nebo obsahují alespoň jednu z těchto účinných látek vedle farmaceuticky vhodných a fyziologicky snášenlivých nosných látek, ředidel nebo/a dalších pomocných látek.

Léčiva se mohou aplikovat perorálně, místně, rektálně nebo popřípadě také parenterálně, přičemž výhodnou aplikací je perorální aplikace.

Vhodnými pevnými nebo kapalnými galenickými přípravky jsou například granuláty, prášky, dražé, tablety, (mikro)kapsle, čípky, sirupy, šťávy, suspenze, emulze, kapky nebo injekčně aplikovatelné roztoky, jakož i přípravky s protražovaným uvolňováním účinné látky; při jejich výrobě se používá obvyklých pomocných prostředků, jako jsou nosné látky, látky umožňující rozpad, pojidla, látky k vytváření povlaku, botnadla, lubrikátory nebo kluzné látky, chuťové přísady, sladidla nebo pomocná rozpouštědla. Jako často používané pomocné látky lze uvést například uhličitán hořečnatý, oxid titaničitý, mléčný cukr, mannitol a další cukry, mastek, mléčné bílkoviny, želatinu, škrob, celulosu a její deriváty, živočišné a rostlinné oleje, polyethylenglykoly a rozpouštědla, jako například sterilní vodu a jednocenné nebo vícemocné alkoholy, například glycerin.

Výhodně se tyto farmaceutické přípravky vyrábějí a aplikují ve formě jednotkových dávek, přičemž každá jednotka obsahuje jako účinnou složku určitou dávku alespoň jedné sloučeniny vzorce I. U pevných jednotkových dávek, jako jsou tablety, kapsle, dražé nebo čípky, může tato dávka činit až asi 800 mg, výhodně však činí asi 100 až 500 mg.

Pro léčení dospělého pacienta trpícího zánětlivými reumatickými chorobami jsou - vždy podle účinnosti sloučenin vzorce I - lidem aplikovány denní dávky od asi 100 do 2000 mg účinné látky, výhodně asi 300 až 1000 mg, při perorální aplikaci. Podle okolností se však mohou podávat také vyšší nebo nižší denní dávky. Aplikace denní dávky může být jak ve formě jednorázové dávky, jako jednotlivá dávkovací jednotka, nebo také ve formě několika menších dávkovacích jednotek a může se provádět také několikanásobným podáním určitých částí jednotkové dávky v určitých intervalech.

Konečně se mohou sloučeniny vzorce I zpracovávat při výrobě shora uvedených gale-

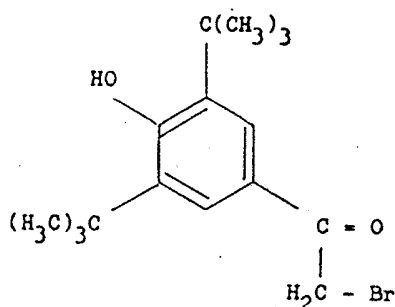
nických přípravků také společně s dalšími vhodnými účinnými látkami, například s antiurikopatiky, s prostředky potlačujícími agregaci trombocytů, analgetiky a dalšími steroidními nebo nesteroidními antiflogistiky.

Struktura všech dále popisovaných sloučenin byla potvrzena elementární analýzou a údaji IČ spektra a $^1\text{H-NMR}$ spektra. Sloučeniny vzorce I vyrobené podle dále uvedených příkladů, jakož i analogickým způsobem vyrobené sloučeniny vzorce I, jsou shrnuty v tabulce 1.

P ř í k l a d 1

3-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4] triazin-7-on

a) 2-brom-1-(3,5-di-terc.butyl-5-hydroxyfenyl) ethanon



206 g (0,83 mol) 1-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)ethanonu se za míchání rozpustí ve 415 ml methylenchloridu, získaný roztok se zahřívá k varu a během 30 minut se k němu přikape 144 g (0,9 mol) bromu. Potom se reakční směs zahřívá další 2 hodiny k varu pod zpětným chladičem, poté se reakční směs ochladí, přidá se k ní 400 ml vody, organická fáze se oddělí a vysuší se síranem sodným.

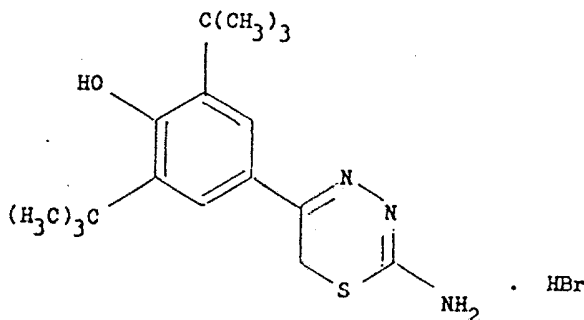
Po odstranění rozpouštědla odpařením za sníženého tlaku se získaný pevný surový produkt překrystaluje z 540 ml methylcyklohexanu.

Výtěžek: 191 g (67 % teorie).

Teplota tání: 105 až 108 °C.

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{BrO}_2$ (molekulová hmotnost 327,3).

b) 2-amino-5-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)-6H-1,3,4-thiadiazin-hydrobromid



Roztok 32,7 g (0,1 mol) 2-brom-1-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)ethanonu a 9,1 g (0,1 mol) thiosemikarbazidu ve 250 ml ledové kyseliny octové se míchá 1 hodinu při teplotě místnosti a vyloučená sraženina se odfiltruje a za horka se rozpustí v 500 ml ethanolu. Po ochlazení se vyloučené krystaly odfiltrují, několikrát se promyjí ethylacetátem a vysuší se ve vakuu.

Výtěžek: 27,2 g (68 % teorie).

Teplota tání: 255 až 257 °C.

Analýza: pro $C_{17}H_{26}BrN_3OS$ (molekulová hmotnost 400,4)

vypočteno 51,00 % C, 6,55 % H, 19,96 % Br, 10,49 % N, 8,01 % S;

nalezeno 50,71 % C, 6,52 % H, 19,92 % Br, 10,46 % N, 8,17 % S.

c/ 3-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on

K roztoku 10,00 g (0,025 mol) 2-amino-5-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)-6H-1,3,4-thiadiazin-hydrobromidu ze stupně b) ve 250 ml ledové kyseliny octové a 25 ml 4N roztoku chlorovodíkové kyseliny se při teplotě 80 °C přikape 4,8 g (0,05 mol) monohydrátu glyoxalové kyseliny v 75 ml vody. Po 20-hodinovém míchání při teplotě 80 °C se rozpouštědla odpaří za sníženého tlaku. Pevný zbytek se čistí výhodně sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití směsi methylenchloridu a methanolu v poměru 25 : 1 jako elučního činidla a následujícím překrystalováním z ethanolu. Podle analytických a spektroskopických dat je získaná sloučenina shodná s produktem, který byl vyroben jiným postupem.

Výtěžek: 3,9 g (42 % teorie).

Teplota tání: 255 až 256 °C (rozklad).

Sumární vzorec: $C_{19}H_{23}N_3O_2S$ (molekulová hmotnost 357,5).

T a b u l k a 1
Sloučeniny vzorce I

příklad číslo	R ¹	R ²	R ³	teplota tání °C)
1	(H ₃ C) ₃ C-	H	H	257 (rozklad)
2	H ₃ C-	H	H	225-226 (rozklad)
3	(H ₃ C) ₃ C-	H	-CH ₂ -OH	215 - 217
4	(H ₃ C) ₃ C-	-CH ₃	-CH ₃	256 - 257
5	(H ₃ C) ₃ C-	H	-CH ₃	219 - 220
6	(H ₃ C) ₃ C-	-CH ₃	H	249 - 251
7	(H ₃ C) ₃ C-	H	-CH ₂ -CH ₃	240 - 242
8	(H ₃ C) ₃ C-	H	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	216 - 217
9	(H ₃ C) ₃ C-	H	-CH(CH ₃) ₂	237 - 238
10	H ₃ C-	H	-CH ₃	232 - 233

Zkoušení farmakologických účinků a výsledky:

Zkoušení sloučenin obecného vzorce I, vyráběných postupem podle vynálezu, na protizánětlivý (antiflogistický) účinek, na ovlivňování imunopathologických procesů, na schopnost deaktivovat kyslíkové radikály, na tvorbu akutních vředů na žaludeční sliznici a na akutní toxicitu, se provádí na dále popsáných modelech testů na zvířatech, přičemž se současně zkouší účinek Naproxenu, tj. 2-(6-methoxy-2-naftyl)propionové kyseliny, jakožto srovnávací látky. Naproxen je pokládán při terapii reumatických onemocnění za standardní přípravek první volby.

1. Artritida vyvolaná pomocným prostředkem

Pokusy se provádějí podle metody, kterou popsal Paerson (Arthrit. Rheum. 2 (1959), str. 44). Jako pokusná zvířata při tomto testu slouží samci krysy kmene Wistar - Lewis o tělesné hmotnosti mezi 130 a 200 g. Sloučeniny, jejichž účinek se zkouší, se perorálně (p.o.) aplikují v dávkách 50 mg na 1 kg tělesné hmotnosti jednou denně od prvního do pátého dne pokusu. Zvířata kontrolní skupiny dostávají při pokusu pouze nosné prostředí.

Pro každou testovanou látku a pro kontrolní skupinu se používá vždy 8 zvířat. Jako kritérium účinku slouží procentuální snížení přírůstku objemu tlapky oproti této hodnotě zjištěné u kontrolní skupiny zvířat.

2. Tvorba akutních vředů /ulcerogenita/ na žaludeční sliznici

Tento pokus se provádí vždy na 10 samcích krys /Sprague-Dawley/ se sensibilizovanou žaludeční sliznicí, přičemž této sensibilizace bylo dosaženo stresem z hladovění. Tělesná hmotnost zvířat se pohybuje mezi 200 a 300 g. 48 hodin před aplikací testovaných přípravků až do usmrcení zvířat se zvířatům při volném přístupu k pitné vodě odejme potrava. Krysy se 24 hodin po perorálním podání testované látky usmrtí, vyjmou se jejich žaludky, vyčistí se pod tekoucí vodou a kontrolují se pokud jde o počet lézí na žaludeční sliznici. Za vředy se považují všechny makroskopicky patrné léze. Určuje se počet zvířat a vředy na jednotlivou dávku a podle Litchfielda a Wilcoxonova /J. Pharmacol.exp. Ther. 96 /1949/, str. 99/ se vypočtou hodnoty UD_{50} , tj. ty dávky, pomocí kterých se u 50 % zvířat vyvolají léze.

3. Akutní toxicita

Určení hodnoty LD_{50} se provádí standardní metodou na základě mortality vyskytující se během 7 dnů u myši /kmen NMRI, tj. Naval Medical Research Institute/ /6 zvířat na jednu dávku/ po jednorázové intraperitoneální /i.p./ aplikaci testované látky.

Výsledky těchto testů, které jednoznačně dokládají převahu sloučenin vzorce I podle vynálezu oproti standardnímu přípravku Naproxenu, jsou shrnuty v následující tabulce 2.

T a b u l k a 2

Protizánětlivý účinek, ulcerogenita a akutní toxicita

sloučenina z příkladu	artritida vyvolaná pomocným prostředkem / % inhibice při 50 mg/kg p.o./	akutní ulcerogenita UD_{50} /mg/kg/	akutní toxicita LD_{50} (mg/kg/
1	67	> 400 ^{x)}	> 1200
2	41	> 400 ^{x)}	> 1200
3	41	> 200 ^{x)}	> 1200
5	50	> 200 ^{x)}	> 1200
8	45	> 200 ^{x)}	> 1200
Naproxen	55	23	500

x) uvádí se vždy aplikovaná nejvyšší dávka

Z křivky závislosti dávky a účinku na modelu artritidy vyvolané pomocným prostředkem lze zjistit například pro sloučeninu z příkladu 1 hodnotu ED_{50} 10,9 mg/kg, výrazně převyšuje odpovídající hodnotu srovnávacího prostředku 17,5 mg/kg pro standardní přípravek Naproxen.

Pokud jde o akutní ulcerogenitu, vypočte se poměr hodnot UD_{50} : ED_{50} kvocient terapeutické šíře > 36,7 pro sloučeninu z příkladu 1, přičemž stejná hodnota pro srovnávací přípravek Naproxen činí pouze 1,3. Tím je zvláště výrazně zdůrazněno, oč lepší je mimořádně dobrá snášenlivost sloučenin podle vynálezu žaludeční sliznici.

Rovněž jednoznačnou převahu oproti srovnávacímu přípravku lze zjistit, jestliže se při výpočtu terapeutické šíře vychází ze zjištěných hodnot LD_{50} a vytvoří se poměr LD_{50}/ED_{50} , který pro sloučeninu z příkladu 1 činí více než 110 a pro Naproxen 28,6.

Také při dalších speciálních pokusech se ukazují sloučeniny podle vynálezu jedno-

značně příznivější, než srovnávací přípravek Naproxen.

4. Potlačení imunopathologických procesů

Dnes je obecně známo, že progradující průběh zánětlivých reumatických onemocnění způsobuje hlavně vykojení v imunologickém systému a že tudíž příčinná terapie se může dařit pouze s takovými léčivými, která umožní zastavit tyto imunopathologické procesy.

a) Artritida vyvolaná pomocným prostředkem

Při pokusu na kryse podle modelu artritidy vyvolané pomocí Freundova adjuvans, který se popisuje v odstavci 1., se obvykle drasticky sníží imunologická aktivita lymfocytů vůči určitým mitogenům, jako je Concanavalin-A, Phytohemagglutinin-A a dextran-sulfát. Byl tudíž zkoušen stimulační účinek na tuto silně suprimovanou imunologickou odpověď. Přitom například sloučenina z příkladu 1 po perorální podání 3,15 a 6,3 mg/kg způsobuje dalekosáhlou normalizaci imunologické reaktivity, zatímco zkoušený Naproxen byl až do dávek 25 mg/kg neúčinný.

b) Artritida vyvolaná kolagenem typu II

Při tomto pokusu se artritida vyvolává na samcích Wistarových krych kolagenem typu II, který se dá získat standardními metodami podle Millera a Rhodese (Meth. Enzymol. 82 (1982), str. 33) z nosní přepážky telete, a zvířatům se aplikuje intradermální injekcí ve směsi s nekompletním Freundovým adjuvans. Tento imunizační postup se znovu opakuje o 7 dnů později. 20 dnů po první imunizaci se rozdělí onemocnělé krysy do skupin, které obsahují vždy 7 zvířat, a kterým se v následující dvacetidenní léčebné fázi denně podává 1 orální dávka příslušné testované látky, popřípadě samotné nosné prostředí (kontrolní skupina). 41. den pokusu, tj. 1 den po posledním podání látky se stanoví přírůstek objemu obou zadních tlapek.

Přitom vykazuje například sloučenina z příkladu 1 v závislosti na výši dávky inhibici přírůstku objemu tlapek, která je statisticky významná 25 mg/kg p.o., zatímco pro Naproxen byly při stejné dávce zjištěny jen nevýznamné inhibiční hodnoty.

Také při tomto modelu artritidy vyvolané kolagenem je imunologický stav lymfocytů citelně narušen. Proto se ze sleziny pokusných zvířat získají lymfocyty a zkoumá se jejich imunologická aktivita vůči mitogenům. Při tomto testu se dají pro sloučeniny podle výsledku v závislosti na dávce opět prokázat léčebné účinky na silně zeslabený imunologický systém, zatímco srovnávací přípravek Naproxen nevykazuje žádný účinek. Tak například při dávce 12 mg/kg p.o. sloučeniny z příkladu 1 je plně normalizována imunologická funkce jak T- tak i B-lymfocytů.

c) Aktivní Arthusova reakce

Jako pokusná zvířata slouží při tomto testu samice a samci krys (Sprague-Dawley) o tělesné hmotnosti mezi 80 a 100 g, kterým se subkutánní injekcí do kořene ocasu aplikuje 0,5 ml emulze vakcíny pertuse a vaječného albuminu v parafinovém oleji. Po 2 týdnech se krysy rozdělí do skupin, které obsahují vždy 8 zvířat. 24 hodin a jednu hodinu před vyvoláním Arthusovy reakce injekcí 0,1 ml 0,4 % roztoku vaječného albuminu do pravé zadní tlapy se provede perorální aplikace příslušné testované látky nebo čistého nosného prostředí (pozitivní kontrola). Do levé tlapy se injekčně aplikuje roztok chloridu sodného. Skupina nesensibilizovaných zvířat (negativní kontrola) se rovněž ošetří vaječným albuminem, aby bylo možno vyloučit nespecifické reakce vůči proteinu. Jako parametr účinku pro testovaný přípravek slouží inhibice přírůstku objemu tlapy ve srovnání s inhibicí přírůstku objemu tlapy sice sensibilizované, avšak neošetřené kontrolní skupiny (pozitivní kontrola) 4 hodiny po provokaci vaječným albuminem, když otok dosáhne své maximální hodnoty.

Nesteroidní antiflogistika včetně Naproxenu jsou při tomto uspořádání pokusu neúčinná. Naproti tomu se dá Arthusova reakce účinně potlačit po orální aplikaci například sloučeniny z příkladu 1 při ED₅₀ mezi 10 a 15 mg/kg.

5. Antioxidační účinek

Podle současného stavu vědomostí se na progresivním průběhu reumatické artritidy a dalších zánětlivých onemocněních podmíněných mnoha faktory podílí značnou měrou agresivní kyslíkové radikály, které se v nadbytku tvoří během chronického zánětlivého procesu a samy jako vysoce toxické mediátory zánětu perpetuálně přispívají k rozrušování vazivové tkáně, které probíhá v důsledku irrevizibilní peroxidace lipidů buněčné membrány. Proto mají antioxidačně účinná farmaka se schopností deaktivace těchto extrémně cytotoxických kyslíkových radikálů umožnit záměrný zásah do zánětlivého procesu. Vhodný model testu na zvířeti pro rozrušování tkáně v důsledku kyslíkových radikálů tohoto typu představuje zánět vyvolaný na kryse Adriamycinem (Doxorubicinem).

a(Zánět vyvolaný Adriamycinem

Pokusy se provádějí podle metody, kterou popsal D. M. Siegel a další (Inflammation 4 (1980) str. 233), na samcích krys (Sprague-Dawley) o tělesné hmotnosti mezi 200 a 230 g ve skupinách, které obsahují vždy 7 zvířat. Zvířatům se subkutánní injekcí do levé zadní tlapky aplikuje 0,1 mg Adriamycinu, který je rozpuštěn v 0,1 ml 0,9 % roztoku chloridu sodného. O 72 hodin později se zjistí přírůstek objemu tlapky jako měřítko stupně zánětu plethymografickým měřením.

Orální aplikace testovaných přípravků v 1 % vodné suspenzi karboxymethylcelulose se provádí jedenkrát denně ve 4 po sobě následujících dnech, počínaje dnem podání injekce Adriamycinu.

Jak vyplývá z tabulky 3, vykazuje také při tomto testu například sloučenina z příkladu 1, v závislosti na dávce, silný ochranný účinek proti rozrušování tkáně, které bylo vyvoláno Adriamycinem. Jak steroidní tak i nesteroidní antiflogistika, včetně Naproxenu, jsou při tomto uspořádání pokusu neúčinná.

T a b u l k a 3

Potlačení zánětu, který byl vyvolán Adriamycinem

skupina zvířat	dávka v mg/kg p.o.	přírůstek objemu tlapky v μ l	ochranný účinek v %
kontrola	-	430	-
sloučenina z příkladu 1	20	220	49 ^{x)}
	40	200	54 ^{x)}
	80	10	98 ^{x)}

x) významnost p 0,05

b(Inhibice peroxidace lipidů in vitro

Další přesvědčivý důkaz výrazného ochranného účinku sloučenin podle vynálezu vůči agresivním kyslíkovým radikálům skýtá test s thiobarbiturovou kyselinou podle A. Ottolenghiho /Arch. Biochem. Biophys. 79 (1959) str. 355-363).

Pomocí této metody in vitro se dá na základě dialdehydu malonové kyseliny, který vzniká při oxidačním odbourávání vícenásobně nenasycených mastných kyselin vázaných na membránu, určit ovlivňování peroxidace jak mikrosomálních, tak i mitochondriálních lipidů antioxidačně účinnými přípravky.

Také zde působí sloučeniny vzorce I silným inhibičním účinkem. Pro sloučeninu z příkladu 1 byly zjištěny při použití mikrosomů a mitochondrií z jater krysy například hodnoty IC_{50} $6 \cdot 10^{-7}$, popřípadě $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

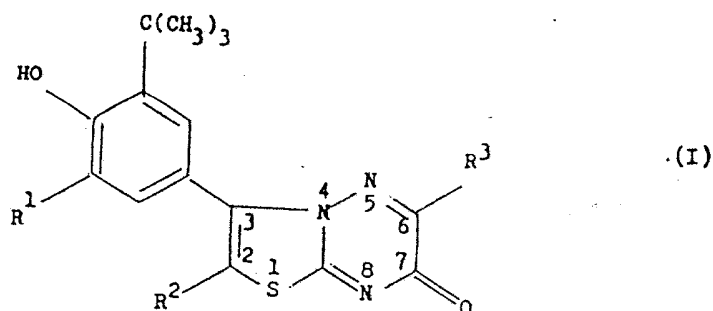
6. Inhibice 5-lipoxygenasy

Inhibiční účinek sloučenin podle vynálezu na odbourávání arachidonové kyseliny, které je katalyzované 5-lipoxygenasou, se prokazuje obvyklým způsobem pokusy in vitro na izolovaných lidských granulocytech a polymorfními jádry. Za tím účelem se buňky stimulované Calcium -Ionophor A 23 187 /Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main, NSR, Biochemical and Immunochemical Catalog 1985, str. 284) inkubují s arachidonovou kyselinou značenou ^{14}C a po 15 minutách inkubace při teplotě 37°C se po rozdělení vysoce účinnou kapalinovou chromatografií kvantitativně určí pomocí radiomonitoru radioaktivní hlavní produkty odbourání arachidonové kyseliny, tj. 5-hydroxyseikosatetraenové kyselina (5-HETE) a zvláště silně proinflammatoricky účinný leukotrien B_4 / LTB_4), vzniklé biotransformací.

Při tomto uspořádání pokusu se dá významně inhibovat jak LTB_4 tak i 5-HETE a tím odbourávání arachidonové kyseliny 5-lipoxygenasou v průběhu patnáctiminutové předběžné inkubace granulocytů, například při použití sloučeniny z příkladu 1 v rozsahu koncentrací mezi 10^{-5} až 10^{-6} mol/litr.

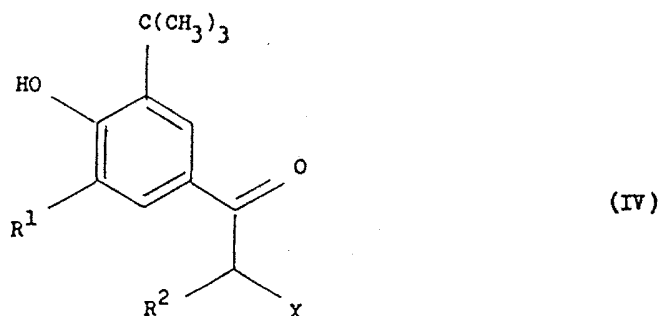
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby nových substituovaných 3-fenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-onů obecného vzorce I



ve kterém

- R^1 znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku,
 R^2 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku a
 R^3 znamená atom vodíku, přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku nebo hydroxymethylovou skupinu, vyznačující se tím, že se 2-halogen-1-fenylalkanony obecného vzorce IV

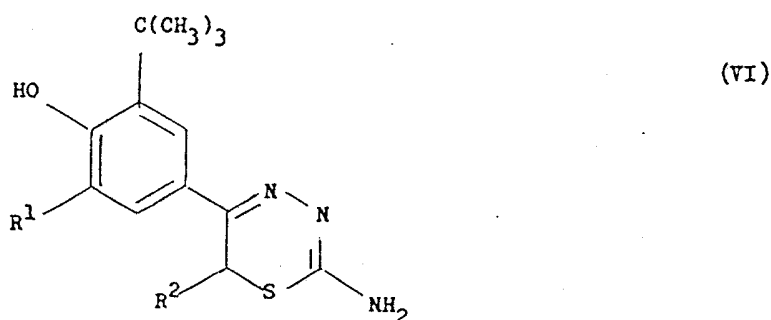


ve kterém

R^1 a R^2 mají významy uvedené pod vzorcem I a

X znamená atom halogenu,

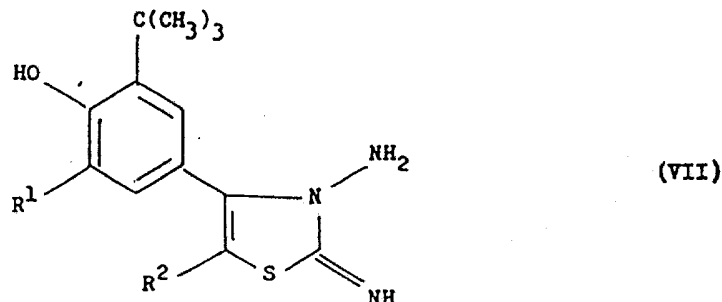
nechají reagovat nejdříve s thiosemikarbazidem za vzniku odpovídajících 2-amino-6H-1,3,4-thiadiazinů obecného vzorce VI



ve kterém

R^1 a R^2 mají shora uvedený význam,

a tyto sloučeniny se přemýknou za kyselých podmínek na 3-amino-2-imino-2,3-dihydrothiazoly obecného vzorce VII



ve kterém

R^1 a R^2 mají shora uvedený význam,

které se poté cyklokondenzují s α -ketokarboxylovými kyselinami, popřípadě s jejich alkylestery obecného vzorce VIII



ve kterém

R^3 má význam uvedený pod vzorcem I a

R^4 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozí látky používají odpovídající sloučeniny obecného vzorce IV a VIII za vzniku sloučenin obecného vzorce I, ve kterém R^1 znamená terc. butylovou skupinu nebo/a R^2 a R^3 znamenají nezávisle na sobě atom vodíku nebo metylovou skupinu.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se jako výchozí látky používají odpovídající sloučeniny obecného vzorce IV a VIII za vzniku sloučenin obecného vzorce I, ve kterém R^1 znamená terc. butylovou skupinu a R^2 a R^3 znamenají oba atomy vodíku, tj. 3-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-onu.