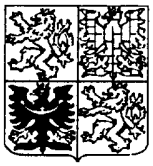
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
284 652

(19)
ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2981-96**
(22) Přihlášeno: **13. 04. 95**
(30) Právo přednosti:
14. 04. 94 GB 94/9407432
(40) Zveřejněno: **12. 02. 97**
(Věstník č. 2/97)
(47) Uděleno: **24. 11. 98**
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **13. 01. 99**
(Věstník č. 1/99)
(86) PCT číslo: **PCT/GB95/00845**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/28388**

(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.[6]:
C 07 D 215/54
A 61 K 31/47

(73) Majitel patentu:
ZENECA LIMITED, London, GB;

(72) Původce vynálezu:
Warawa John Edward, Wilmington, DE, US;
Ohnmacht Cyrus John Jr., Wilmington, DE, US;
Trainor Diane Amy, Wilmington, DE, US;
Hulsizer James Michael, Wilmington, DE, US;

(74) Zástupce:
Traplová Jarmila JUDr., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název vynálezu:
(S)-(-)-2-Trifluormethyl-4-(3-kyanfenyl)-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolon, způsoby jeho přípravy, farmaceutické prostředky, které ho obsahují a jeho použití

(57) Anotace:
Sloučenina (S)-(-)-2-trifluormethyl-4-(3-kyanfenyl)-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolon, která je látkou otevírající draslíkové kanály a je vhodná například pro ošetření inkontinence moči. Způsoby její přípravy, farmaceutické prostředky, které ji obsahují, a její použití pro přípravu léčiv.

CZ 284 652 B6

(S)-(-)-2-Trifluormethyl-4-(3-kyanfenyl)-4,6,7,8-tetrahydro-5(1h)-chinolon, způsoby jeho přípravy, farmaceutické prostředky, které ho obsahují a jeho použití

Oblast techniky

Vynález se týká nové sloučeniny, která je vhodná pro ošetření nestability močového měchýře u savců, jako je člověk. Konkrétněji se vynález týká (S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolonu (sloučeniny), použití této sloučeniny k ošetření inkontinence moči u savců (včetně člověka), způsobů přípravy této sloučeniny a farmaceutických prostředků, které tuto sloučeninu obsahují.

Dosavadní stav techniky

Dosavadní ošetřování inkontinence moči jsou obecně špatná, založená na léčivech, která byla původně vyvinuta pro jiné indikace. Do jedné skupiny těchto léčiv patří látky blokující vápníkový kanál, jako je nifedipin, které byly původně vyvinuty, a primárně se používají, jako kardiovaskulární činidla.

Nifedipin patří do strukturní skupiny sloučenin známých jako dihydropyridiny. Tato strukturní skupina byl rozsáhle zkoumána, a v současné době jsou dosti dobře stanovené strukturní požadavky pro účinnost při blokování vápníku. Tedy, jak je popsáno v kapitole 14.1 učebnice lékařské chemie. Comprehensive Medicinal Chemistry, svazek 3, editor John C. Emmett, vydal Pergamon Press roku 1990, tyto sloučeniny mají 1,4-dihydropyridinový kruh, který optimálně obsahuje arylovou skupinu v poloze 4 a esterové skupiny v polohách 3 a 5. Odstranění esterových skupin nebo jejich nahrazení acetylovými skupinami nebo kyanoskupinami je spojeno se snížením účinnosti. Obecně mají tyto sloučeniny methylové skupiny v polohách 2 a 6.

Grinshteins a kol., Khim. Geterotsikl. Soedin. (6), 1118-20,1967, popisují sloučeniny 3-kyan-4-fenyl-2,7,7-trimethyl-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolon a 3-ethanoyl-4-fenyl-2,7,7-trimethyl-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolon. Vitolinya a kol., Khim.-Farm. Zh., 15 (1), 39 - 42,1981, popisují výzkumy účinku některých 4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolonů s esterovou skupinou nebo kyanoskupinou v poloze 3 na kardiovaskulární systém a na hladké svaly střev. O 3-kyan-4-fenyl-2,7,7-trimethyl-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolonu je uváděno, že vykazuje hypotenzní vlastnosti a je schopen blokovat spasmogenní účinek jak acetylcholinu tak chloridu barnatého na hladké svaly střev.

DE 2003148 popisuje skupinu 1,4-dihydropyridinových derivátů, včetně určitých 4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolonů, které obsahují v poloze 3 esterovou skupinu nebo ketoskupinu a o kterých se uvádí, že vykazují široké a mnohostranné spektrum farmakologického působení. Mezi hlavní účinky, o kterých se uvádí, že je tyto sloučeniny vykazují, patří silné svalové spasmolytické účinky, které jsou evidentní v hladkém svalstvu gastrointestinálního traktu, urogenitálního traktu a dýchacího systému. Je uvedeno, že další hlavní účinky spočívají v působení na srdce (účinky "poskytující úlevu srdci") a ve snižování krevního tlaku u zvířat s normálním tlakem a s vysokým tlakem, takže je lze použít jako antihypertenzní činidla.

Podstata vynálezu

Je známo, že tkáň močového měchýře je dráždivá a že inkontinence moči může být způsobena nekontrolovanými nebo nestabilními stahy močového měchýře. Nyní byla nalezena sloučenina, která je neočekávaně schopná relaxovat hladké svaly močového měchýře, čímž zabraňuje

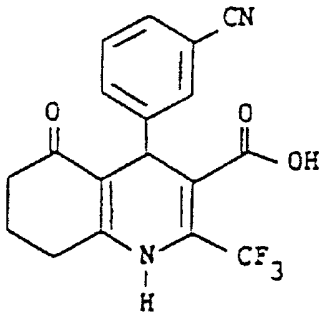
nekontrolovaným nebo nestabilním stahům močového měchýře, nebo je zmírňuje. Tato sloučenina tedy může být vhodná pro ošetření naléhavých inkontinencí, které zahrnují například nestabilitu detrusoru, která může být následkem cystitidy, urethritidy, nádorů, kamenů, obstrukcí divertikulů nebo vývodných cest, a hyperreflexie detrusoru, která může být následkem mrtvice, demence. Parkinsonovy nemoci, suprasakrálního poranění míchy nebo suprasakrálního onemocnění míchy.

Bylo rovněž neočekávaně zjištěno, že tato sloučenina otvírá draslíkový kanál. Je známo, že sloučeniny otvírající draslíkový kanál mohou tím, že způsobují otevření draslíkového kanálu způsobovat relaxaci hladkých svalů. Ačkoli tento vynález není vázán teorií, má se v souladu s tím za to, že tato sloučenina způsobuje otevírání draslíkových kanálů v buňkách močového měchýře, čímž relaxuje tkáň hladkých svalů močového měchýře, a zabraňuje tak nekontrolovaným stahům močového měchýře, které mohou způsobovat inkontinenci moči, nebo je zmírňuje. Nurse D. A., Restorick J. M. a Mundy A. R., British Journal of Urology, (1991), 68, 27 - 31, popisují, že o cromakalimu, který je dobře známý jako látka otevírající draslíkový kanál, bylo zjištěno, že je účinný v předběžných klinických pokusech při ošetření inkontinence moči.

V souladu s tím vynález popisuje sloučeninu (S)–(–)–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–4,6,7,8–tetrahydro–5(1H)–chinolon a jeho farmaceuticky přijatelné soli.

Je třeba vzít v úvahu, že tato sloučenina může vykazovat polymorfismus a může tvořit solváty. Rozumí se, že vynález zahrnuje jakoukoli polymorfní formu, nebo solvát, nebo jejich směsi, která je vhodná pro relaxaci hladkého svalstva močového měchýře, přičemž v oboru je dobře známo, jak stanovit zda je sloučenina schopná relaxovat hladké svalstvo močového měchýře pomocí standardních testů popsaných dále. Stereochemie této sloučeniny byla nejprve označena jako (–), a poté bylo zjištěno, že absolutní stereochemie je (S). Může být tedy výhodné použít tuto sloučeninu ve formě, která je charakterizována tím, že obsahuje například alespoň 95 %, 98 % nebo 99 % enantiomerního nadbytku (S)–(–)– formy.

Sloučeninu podle vynálezu lze připravit pomocí způsobů, mezi které patří způsoby známé v oboru chemie pro přípravu strukturně analogických sloučenin. Takové způsoby přípravy (S)–(–)–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–4,6,7,8–tetrahydro–5(1H)–chinolonu tvoří další provedení vynálezu a ilustrují je následující způsoby. Takový způsob lze provést obecně dekarboxylací odpovídající (S)–(–)– formy karboxylové kyseliny vzorce II.



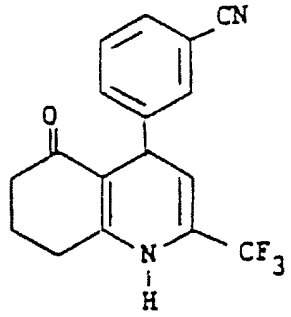
(II)

Dekarboxylační reakci lze účelně provádět při zvýšené teplotě například v rozmezí od 50 °C do 250 °C, výhodně v rozmezí od 190 °C do 220 °C bez kyselého katalyzátoru, zejména 130 °C až 185 °C (například za použití topného pláště) a výhodně v rozmezí od 90 °C do 120 °C s kyselým katalyzátorem. Dekarboxylační reakci nekatalyzovanou kyselinou lze provádět v nezředěné tavenině, nebo v inertním rozpouštědle s vhodnou teplotou varu, jako je difenylether nebo N–methylpyrrolidin–2–on. Výhodným rozpouštědlem je N–methylpyrrolidin–2–on. Mezi vhodná rozpouštědla pro dekarboxylaci katalyzovanou kyselinou patří alkoholy, například

methanol nebo ethanol, dimethylsulfoxid, aromatické uhlovodíky jako je toluen, ethery, jako je například 1,2–dimethoxyethan nebo diglym a N–methylpyrrolidin–2–on. Jako kyselý katalyzátor lze účelně použít koncentrovanou kyselinu sírovou, kyselinu fosforečnou, kyselinu chlorovodíkovou, kyselinu bromovodíkovou, kyselinu jodovodíkovou, silné organické kyseliny, jako je kyselina trifluoroctová a organické sulfonové kyselina, jako je kyselina methansulfonová nebo p–toluensulfonová. Reakci lze účelně provádět bez ředidel při teplotě odpovídající teplotě táni materiálu nebo vyšší.

(S)–(–)–forma karboxylové kyseliny vzorce II se účelně připraví rozštěpením odpovídající racemické karboxylové kyseliny vzorce II. Účelným způsobem rozštěpení sloučeniny vzorce II je vytvoření rozštěpené soli kyseliny, například za použití S–(–)–α–methylbenzylaminu. Sůl se izoluje a poté se okyselí, čímž se uvolní rozštěpená karboxylová kyselina vzorce II. Překrystalování se výhodně provádějí při teplotě 75 °C nebo nižší a výhodně bez třepání.

Alternativně lze surovou racemickou sloučeninu vzorce I rozštěpit za použití chirální kolony, za vzniku sloučeniny vzorce I.

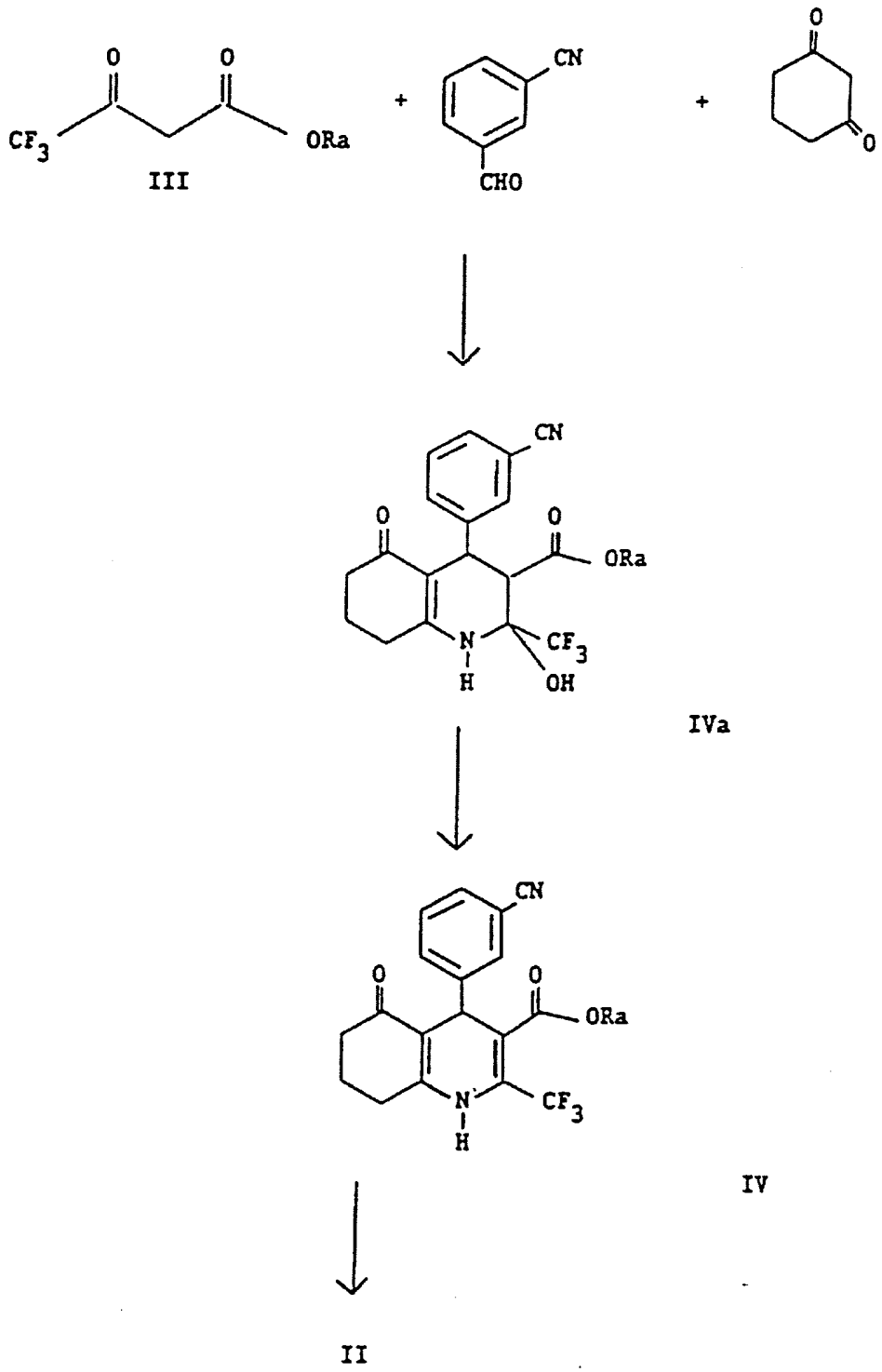


(I)

Pokud nejsou komerčně dostupné, lze materiály nutné pro tyto způsoby, jako jsou popsány níže, připravit pomocí postupů vybraných ze standardních postupů organické chemie, postupů, které jsou analogické syntéze známých, strukturně podobných sloučenin, nebo postupů, které jsou analogické výše popsanému postupu nebo postupům popsaným v příkladech.

Meziprodukt vzorce II lze připravit jak je znázorněno na schématu I.

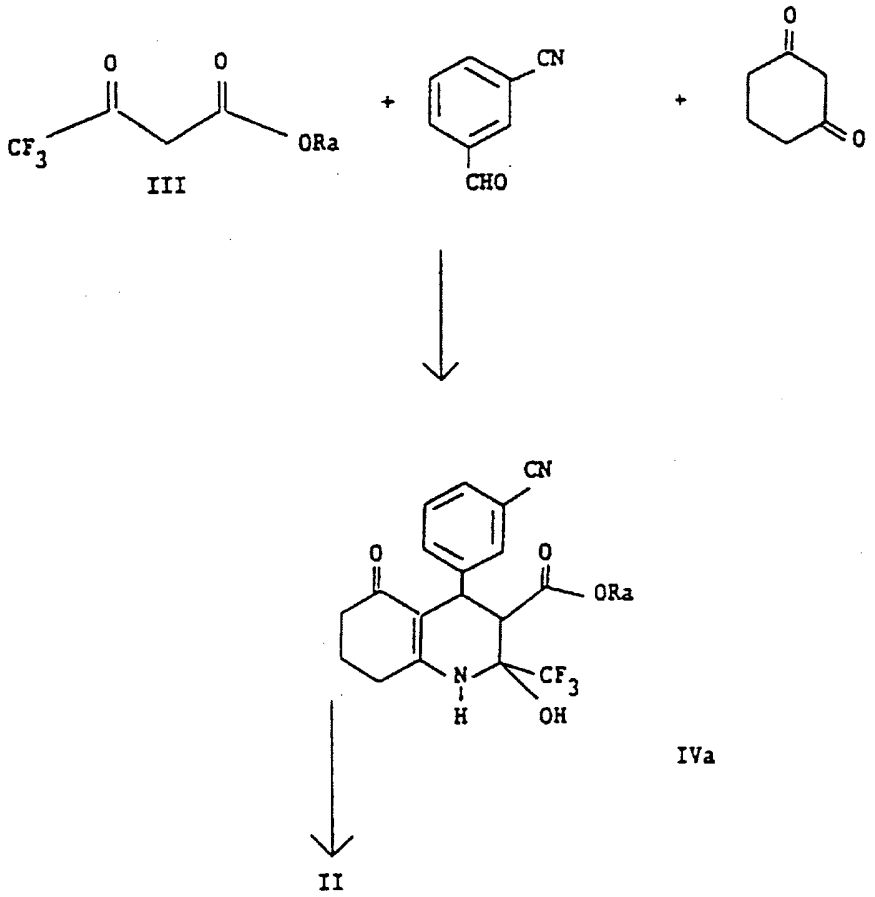
Schéma I



Ve schématu I se ester acetoctové kyseliny obecného vzorce III nebo jeho hemiacetal, ve kterém zbytek ORa představuje zbytek alkoholu, který tvoří ester který lze štěpit za mírně bazických podmínek, jako je například 2–kyanethoxyester, podrobí reakci s 3–kyanbenzaldehydem a 1,3–cyklohexandionem za vzniku alkoholu obecného vzorce IVa. Dehydratací alkoholu se získá ester obecného vzorce IV, který lze zmýdelnit za vzniku kyseliny vzorce II.

Meziprodukt vzorce II lze alternativně připravit jak je znázorněno ve schématu II.

Schéma II



Ve schématu II se ester acetoctové kyseliny obecného vzorce III nebo jeho hemiacetal, ve kterém zbytek ORa představuje zbytek alkoholu, který tvoří ester který lze snadno štěpit kyselinou, jako je například isobornylester, podrobí reakci s 3–kyanbenzaldehydem a 1,3–cyklohexandionem za vzniku alkoholu obecného vzorce IVa. Dehydratací alkoholu se získá ester obecného vzorce IV, který lze zmýdelnit za vzniku kyseliny vzorce II.

Kysele katalyzovanou dehydratací a hydrolýzou sloučeniny obecného vzorce IVa, například za podmínek podobných podmínkám popsaným v příkladech, se získá sloučenina vzorce II. Kyselým katalyzátorem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce IV ze sloučeniny obecného vzorce IVa může být libovolný z kyselých katalyzátorů uvedených výše a výhodně je jím kyselina p–toluensulfonová. Kyselým katalyzátorem pro přípravu sloučeniny vzorce II ze sloučeniny obecného vzorce IVa je výhodně kyselina p–toluensulfonová. Reakce se výhodně provádí za přítomnosti inertního rozpouštědla, jako je toluen nebo kyselina octová. Za účelem zabránění dekarboxylaci je rozpouštědlo výhodně bezvodé, například je jím ledová kyselina octová.

Pro další minimalizaci dekarboxylace je třeba teplotu reakce udržovat na maximálně 104 °C, výhodně v rozmezí od 100 °C do 104 °C, zejména 102 °C až 104 °C.

Isobornylester lze připravit reesterifikační reakcí isoborneolu a ethyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu a 2–kyanethylhemiacetal 2–kyanethyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu reesterifikační reakcí 3–hydroxypropionitrilu a ethyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu.

Způsoby přípravy sloučeniny vzorce I a meziproduktů pro její přípravu tvoří další provedení vynálezu.

Farmaceuticky přijatelné soli lze získat za použití standardních postupů dobře známých v oboru, například reakcí sloučeniny podle vynálezu s vhodnou kyselinou nebo bází poskytující fyziologicky přijatelný protion.

Při použití k ošetření inkontinence moči se sloučenina podle vynálezu obecně podává ve formě vhodného farmaceutického prostředku, který obsahuje tuto sloučeninu spolu s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo nosičem, přičemž je prostředek přizpůsoben konkrétnímu vybranému způsobu podání. Takové prostředky tvoří další provedení vynálezu.

Podle dalšího provedení tedy vynález popisuje farmaceutický prostředek, který obsahuje sloučeninu podle vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl, jak jsou definovány výše, a farmaceuticky přijatelné ředidlo nebo nosič.

Prostředky lze získat za použití běžných postupů a nosných a pomocných látek a pojiv, a mohou být v řadě různých dávkovacích forem. Mohou být například ve formě tablet, kapslí, roztoků nebo suspenzí pro orální podání, ve formě čípků pro rektální podání, ve formě sterilních roztoků nebo suspenzí pro podání intravenózní, intravesikulární, subkutánní nebo intramuskulární injekcí nebo infuzí, nebo ve formě náplasti pro transdermální podání.

Vynález dále popisuje způsob ošetření inkontinence moči, při kterém se savci, který takové ošetření potřebuje, podá účinné množství sloučeniny podle vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

Ošetření za použití sloučeniny podle vynálezu může být léčebné nebo terapeutické, jako v případě podání této sloučeniny po vzniku nebo rozvinutí inkontinence moči u pacienta. Ošetření může být rovněž profylaktické nebo prospektivní, kdy se tato sloučenina podá v případě očekávání že by se inkontinence moči mohla rozvinout, například u pacienta, který trpěl inkontinencí v minulosti.

Podle dalšího provedení vynález popisuje použití sloučeniny podle vynálezu pro výrobu léčiva pro ošetření inkontinence moči.

Jelikož tato sloučenina způsobuje otevírání buněčných draslíkových kanálů, může být rovněž vhodná jako terapeutické činidlo při ošetření jiných stavů nebo onemocnění, při kterém je žádoucí působení terapeutického činidla, které otevírá draslíkové kanály nebo je o něm známo, že způsobuje zlepšení. Mezi takové stavy nebo onemocnění patří vysoký tlak, astma, periferní cévní choroba, pravé selhání srdce, městnavé selhání srdce, angina, ischemická choroba srdeční, cerebrovaskulární choroba, glaukom, ledvinová kolika, poruchy spojené s ledvinovými kameny, syndrom dráždivého tračníku, plešatost mužského typu, předčasné porodní stahy a peptické vředy.

Dávka sloučeniny, která se podává, se nutně liší v závislosti na principech dobře známých v oboru, přičemž se přihlíží ke způsobu podání, závažnosti inkontinence a velikosti a věku pacienta. Obecně se sloučenina podává teplokrevnému živočichovi (jako je člověk) tak, že obdrží účinnou dávku, obecně denní dávku více než 0,005, například v rozmezí přibližně 0,01 až přibližně 10 mg/kg tělesné hmotnosti. Výhodně se sloučenina podává orálně v tomto rozmezí dávek.

Odborníkovi je zřejmé, že sloučeninu podle vynálezu lze podávat společně s dalšími terapeutickými nebo profylaktickými činidly nebo/a léčivy, která s ní nejsou medikálně nekompatibilní.

Působení sloučeniny podle vynálezu jako látky relaxující hladké svalstvo vhodné jako terapeutické činidlo pro ošetření inkontinence moči v důsledku toho, že způsobuje otvírání draslíkových kanálů a hyperpolarizuje membránový potenciál v hladkém svalstvu detrusoru močového měchýře lze prokázat za použití vhodně sestavených testů in vitro, jako je test popsaný níže. Sloučenina podle vynálezu vykazuje v tomto testu hodnotu IC_{50} 4,2 μM. Hodnota "IC_{50}" je dobře známý termín a označuje koncentraci testované sloučeniny, která způsobuje 50 % snížení stahů tkáně močového měchýře in vitro, jak je popsáno v následujícím testu.

Samci albinotických morčat (Hartley) o hmotnosti 450 až 500 g se usmrtí asfyxií způsobenou oxidem uhličitým a rychle se nechají vykrvácet. Otevře se spodní část břišní dutiny a izoluje se močový měchýř. Měchýř se očistí od okolní pojivové a tukové tkáně a část nad vyústěními močovodů se oddělí a promyje se v pufrovacím roztoku (Krebs-Henseleit) následujícího složení: 118,0 mM chloridu sodného, 4,7 mM chloridu draselného, 1,2 mM síranu hořečnatého, 1,2 mM dihydrogenfosforečnanu draselného, 2,5 mM chloridu vápenatého, 25,0 mM hydrogenuhličitanu sodného a 11,1 mM d–glukosy. Roztok se zahřeje na teplotu 37 °C a probublává se 95 % kyslíku a 5 % oxidu uhličitého. Při intenzivním probublávání by měl roztok mít pH blízko hodnoty 7,4.

Klenba promytého močového měchýře se odřízne a oddělí. Zbylá část měchýře se umístí na gázu do Petriho misky obsahujícího pufrovací roztok. Nůžkami se provede podélný řez ve středu ventrální části pro otevření měchýře. Pásy odříznuté z okraje klenby a spodní části se odstraní. Zbývající střední část detrusoru se rozřízne na dva horizontální pásy o šířce přibližně 2,0 mm. Tyto dva pásy se ještě dále rozpůlí ve středu dorzální části, čímž se vytvoří čtyři pásy o podobných rozměrech. Každý pás tedy obsahuje jak dorzální, tak ventrální stranu měchýře.

Dva konce každého pásu se upevní na skleněnou nosnou tyčinku a transduktor posunu síly (Grass model FR03) černým hedvábným proplétaným stehem (4-0).

Transduktory se připojí na polygraf (Grass model 7E), který je kalibrován 5 mV/cm a linearita kalibrace se ověří hmotnostmi 5 a 0,5 gramů. Analogové signály elektrických výstupů z polygrafu se digitalizují pomocí systému zpracování signálu Modular Instrument Micro 5000 za použití softwaru Biowindow Data Acquisition Software, provozovaného pod operačním systémem Microsoft OS/2 na IBM-kompatibilním osobním počítači.

Pásy detrusoru na skleněné tyčince se umístí do 20 ml tkáňové lázně a nechají se ekvilibrovat s předběžným zatížením 2 g. V průběhu následující ekvilibrační doby 45 až 60 minut se tkáň promývá v 15-minutových intervalech čerstvým pufrovacím roztokem, přičemž se, v případě potřeby, před promytím tenze upraví na 2 g. Po ekvilibrační době se aplikuje podněcovací dávka 15 mM chloridu draselného (celková koncentrace v lázni). Tkáň se promyje po 10 minutách a poté se promyje ještě dvakrát v 15-minutových intervalech, přičemž se před každým promytím tenze upraví na 2 g.

Když se tkáň po konečném promytí relaxuje do stabilního stavu, opět se aplikuje 15 mM chloridu draselného. Jakmile myogenní aktivita tkáně dosáhne stabilního stavu, získají se pomocí systému Biowindows Data Acquisition System údaje základní hodnoty, zprůměrováním 5 minut myogenních dat získávaných při 32 Hz. Jakmile se stanoví základní hodnota, dávkuje se experimentální sloučenina kumulativním způsobem s přírůstkem poloviny logaritmické jednotky. Kontaktní doba činí pro každou dávku 10 minut, přičemž konečných 5 minut je doba, kdy se získávají údaje odpovědi na dávku. Pokud 30 μM testované sloučeniny neodstraní mechanickou aktivitu detrusoru, dávkuje se poté 30 μM cromakalimu, látky, o které se předpokládá že otevírá draslíkové kanály, pro stanovení maximální odpovědi. Účinek sloučeniny v každé dávce se vyjádří jako procento maximální inhibiční odpovědi, které se dále normalizuje s ohledem na odpovídající účinek kontroly s nosným prostředím sloučeniny. Normalizovaná odpověď se poté použije pro odvození hodnoty IC_{50} relaxační účinnosti testované sloučeniny pomocí aplikace

Marquardtovy nelineární interaktivní techniky zakreslování křivky do standardní funkce dávka-odpověď.

Schopnost sloučeniny otevírat draslíkové kanály v hladkém svalu detrusoru lze dále demonstrovat druhým testem in vitro. Tento druhý test in vitro je podobný testu popsaném výše, pokud jde o přípravu tkáně a získávání údajů. Jsou však provedeny následující rozdíly. V tomto druhém testu se stahu pásů detrusoru během podněcování a po ekvilibrační době dosáhne 80 mM místo 15 mM chloridu draselného (celková koncentrace v lázni). Po této vysoké stimulaci chloridem draselným je v tkáni evidentní trvalá tenze, jelikož vápníkové kanály citlivé na napětí byly otevřeny pro umožnění přítoku vápníku do buněk a pro vznik tonické tenze. Tato tenze je zcela odstraněna 300 μM papaverinu, který se v tomto testu tudíž použije pro stanovení maximální odpovědi.

Typické látky blokující vápníkové kanály, jako je nifedipin, nimodipin, isradipin a verapamil, jsou v obou testech v důsledku jejich blokovacího působení na vápníkové kanály schopné relaxovat a snižovat myogenní aktivitu pásů detrusoru morčete. Všechny z výše uvedených látek blokujících vápníkové kanály jsou však účinnější v druhém testu při použití 80 mM chloridu draselného, než v prvním testu při použití 15 mM chloridu draselného. Naproti tomu, zatímco látka o které se předpokládá že otevírá draslíkové kanály, cromakalim, vykazuje v prvním testu silnou relaxační účinnost s hodnotou IC_{50} v rozmezí 0,6 až 0,9 μM, vykazuje tato látka v druhém testu při koncentracích až 30 μM nepatrnou relaxační účinnost. Skutečnost že sloučenina podle vynálezu vykazuje vyšší relaxační účinnost v prvním testu než ve druhém testu tedy svědčí o tom, že tato sloučenina působí jako látka otevírající draslíkové kanály. Tato sloučenina vykazuje v tomto druhém testu hodnotu IC_{50} 41,1 μM.

Schopnost této sloučeniny působit na tkáň močového měchýře jako látka otevírající draslíkové kanály lze dále demonstrovat standardním testem, který měří účinek testovaných sloučenin na odtok rubidia (^{86}Rb) nebo draslíku (^{42}K) z tkáně.

Odborníkovi je dále zřejmé, že lze účinnost sloučeniny podle vynálezu demonstrovat pomocí standardních testů in vivo. Dále je uveden popis takového standardního testu, který lze použít pro stanovení zda je testovaná sloučenina účinná, a kromě toho zda testovaná sloučenina vykazuje při orálním podání selektivitu pro močový měchýř bez podstatných kardiovaskulárních účinků.

Samci krys (Wistar) o hmotnosti 400 - 500 g se anestetizují intraperitoneální dávkou 50 mg/kg Nembutalu. Každé kryse se vyholí břišní oblast a přední a zadní část krku a na kůži se aplikuje povidon-jód. Pro katetrizaci karotidy se levá krční tepna obnaží pomocí ventrálního cervikálního řezu. Obnažená oblast se omyje 2 % roztokem lidokain-hydrochloridu pro relaxaci cévy. Katetr, naplněný 0,9 % fyziologickým roztokem, se zavede přibližně 2,4 cm do artérie, takže se jeho špička dostane do aortálního oblouku. Distální konec katetru se vyvede na povrch na zadní části krku, naplní se heparinem (1000 jednotek/ml) a tepelně se uzavře. Pro katetrizaci močového měchýře se měchýř obnaží pomocí řezu ve střední části břicha. Břišním svalem se prostrčí trokar přibližně 1 cm od horní části řezu a poté se subkutánně prostrkuje až se objeví nad kůží na zadní straně krku. Trokarem se prostrčí katetr naplněný fyziologickým roztokem. Malý otvor v klenbě močového měchýře se vytvoří kauterem Accu-Temp. Katetr se umístí do měchýře a upevní se podvázáním hedvábím 4-0. Katetr se promyje fyziologickým roztokem a zaznamená se průchodnost. Vnější konec katetru se tepelně uzavře pro zabránění unikání moči. Břišní svaly a kůže se zašijí. Oba katetry se navléknou do upínacího knoflíku z nerezavějící oceli (Instech), který se poté přišije k subkutánnímu svalu v místě vyvedení na povrch. Kůže se nad knoflíkem uzavře zašitím. Zvířata se nechají probrat z anestezie.

24 - 48 po chirurgickém zákroku se každá z krys umístí do metabolické klece a napojí se upínacím knoflíkem na pružinový upevňující a otáčivý systém (Instech), čímž se zabrání poškození

katetrů a zvířatům se umožní volný pohyb v kleci. Katetr z karotidy se napojí na transduktor tlaku Gould P23XL pro měření tlaku krve. Katetr z močového měchýře se napojí na čerpadlo pro infuzi fyziologického roztoku a na transduktor tlaku pomocí hadic PE50 a čtyřcestného uzavíracího kohoutu. Pod klec se umístí váhy se svrchním plněním se sběrnou nádobou pro měření výdeje moče.

Krysy se zváží, provede se imitace orální dávky (zavede se dávkovací jehla, ale nevytlačí se žádná kapalina) a započne se s transvesikální infuzí fyziologického roztoku (0,18 ml/min), ve které se pokračuje během celého pokusu. Změny v tlaku krve, srdeční frekvenci, intravesikálním tlaku a výdeji moče se zaznamenávají na záznamovém systému Grass Polygrapf nebo Gould TA4000. Zvířata se nechají ekvilibrovat až se močení stabilizuje (přibližně 45 - 90 minut). V tomto okamžiku se zaznamená základní hodnota každého pokusného parametru a krysám se orálně podá příslušná dávka testované sloučeniny (v nosném prostředí tvořeném 75 % PEG 400 ve fyziologickém roztoku) v takových koncentracích, že objem činí 1 ml/kg tělesné hmotnosti. Účinky sloučeniny na pokusné parametry se sleduje po dobu pěti hodin po podání.

Výsledky pokusů týkající se intervalu mezi stahy a rovněž srdeční frekvence se vyjádří jako průměr ± standardní odchylka měření procenta změny od základní hodnoty, přičemž každé zvíře si slouží jako vlastní kontrola. MAP se vyjádří jako průměr ± standardní odchylka měření změny mm Hg (1 mm Hg = 133,3220 Pa) od základní hodnoty.

Sloučenina podle vynálezu je účinná ve výše popsaných testech, přičemž je účinná a selektivní pro močový měchýř bez podstatných kardiovaskulárních účinků, při orální dávce například 3 mg/kg ve výše popsaném in vivo testu.

Vynález ilustrují následující příklady, kterými se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje. V těchto příkladech, pokud není uvedeno jinak, platí že:

(i) operace se provádějí při teplotě místnosti,tj. při teplotě v rozmezí 18 až 25 °C,

(ii) organické roztoky se vysušují nad bezvodým síranem hořečnatým, odpařování rozpouštědla se provádí na rotační odparce za sníženého tlaku (600 až 4000 Pa) s teplotou lázně až 60 °C,

(iii) termín "chromatografie" označuje velmi rychlou chromatografii, termín "chromatografie s obráceným fázemi" označuje velmi rychlou chromatografii na oktadecylsilanem (ODS) potaženém nosiči s průměrem částic 32 - 74 μm, známém jako "PREP–40–ODS" (Art 731740-100 od firmy Bodman Chemicals, Aston, PA, USA), chromatografie na tenké vrstvě (TLC) se provádí na silikagelových deskách,

(iv) průběh reakcí byl obecně sledován pomocí chromatografie na tenké vrstvě a reakční doby jsou uvedeny pouze pro ilustraci,

(v) teploty tání nejsou korigovány, uvedené teploty tání jsou hodnoty získané pro materiály připravené jak je popsáno, v případě některých příprav může polymorfismus způsobovat izolaci materiálů s odlišnými teplotami tání,

(vi) konečné produkty vykazovaly uspokojivá NMR-spektra (protonová nukleární magnetická rezonance),

(vii) výtěžky jsou uvedeny pouze pro ilustraci a nejde nutně o výtěžky, kterých lze dosáhnout pečlivým provedením postupu, pokud bylo požadováno více materiálu, byly přípravy opakovány,

(viii) pokud jsou uvedeny údaje NMR, jsou ve formě hodnot delta pro hlavní diagnostické protony, uvedených v ppm, vztažených na tetramethylsilan (TMS) jako vnitřní standard, stanovených při 300 MHz za použití perdeuterodimethylsulfoxidu jako rozpouštědla, jsou používány běžné zkratky pro tvar signálu, vazebné konstanty (coupling constants, J) jsou uvedeny v Hz, Ar tam, kde je toto označení uvedeno, představuje aromatický proton,

(ix) chemické symboly mají jejich obvyklý význam,

(x) poměry rozpouštědel jsou uváděny jako poměry objem/objem (v/v), a

(xi) měření hmotové spektrometrie (MS) byla prováděna s energií elektronů 70 elektronvoltů způsobem chemické ionizace (CI) za použití přímo exponované sondy, kde je to uvedeno, byla ionizace provedena nárazem elektronů (electron impact, EI) rychlými neutrálními částicemi (fast atom bombardment, FAB); jsou uváděny hodnoty pro m/z; obecně jsou uváděny pouze ionty, které indikují výchozí hmotu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

(S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolon

Míchaný roztok 3,93 g (10,85 mmol) (S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylové kyseliny ve 24 ml N-methylpyrrolidin-2-onu se umístí do předem zahřáté olejové lázně o teplotě 210 °C na 20 minut. Ochlazená reakční směs se poté vylije do 200 ml vody a extrahuje se dvakrát ethyletherem. Smíchané etherové extrakty se promyjí dvakrát vodou, vysuší se síranem hořečnatým, zfiltrují a rozpouštědlo se odstraní, čímž se získá špinavě bílá pevná látka. Chromatografickým zpracováním za použití směsi methylenchloridu a etheru v poměru 9:1 jako elučního činidla a triturováním se směsí ethyletheru a hexanu se získá 3,42 g (79 %) sloučeniny uvedené v názvu ve formě bílé pevné látky o teplotě tání 187 - 189 °C.

NMR: 1,88 - 1,91 (m, 2H, CH_2), 2,21 - 2,25 (m, 2H, CH_2), 2,53 - 2,64 (m, 2H, CH_2), 4,68 (d, 1H, J = 5,3 Hz, CH), 5,61 (d, 1H, J = 5,3 Hz, CH), 7,50 – 7,54 (m, 2H, Ar), 7,61 – 7,66 (m, 2H, Ar), 9,42 (s, 1H, NH)

Hmotová spektrometrie: m/z = 319 (M+1)

$[\alpha]_D^{23} = -606,8°$ (c = 0,665, methanol)

Analýza pro $C_{17}H_{13}F_3N_2O$:

vypočteno:	64,14 % C, 4,12 % H, 8,80 % N;
nalezeno:	64,07 % C, 4,24 % H, 8,78 % N.

^{19}F-NMR analýzou tohoto materiálu za přítomnosti chirálního posunového činidla (R)-(-)-1-(9-anthryl)-2,2,2-trifluorethanolu-d_{11} (v deuterochloroformu při -30 °C) se zjistí, že (S)-(-)-enantiomer je přítomen v přibližně 99 % enantiomerním nadbytku.

Intermediární (S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylová kyselina se připraví následovně:

a. (±)–isobornyl–4,4,4–trifluoracetoacetát

Směs 160,28 g (870 mmol) ethyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu a 86,81 g (563 mmol) (±)–isoborneolu se míchá při teplotě 130 °C (teplota lázně) po dobu 18 hodin pod 10 cm Vigreauxovou kolonou, která umožňuje oddestilovávání ethanolu. Teplota lázně se poté zvýší na teplotu 150 °C pro oddestilování zbytkového ethanolu. Izoluje se ho celkem 29 ml (88 % teorie). Zbylá směs se poté frakcionuje za sníženého tlaku, čímž se získá 124,6 g (76 %) (±)–isobornyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu ve formě bezbarvého oleje o teplotě varu 84 až 92 °C při tlaku 53 Pa.

NMR (deuterochloroform): 0,82 – 1,17 (m, 11H, CH_3, CH_2), 1,55 – 1,84 (m, 5 H, CH_2, CH), 3,72 (s, CH_2 diketo–formy), 4,74 – 4,81 (m, 1H, –OCH), 5,59 (s, CH enol–formy), 11,97 (s, OH enol–formy)

b. (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–2–hydroxy–5–oxo–1,2,3,4,5,6,7,8–oktahydrochinolin–3–karboxylát

Míchaná směs 82,6 g (282,8 mmol) (±)–isobornyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu, 31,7 g (282,8 mmol) 1,3–cyklohexandionu, 37,1 g (282,8 mmol) 3–kyanbenzaldehydu a 54,4 g (706,3 mmol) octanu amonného v 2070 ml ethanolu se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 4 hodin. Po odstranění vysráženého 9–(3–kyanfenyl)–3,4,6,7,9,10–hexahydro–1,8–(2H,5H)–akridindionu filtrací se filtrát zahustí ve vakuu. Chromatografickým zpracováním za použití směsi ethylacetátu a hexanu v poměru 7:3 jako elučního činidla se získá 92 g (63 %) (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–2–hydroxy–5–oxo–1,2,3,4,5,6,7,8–oktahydrochinolin–3–karboxylátu ve formě bílé pevné látky tající za rozkladu při teplotě 209 až 213 °C.

NMR: 0,63 - 0, 73 (m, 9H, CH_3), 0,86 - 1,64 (m, 7H, CH_2, CH), 1,84 - 1,88 (m, 2H, CH_2), 2,03 - 2,07 (m, 2H, CH_2), 2,34 - 2,63 (m, 2H, CH_2), 2,64 - 2,72 (m, 1H, CH), 3,92 - 3,96 (d, 1H, CH), 4,10 - 4,16 (m, 1H, CH), 7,22 - 7,25 (d, 1H, OH), 7,39 - 7,45 (m, 2H, Ar), 7,49 (s, 1H, Ar), 7,57 - 7,61 (m, 1H, Ar), 8,11 - 8,13 (d, 1H, Ar)

Hmotová spektrometrie: m/z = 517 (M+1)

Analýza pro $C_{28}H_{31}F_3N_2O_4$:

vypočteno: 65,10 % C, 6,05 % H, 5,42 % N;
nalezeno: 64,93 % C, 6,05 % H, 5,22 % N.

c. 4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylová kyselina

Míchaná směs 8,5 g (16,5 mmol) (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–2–hydroxy–5–oxo–1,2,3,4,5,6,7,8–oktahydrochinolin–3–karboxylátu, 1,05 g (5,5 mmol) p–toluensulfonové kyseliny a 170 ml toluenu se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Reakční směs tvoří nerozpustná pryskyřice, která obsahuje požadovanou kyselinu, a toluenový roztok. Pro zabránění dekarboxylaci se reakční směs zahřívá pouze tolik, aby se dosáhlo mírného varu pod zpětným chladičem. Po odstranění rozpouštědla se zbytek roztřepe mezi ethylacetát a vodu. Ethylacetátový roztok se promyje vodou, oddělí se a dvakrát se extrahuje nasyceným vodným hydrogenuhličitanem sodným. Míchané spojené hydrogenuhličitanové extrakty se ochladí v ledové lázni a po kapkách se přidává koncentrovaná kyselina chlorovodíková, až je roztok silně kyselý. Směs se extrahuje etherem a etherová vrstva se vysuší, zfiltruje a zahustí ve vakuu, čímž se získá žlutá olejovitá pryskyřice. Triturováním se směsí methylenchloridu a hexanu se získá 1,8 g (31 %) požadované karboxylové kyseliny ve formě špinavě bílé pevné látky. Tento materiál je identický pokud jde o údaje získané NMR a chromatografií na tenké vrstvě (na silikagelu za

použití 10 % methanolu v chloroformu obsahujícího několik kapek kyseliny octové jako elučního činidla) s materiálem popsaným a charakterizovaným v části i. příkladu 1.

Ethylacetátová vrstva se vysuší a odpaří, čímž se získá nečistý (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylát, který byl identický s dříve připraveným a charakterizovaným vzorkem. Jedná se bílou pevnou látku o teplotě tání 179 - 180 °C.

NMR: 0,61 - 0,72 (m, 9 H, CH_3), 1,00 - 2,6 (m, 13 H, CH_2, CH), 4,45 - 4,57 (m, 1H, CH), 4,88 - 4,92 (d, 1H, CH), 7,46 - 7,55 (m, 3 H, Ar), 7,65 - 7,69 (m, 1H, Ar), 9,70 - 9,71 (d, 1H, NH)

Hmotová spektrometrie (chemická ionizace, CH_4): 517 (M+1)

Analýza pro $C_{28\ H}d29\ F_3N_2O_4$:

vypočteno:	67,46 % C, 5,86 % H, 5,62 % N;
nalezeno:	67,29 % C, 5,99 % H, 5,71 % N.

Izolovaný (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylát se podrobí podobným podmínkám jako je popsáno v příkladu 1.c., čímž se získá dalších 1,1 g 4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylové kyseliny s celkovým výtěžkem 2,9 g (49 %).

d. Sůl (S)–(–)–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylové kyseliny s S–(–)–α–methylbenzylaminem

K míchanému roztoku 28,2 g (77,84 mmol) racemické 2–trifluormethyl–4–(3–kyanfenyl)–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylové kyseliny ve 211 ml n–butanolu se přidá 1000 ml toluenu a poté roztok 9,4 g (77,84 mmol) S–(–)–α–methylbenzylaminu ve 198 ml toluenu. Směs se nechá stát při teplotě místnosti přes noc a poté se výsledná sraženina odfiltruje, promyje se toluenem a ethyletherem, čímž se získá 32 g bílé soli. Pěti překrystalováními ze směsi toluenu a n–butanolu v poměru 3:1, se zahříváním směsi až se sůl rozpustí, se získá 7,77 g výše uvedené soli ve formě bílé pevné látky, která měkne a stává se sklovitou při teplotě 112 až 115 °C a tekutá tavenina je z ní při teplotě 148 - 150 °C.

NMR: 1,36 - 1,38 (d, 3H, CH_3), 1,75 - 1,88 (m, 2H, CH_2), 2,19 - 2,23 (m, 2H, CH_2), 2,49 - 2,61 (m, 2H, CH_2), 3,35 - 3,42 (m, vyměň., voda), 4,24 - 4,26 (q, 1H, J = 6,8 Hz. CH), 4,91 (s, 1H, CH), 7,16 - 7,60 (m, 9H, Ar)

Hmotová spektrometrie: m/z = 363 (M+1)
$[\alpha]_D$ = -180,5° (c = 1,075, methanol, 23 °C)
99 % enantiomerní nadbytek zjištěný 19F-NMR v deuterochloroformu

Analýza pro $C_{26}H_{24}F_3N_3O_3.1{,}0\ C_4H_9OH.0{,}5\ H_2O$:

vypočteno:	63,59 % C, 6,23 % H, 7,42 % N;
nalezeno:	63,66 % C, 6,15 % H, 7,06 % N.

Dalším experimentováním bylo zjištěno, že maximální teplota během překrystalování má být 75 °C pro zabránění dekarboxylaci a že v průběhu překrystalování se nemá provádět třepání, jinak je enantiomerní obohacení nízké.

e. (S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylová kyselina

K míchané suspenzi 7,5 g (15,5 mmol) soli (S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylové kyseliny s S-(-)-α-methylbenzylaminem ve 150 ml vody, chlazené v ledové lázni, se po kapkách přidává koncentrovaná kyselina chlorovodíková, až je směs silně kyselá. Směs se dvakrát extrahuje ethyletherem a etherové vrstvy se smíchají, vysuší, zfiltrují a rozpouštědlo se odstraní, čímž se získá žlutá pěna. Triturováním s dichlormethanem se získá 4,9 g (88 %) výše uvedené karboxylové kyseliny ve formě světle žluté pevné látky o teplotě tání 206 - 208 °C.

NMR: 1,74 - 1,95 (m, 2H, CH_2), 2,18 - 2,32 (m, 2H, CH_2), 2,54 - 2,73 (m, 2H, CH_2), 4,92 (s, 1H, CH), 7,47 - 7,52 (m, 3H, Ar), 7,64 - 7,68 (m, 1H, Ar), 9,60 (s, 1H, NH), 13,07 (s, 1H, COOH)

Hmotová spektrometrie: m/z = 363 (M+1)

Intermediární 4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylovou kyselinu popsanou v příkladu 1.c. lze alternativně připravit jak je popsáno v příkladu 6.

f. 2-kyanethylhemiacetal 2-kyanethyl-4,4,4-trifluoracetoacetátu

Směs 30 ml (205 mmol) ethyl-4,4,4-trifluoracetoacetátu a 7,11 g (100 mmol) 3-hydroxypropionitrilu se míchá při teplotě 150 °C (teplota lázně) po dobu 18 hodin pod 10 cm Vigreauxovou kolonou, která umožňuje oddestilovávání ethanolu. Zbytková směs se poté frakcionuje za atmosférického tlaku. O frakci destilované při teplotě 222 - 228 °C (11,71 g) se pomocí NMR a hmotové spektrometrie zjistí, že obsahuje přibližně 50 mol % 2-kyanethylhemiacetalu 2-kyanethyl-4,4,4-trifluoracetoacetátu.

NMR (deuterochloroform): 2,43 - 2,65 (m, 2H), 2,76 - 2,99 (m, 4H), 3,78 - 3,82 (m, 1H), 4,13 - 4,15 (m, 1H), 4,33 - 4,57 (m, 2H), 5,96 (s, 1H, OH)

g. 2-kyanethyl-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-2-hydroxy-5-oxo-1,2,3,4,5,6,7,8-oktahydrochinolín-3-karboxylát

Míchaná směs materiálu z příkladu 1.f. spolu se 7,34 g (56 mmol) 3-kyanbenzaldehydu, 6,83 g (56 mmol) 1,3-cyklohexandionu a 13,10 g (170 mmol) octanu amonného ve 400 ml ethanolu se míchá za varu pod zpětným chladičem po dobu 10 hodin. Ochlazený roztok se zfiltruje pro odstranění vysráženého 9-(3-kyanfenyl)-3,4,6,7,9,10-hexahydro-1,8-(2H,5H)-akridindionu. Filtrát se odpaří do sucha a zbytek se podrobí chromatografii za použití směsi methylenchloridu, směsi ethylacetátu a methylenchloridu v poměru 1 : 1 a ethylacetátu jako elučního činidla, čímž se získá 4,14 g 2-kyanethyl-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-2-hydroxy-5-oxo-1,2,3,4,5,6,7,8-oktahydrochinolin-3-karboxylátu.

NMR: 1,86 - 1,90 (m, 2H, CH_2), 1,94 - 2,18 (m, 2H, CH_2), 2,31 - 2,38 (m, 1H, alifatický), 2,50 - 2,72 (m, 3H, alifatický), 2,82 (d, 1H, alifatický. J = 11,9), 3,35 (široký s, 1H, alifatický), 3,94 - 4,02 (m, 2H, alifatický), 7,37 - 7,59 (m, 5 H, Ar, OH), 8,16 (s, 1H, NH)

Hmotová spektrometrie: m/z = 434 (M+1)

h. 2-kyanethyl-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylát

Směs 4,14 g (9,6 mmol) 2–kyanethyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–2–hydroxy–5–oxo–1,2,3,4,5,6,7,8–oktahydrochinolin–3–karboxylátu, 0,61 g (3,2 mmol) p–toluensulfonové kyseliny a 100 ml toluenu se míchá a zahřívá k varu pod zpětným chladičem za použití Dean-Starkovy aparatury po dobu 2 hodin. Reakční směs, která je tvořená tmavou olejovitou fází a toluenovou fází, se ochladí a vylije na chromatografický sloupec o průměru 3,81 cm obsahující 90 g silikagelu. Směs se na sloupci promyje malým množstvím ethylacetátu. Elucí ethyletherem a triturováním výsledné pevné látky s ethyletherem se získá 2,84 g (72 %) výše uvedeného esteru ve formě žlutooranžové pevné látky o teplotě tání 148 až 151,5 °C.

NMR: 1,79 - 1,99 (m, 2H, CH_2), 2,19 - 2,3 (m, 2H, CH_2), 2,50 - 2,74 (m, 2H, CH_2), 2,85 (t, 2H, CH_2), 4,15 - 4,27 (m, 2H, CH_2), 4,94 (s, 1H, CH), 7,47 - 7,63 (m, 3H, Ar), 7,65 - 7,67 (m, 1H, Ar), 9,84 (s, 1H, NH)

Hmotová spektrometrie: m/z = 416 (M+1)

Analýza pro $C_{21}H_{16}F_3N_3O_3$:

vypočteno: 60,72 % C, 3,88 % H, 10,12 % N;
nalezeno: 60,63 % C, 3,80 % H, 9,89 % N.

i. 4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylová kyselina

K míchané suspenzi 2,80 g (6,74 mmol) 2–kyanethyl–2–trifluormethyl–4–(3–kyanfenyl)–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylátu v 8,5 ml 1,2–dimethoxyethanu, chlazené v ledové lázni, se v průběhu 10 minut po kapkách přidá předem ochlazený roztok 0,80 g (20,0 mmol) hydroxidu sodného v 6,5 ml vody. Když se výchozí ester rozpustí, získá se tmavě hnědý roztok. Roztok se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin, poté se žlutohnědý roztok naředí 16 ml vody, vrátí se zpět na ledovou lázeň a za míchání se ke směsi přidají 2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Vysráží se hnědý olej, který při míchání tuhne za vzniku krémově zbarvené pevné látky. Tato pevná látka se odfiltruje a promyje se studenou vodou. Tento materiál se suší přes noc při teplotě 50 °C a tlaku 13,33 Pa, čímž se získá 2,33 g (95 %) výše uvedené karboxylové kyseliny, tající za rozkladu (přičemž se vyvíjí plyn) při teplotě 209 až 211 °C.

NMR: 1,75 - 1,88 (m, 1H, CH_2), 1,89 – 1,95 (m, 1H, CH_2), 2,18 – 2,32 (m, 2H, CH_2), 2,54 - 2,73 (m, 2H, CH_2), 4,92 (s, 1H, CH), 7,47 - 7,54 (m, 3H, Ar), 7,65 - 7,67 (m, 1H, Ar), 9,62 (s, 1H, NH), 13,10 (s, 1H, CO_2H)

Hmotová spektrometrie: m/z = 363 (M+1)

Analýza pro $C_{18}H_{13}F_3N_2O_3$:

vypočteno: 59,67 % C, 3,62 % H, 7,73 % N;
nalezeno: 59,53 % C, 3,84 % H, 7,69 % N.

Příklad 2

(S)–(–)–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–4,6,7,8–tetrahydro–5(1H)–chinolon

Produkt z příkladu 1 se připraví ve větším rozsahu následovně:

Míchaný roztok 50,5 g (139,4 mmol) (S)–(–)–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylové kyseliny ve 325 ml N–methylpyrrolidin–2–onu se rychle

zahřeje za použití topného pláště během 20 minut na teplotu 180 °C (měřeno vnitřním teploměrem), a poté se udržuje na této teplotě o dobu dalších 20 minut. Ochlazená reakční směs se vylije do 1200 ml vody a extrahuje se dvakrát ethylacetátem. Smíchané extrakty se promyjí dvakrát vodou, vysuší se síranem hořečnatým, zfiltrují a rozpouštědlo se odstraní, čímž se získá špinavě bílá pevná látka. Chromatografickým zpracováním za použití směsi methylenchloridu a ethylacetátu v poměru 85:15 jako elučního činidla a překrystalováním z acetonitrilu se získá 32,85 g (74 %) sloučeniny uvedené v názvu ve formě bílé pevné látky, která je identická jako produkt z příkladu 1.

Příklad 3

Intermediární (±)–isobornyl–4,4,4–trifluoracetoacetát (z příkladu 1a) se připraví ve větším rozsahu následovně:

Směs 2,75 kg (14,91 mol) ethyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu a 1,53 kg (9,93 mol) (±)–isoborneolu se míchá při teplotě 105 °C (měřeno vnitřním teploměrem) po dobu 20 hodin pod destilačním nástavcem, který umožňuje oddestilovávání ethanolu. Teplota se poté během 10 hodin postupně zvýší na 155 °C pro oddestilování zbytkového ethanolu. Izoluje se ho celkem 650 ml (114 % teorie). Zbylá směs se poté frakcionuje za sníženého tlaku, čímž se získá 2,21 kg (76 %) (±)–isobornyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu ve formě bezbarvého oleje, který je identický jako produkt z příkladu 1a.

Příklad 4

Intermediární (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–2–hydroxy–5–oxo–1,2,3,4,5,6,7,8–oktahydrochinolin–3–karboxylát (z příkladu 1b) se připraví ve větším rozsahu následovně:

Míchaná směs 830,6 g (2,86 mol) (±)–isobornyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu, 320,7 g (2,86 mol) 1,3–cyklohexandionu, 375,0 g (2,86 mol) 3–kyanbenzaldehydu a 551,0 g (7,15 mol) octanu amonného v 15,0 l ethanolu se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 8 hodin. Směs se zfiltruje pro odstranění 9–(3–kyanfenyl)–3,4,6,7,9,10–hexahydro–1,8–(2H,5H)–akridindionu. Filtrát se zahustí na poloviční objem ve vakuu. První část požadovaného produktu (657,0 g, 44,5 %) se izoluje filtrací a promyje se ethyletherem. Filtráty a promývací kapaliny se zahustí ve vakuu, zbytek se trituruje s ethyletherem a zfiltruje, čímž se získá druhá část produktu (225,0 g, 15,2 %). Tento smíchaný materiál se použije bez dalšího čištění. Vzorek se chromatograficky vyčistí za použití směsi ethylacetátu a hexanu v poměru 7:3 jako elučního činidla, čímž se získá (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–2–hydroxy–5–oxo–1,2,3,4,5,6,7,8–oktahydrochinolin–3–karboxylát ve formě bílé pevné látky, která je identická s látkou připravenou v příkladu 1b.

Příklad 5

Příprava 4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylové kyseliny (z příkladu 1c) ve větším rozsahu se provede následovně:

Míchaná směs 800,0 g (1,55 mol) (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–2–hydroxy–5–oxo–1,2,3,4,5,6,7,8–oktahydrochínolin–3–karboxylátu, 148,0 g (0,78 mol) p–toluensulfonové kyseliny a 7,5 l ledové kyseliny octové se zahřeje za použití topného pláště za 1 hodinu a 15 minut na teplotu 100 °C. Směs se udržuje po dobu 6 hodin na teplotě 102 - 104 °C, kdy chromatografie na tenké vrstvě na silikagelu za použití směsi ethylacetátu a hexanu v poměru 6:4 jako elučního činidla svědčí o tom, že reakce je dokončená. Pro minimalizaci dekarboxylace se

reakční směs zahřívá pouze tolik, aby se dosáhlo maximální teploty 104 °C. Po odstranění rozpouštědla se zbytek roztřepe mezi ethylacetát a vodu. Ethylacetátový roztok se promyje vodou, oddělí se a třikrát se extrahuje nasyceným vodným hydrogenuhličitanem sodným. Míchané spojené hydrogenuhličitanové extrakty se ochladí v ledové lázni a po kapkách se přidává koncentrovaná kyselina chlorovodíková, až je roztok silně kyselý. Směs se extrahuje ethyletherem a smíchané extrakty se vysuší síranem hořečnatým, zfiltrují a zahustí ve vakuu, čímž se získá žlutá pěna. Triturováním se směsí methylenchloridu a hexanu se získá 289,0 g (51,5 %) výše uvedené karboxylové kyseliny ve formě světle žluté pevné látky. Tento materiál je identický pokud jde o údaje získané NMR a chromatografií na tenké vrstvě (na silikagelu za použití 10 % methanolu v chloroformu obsahujícího několik kapek kyseliny octové jako elučního činidla) s materiálem popsaným a charakterizovaným v části i. příkladu 1.

Ethylacetátová vrstva se vysuší síranem hořečnatým, zfiltruje a odpaří ve vakuu, čímž se získá 490 g nečistého (±)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolonu ve formě voskové světle žluté pevné látky. Tento materiál je dále označován jako "Racemát".

Příklad 6

Intermediární (S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylová kyselina (z příkladu 1e) se připraví ve větším rozsahu následovně:

K míchané suspenzi 68,0 g (140,6 mmol) soli (S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylové kyseliny s S-(-)-α-methylbenzylaminem v 700 ml vody, chlazené v ledové lázni, se po kapkách přidává koncentrovaná kyselina chlorovodíková, až je směs silně kyselá. Směs se čtyřikrát extrahuje ethyletherem a smíchané extrakty se vysuší síranem hořečnatým, zfiltrují a rozpouštědlo se odstraní, čímž se získá 50,6 g (99 %) žluté pěny. Triturováním se směsí methylenchloridu a hexanu se získá čistý vzorek výše uvedené karboxylové kyseliny ve formě světle žluté pevné látky, která je identická s produktem z příkladu 1e.

Příklad 7

Sloučenina uvedená v názvu, (S)-(-)-4-(3-kyanfenyl)-2-trifluormethyl-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolon, se izoluje z vyčištěného Racemátu preparativní chirální chromatografií.

2,95 g surového Racemátu - materiálu získaného spojením produktů z šesti reakcí ve stejně velkém rozsahu, jak jsou popsány v příkladu 5, se chromatograficky vyčistí za použití směsi methylenchloridu a ethylacetátu v poměru 85:15 jako elučního činidla, čímž se získá 580,8 g vyčištěného Racemátu, který se dělí jak je popsáno níže. Izolace tohoto materiálu během úvodního čištění nebyla optimalizovaná.

Preparativní chirální chromatografie 580,8 g vyčištěného Racemátu se provede na koloně CHIRALPACK^{R}AD^{TM} (amylosový nosič. 10 × 50 cm, eluční činidlo: směs hexanu a ethanolu v poměru 85:15). Zásobní roztok vzorku se připraví nejprve rozpuštěním sloučeniny v ethanolu a poté ředěním tohoto roztoku hexanem až se dosáhne konečného složení rozpouštědla, které je ekvivalentní složení elučního činidla. Konečná koncentrace vzorku v připraveném zásobním roztoku činí 6 g/litr. Každý chromatografický cyklus se provádí injekčním nanesením 500 ml zásobního roztoku a eluováním s rychlostí průtoku 200 ml/minutu. (S)-(-)-enantiomer (sloučenina uvedená v názvu) je prvním píkem, který se z kolony vymývá, (+)-enantiomer se vymývá jako druhý. Odpařením eluátu ve vakuu se izoluje (S)-(-)-enantiomer (281,0 g, enantiomerní nadbytek 99,7 %, chemická čistota 98,6 %) ve formě špinavě bílé pevné látky. Překrystalováním

z 1000 ml acetonitrilu se získá 261,7 g sloučeniny uvedené v názvu ve formě bílé krystalické pevné látky, identické v každém směru s materiálem připraveným jak je popsáno v příkladu 1.

Příklad 8

Následující příklady ilustrují reprezentativní farmaceutické dávkovací formy obsahující sloučeninu podle vynálezu (dále označovanou "sloučenina X"), pro terapeutické nebo profylaktické použití u člověka:

(a) tableta	mg/tabletu
sloučenina X	50,0
mannitol, USP	223,75
natrium-croskarmelosa	6,0
kukuřičný škrob	15,0
hydroxypropylmethylcelulosa. USP	2,25
stearát hořečnatý	3,0

(b) kapsle	mg/kapsli
sloučenina X	10,0
mannitol, USP	488,5
natrium-croskarmelosa	15,0
stearát hořečnatý	1,5

Výše uvedené formulace lze získat pomocí běžných postupů dobře známých v oboru farmacie. Tablety lze potahovat činidly chránícími účinnou látku před působením žaludečních šťáv pomocí běžných způsobů, například pro vytvoření povlaku z acetát-ftalátu celulosy.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. (S)-(-)-2-Trifluormethyl-4-(3-kyanfenyl)-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolon a jeho farmaceuticky přijatelné soli.

2. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje (S)-(-)-2-trifluormethyl-4-(3-kyanfenyl)-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolon podle nároku 1 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, a farmaceuticky přijatelné ředidlo nebo nosič.

3. Způsob přípravy (S)-(-)-2-trifluormethyl-4-(3-kyanfenyl)-4,6,7,8-tetrahydro-5(1H)-chinolonu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje dekarboxylaci (S)-(-)-2-trifluormethyl-4-(3-kyanfenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-karboxylové kyseliny, která se provádí při teplotě od 50° C do 250° C.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se dekarboxylace provádí při teplotě v rozmezí od 190 °C do 220 °C.

5. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se dekarboxylace provádí v inertním rozpouštědle s vhodnou teplotou varu.

6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se jako inertní rozpouštědlo použije N–methylpyrrolidin–2–on.

7. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se dekarboxylace provádí za přítomnosti kyselého katalyzátoru.

8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že se dekarboxylace provádí při teplotě v rozmezí od 90 °C do 120 °C.

9. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že kyselým katalyzátorem je koncentrovaná kyselina sírová nebo kyselina p–toluensulfonová.

10. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že se kyselinou katalyzovaná dekarboxylace provádí za přítomnosti rozpouštědla vybraného ze skupiny zahrnující alkoholy, dimethylsulfoxid, aromatické uhlovodíky, ethery a N–methylpyrrolidin–2–on.

11. Způsob přípravy (S)–(–)–2–trifluormethyl–4–(3–kyanfenyl)–4,6,7,8–tetrahydro–5(1H)–chinolonu, **vyznačující se tím**, že se (±)–isobornyl–4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl –2–hydroxy–5–oxo–1,2,3,4,5,6,7,8–oktahydrochinolin–3–karboxylát dehydratuje působením p–toluensulfonové kyseliny v přítomnosti v podstatě bezvodého rozpouštědla a provede se hydrolýza za vzniku 4–(3–kyanfenyl)–2–trifluormethyl–5–oxo–1,4,5,6,7,8–hexahydrochinolin–3–karboxylové kyseliny, která se rozštěpí na enantiomery, a získaný (S)–(–)–enantiomer se dekarboxyluje při teplotě od 50° C do 250° C.

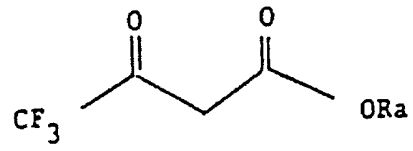
12. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že se jako rozpouštědlo použije ledová kyselina octová.

13. Způsob podle nároků 11 nebo 12, **vyznačující se tím**, že se dehydratace provádí při teplotě 100 až 104 °C.

14. Způsob podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že se dehydratace provádí při teplotě 102 až 104 °C.

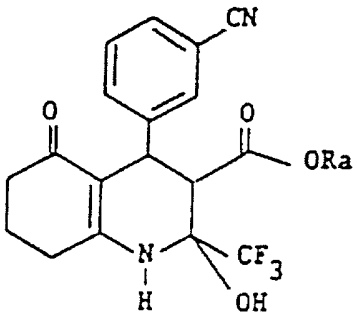
15. Způsob přípravy (S)–(–)–2–trifluormethyl–4–(3–kyanfenyl)–4,6,7,8–tetrahydro–5(1H)–chinolonu, **vyznačující se tím**, že se

(i) ester acetoctové kyseliny obecného vzorce III nebo jeho hemiacetal



(III)

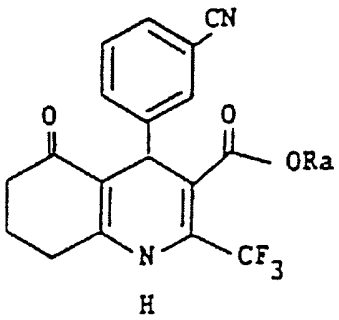
ve kterém zbytek ORa představuje zbytek alkoholu, podrobí reakci s octanem amonným, 3–kyanbenzaldehydem a 1,3–cyklohexandionem za vzniku sloučeniny obecného vzorce IVa



(IVa)

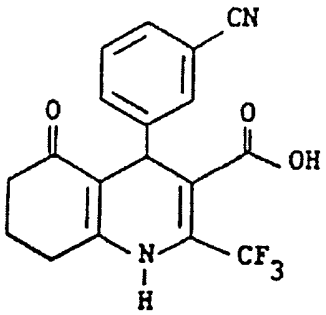
a

(ii) buď se dehydratuje sloučenina obecného vzorce IVa za vzniku sloučeniny obecného vzorce IV



(IV)

a sloučenina obecného vzorce IV se zmýdelní za vzniku kyseliny vzorce II,



(II)

nebo se sloučenina obecného vzorce IVa podrobí kyselinou katalyzované dehydrataci a hydrolýze za vzniku kyseliny vzorce II,

(iii) sloučenina vzorce II se rozštěpí na enantiomery překrystalováním ve formě soli s S–(–)–α–methylbenzylaminem z rozpouštědla, a

(iv) rozštěpená sloučenina vzorce II se dekarboxyluje při teplotě od 50° C do 250° C.

16. Způsob přípravy podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že se použije sloučenina obecného vzorce III, ve kterém zbytek ORa představuje zbytek alkoholu, který tvoří ester který lze štěpit za mírně bázických podmínek.

17. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že se použije sloučenina obecného vzorce III, ve kterém zbytek Ra znamená 2–kyanethylovou skupinu.

18. Způsob přípravy podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že se použije sloučenina obecného vzorce III, ve kterém zbytek ORa tvoří ester který lze štěpit za kyselých podmínek.

19. Způsob podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že se použije sloučenina obecného vzorce III, ve kterém zbytek Ra znamená isobornylovou skupinu.

20. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že se jako výchozí látka obecného vzorce III použije isobornyl–4,4,4–trifluoracetoacetát připravený reesterifikační reakcí isoborneolu a ethyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu za destilačních podmínek a následně se provedou kroky (i) až (iv) podle nároku 15.

21. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že se jako výchozí látka obecného vzorce III použije 2–kyanethylhemiacetal 2–kyanethyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu připravený reesterifikační reakcí 3–hydroxypropionitrilu a ethyl–4,4,4–trifluoracetoacetátu za destilačních podmínek a následně se provedou kroky (i) až (iv) podle nároku 15.

22. (S)–(–)–2–Trifluormethyl–4–(3–kyanfenyl)–4,6,7,8–tetrahydro–5(1H)–chinolon nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podle nároku 1 pro použití k ošetření inkontinence moči.

23. Použití (S)–(–)–2–trifluormethyl–4–(3–kyanfenyl)–4,6,7,8–tetrahydro–5(1H)–chinolonu podle nároku 1 pro výrobu léčiva k ošetření inkontinence moči.

24. Použití (S)–(–)–2–trifluormethyl–4–(3–kyanfenyl)–4,6,7,8–tetrahydro–5(1H)–chinolonu podle nároku 1 pro výrobu léčiva k ošetření astmatu.

Konec dokumentu