

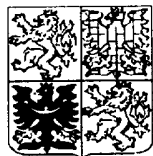
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 006

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **309-92**

(22) Přihlášeno: **04. 02. 92**

(30) Právo přednosti:
05. 02. 91 DE 91/4103372

(40) Zveřejněno: **18. 11. 92**
(Věstník č. 11/92)

(47) Uděleno: **10. 10. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 D 401/14

A 61 K 31/44

// (C 07 D 401/14,

C 07 D 213:04, C 07 D 257:04)

(73) Majitel patentu:

HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce vynálezu:

Schubert Gerrit dr., Kelkheim, DE;
Baader Ekkehard dr., Königstein/Taunus,
DE;
Bickel Martin dr., Bad Homburg, DE;
Günzler-Pukall Volkmarr dr., Marburg, DE;

(74) Zástupce:

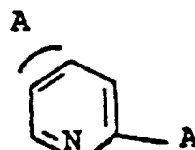
Všetečka Miloš JUDr. advokát, Žitná 25,
Praha 1, 11504;

(54) Název vynálezu:

**2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny a
farmaceutický prostředek s jejich
obsahem**

(57) Anotace:

Řešení se týká 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridinů
obecného vzorce I, ve kterém mají substituenty vý-
znamy, uvedené v popisné části, a jejich fyziologicky
přijatelných solí. Uvedené látky jsou vhodné pro
inhibici prolínhydrolázy a lysínhydroxylázy a pro
použití jako fibrosupresiva a imunosupresiva. Dále
se řešení týká farmaceutických prostředků, tyto látky
obsahujících.



(I)

CZ 283 006 B6

2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny a farmaceutický prostředek s jejich obsahemOblast techniky

5

Předmětem vynálezu jsou 2,4 a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny a farmaceutické prostředky s jejich obsahem.

10 Dosavadní stav techniky

Sloučeniny, které inhibují enzymy prolinhydroxylázu a lysinhydroxylázu, působí velmi selektivní inhibicí biosyntézy kolagenu ovlivněním hydroxylační reakce, specifické pro kolagen. Během této reakce se prolin nebo lysin, vázané na protein, hydroxylují enzymy prolinhydroxylázou, popřípadě lysinhydroxylázou. Jestliže této reakci brání inhibitory, tak vznikne nefunkční, 15 nehydroxylovaná molekula kolagenu, která může být předána buňkami jen ve velmi malém množství do extracelulárního prostoru. Nehydroxylovaný kolagen se kromě toho nemůže vestavovat do kolagenní matrice a velmi snadno se proteolyticky odbourává. V důsledku tohoto účinku se snižuje vesměs množství extracelulárně uloženého kolagenu.

20

Je známo, že inhibice prolinhydroxylázy známými inhibitory, jako α,α' -dipyridylem, vede k inhibici Cl_q -biosyntézy makrofágů /W. Müller et al., FEBS Lett. 90 /1978/. 218; Immunobiology 155 /1978/, 47/. Tím dochází k vypuštění klasické cesty aktivace komplementů. Inhibitory prolinhydroxylázy působí proto i jako imunosupresiva, například při imunokomplexních 25 onemocněních.

Je známo, že se enzym prolinhydroxyláza účinně inhibuje pyridin-2,4-dikarboxylovou kyselinou a pyridin-2,5-dikarboxylovou kyselinou /K. Majamaa et al., Eur. J. Biochem. 138 /1984/ 239-245/. Tyto sloučeniny jsou v buněčné kultuře účinné jako inhibitory ovšem jen ve velmi vysoké koncentraci./Tschank, G. et al., Biochem. J. 248 /1987/ 625-633. 30

V DE-A 34 32 094 jsou popsány diestery pyridin-2,4-dikarboxylové kyseliny a pyridin-2,5-dikarboxylové kyseliny se 1 až 6 C atomy v alkylové části esteru, jako léčiva pro inhibici prolinhydroxylázy a lysinhydroxylázy. 35

Tyto nízkoalkylované diestery mají ale ten nedostatek, že se v organismu příliš rychle štěpí na kyseliny a nedostanou se v dostatečně vysoké koncentraci na své místo působení v buňce a proto jsou méně vhodné pro podávání jako léčiva.

40 DE-A 37 03 959, DE-A 37 03 962 a DE-A 37 03 963 popisují v obecné formě směsné ester/amidy, vyšší alkylované diestery a diamidy pyridin-2,4-dikarboxylové kyseliny a pyridin-2,5-dikarboxylové kyseliny, které účinně inhibují biosyntézu kolagenu ve zvířecím modelu. Tak je v DE-A 37 03 959 mimo jiné popsána syntéza diamidu N,N' -bis(2-methoxyethyl)-pyridin-2,4-dikarboxylové kyseliny a diamidu N,N' -bis(3-isopropoxypropyl)-pyridin-2,4-dikarboxylové 45 kyseliny.

V německých přihláškách vynálezu P 38 26 471.4 a P 38 28 140.6 se navrhuje způsob výroby diamidu N,N' -bis(2-methoxyethyl)-pyridin-2,4-dikarboxylové kyseliny.

50 Německá přihláška vynálezu P 39 24 093.2 navrhuje nové diamidy N,N' -bis(alkoxyalkyl)-pyridin-2,4-dikarboxylové kyseliny.

Německá přihláška vynálezu P 40 01 002.3 popisuje použití di-/nitroxyalkyl/amidů pyridin-2,4-dikarboxylové kyseliny a pyridin-2,5-dikarboxylové kyseliny pro výrobu léčiv, inhibujících prolinhydroxylázu a lysinhydroxylázu.

- 5 Jak diamid pyridin-2,4-dikarboxylové kyseliny a pyridin-2,5-dikarboxylové kyseliny /Hirakata et al. J. pharm. Soc. Japan 77 /1957/ 219 a Härig a kol., Helv. 37 /1954/ 147, 153/, tak i dihydrazid kyseliny pyridin-2,4-dikarboxylové a kyseliny pyridin-2,5-dikarboxylové /Itai a kol., Bl. nation. hyg. Labor., Tokio, 74 /1956/ 115, 117 a Shinohara a kol., Chem. High Polymers Japan, 15 /1958/ 839/ jsou již známé jako prostředky proti tuberkulóze.

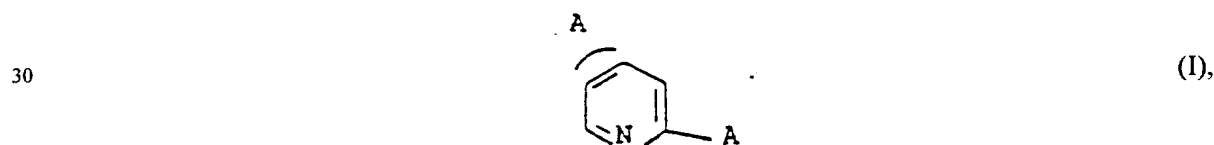
- 10 V JP 53/28175 / 78/28175// se popisují diamidy kyseliny N,N'-bis/2-nitrooxyethyl/pyridin-2,4-dikarboxylové a kyseliny N,N'-bis/2-nitrooxyethyl/pyridin-2,5-dikarboxylové jako látky s vasodilatačním účinkem.

- 15 Německá přihláška vynálezu P 40 20 570.3 popisuje použití 2,4-substituovaných a 2,5-substituovaných pyridin-N-oxidů pro výrobu léčiv, inhibujících prolinhydroxylázu a lysinhydroxylázu.

20 Podstata vynálezu

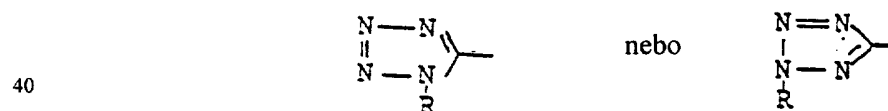
Nyní bylo překvapivě zjištěno, že 2,4-bis-tetrazolylpyridiny a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny obecného vzorce I a jejich fyziologicky přijatelné soli inhibují účinně lysinhydroxylázu a prolinhydroxylázu.

- 25 Předmětem předloženého vynálezu tedy jsou 2,4-bis-tetrazolylpyridiny a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny obecného vzorce I



ve kterém značí

- 35 A skupinu



příčemž v těchto vzorcích značí

- 45 R vodíkový atom, alkylovou skupinu s 1 až 6 uhlíkovými atomy, popřípadě substituovanou karboxylovou skupinou nebo alkoxykarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkoxyly, fenyلكarbonylovou skupinou, alkylaminokarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkylové části, přičemž alkylová skupina může být sama substituovaná alkoxy skupinou s 1 až 6 uhlíkovými atomy a dále amino karbonylovou
- 50 skupinou, přičemž dusíkový atom může být jednou, výhodně ale dvakrát, substituován alkylovou skupinou s 1 až 3 uhlíkovými atomy, arylovou skupinu se 6 až 10 uhlíkovými atomy, popřípadě substituovanou atomem halogenu, fenylalkylovou skupinu se 2 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části, nebo cykloalkylovou nebo cykloalkenylkovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy a cykloalkylalkylovou nebo cykloalkenylalkylovou

skupinu s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části a s 5 až 6 uhlíkovými atomy v cykloalkylové, popřípadě cykloalkenylové části, přičemž 1 až 3 CH₂-skupiny cyklu jsou nahrazeny heteroatomy, jako je kyslík, síra nebo dusík, nebo skupinou C=O, a popřípadě je cyklus substituovaný alkylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy,

5

jakož i jejich fyziologicky přijatelné soli.

Výhodné jsou sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém značí

- 10 R vodíkový atom, nebo alkylovou skupinu s 1 až 6 uhlíkovými atomy, substituovanou karboxylovou skupinou nebo alkoxykarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkoxyly, fenyلكarbonylovou skupinou, alkylaminokarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkylové části, nebo aminokarbonylovou skupinou,

- 15 nebo ve kterém značí

- R alkylovou skupinu s 1 až 6 uhlíkovými atomy, substituovanou fenyلكarbonylovou skupinou, alkoxykarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkoxyly, přičemž alkylová skupina je sama o sobě substituovaná alkoxy skupinou s 1 až 6 uhlíkovými atomy, nebo aminokarbonylovou skupinou, přičemž dusík je substituovaný jednou, výhodně ale dvakrát alkylovou skupinou s 1 až 3 uhlíkovými atomy,

20

nebo ve kterém značí

- 25 R aryllovou skupinu se 6 až 10 uhlíkovými atomy, obzvláště fenylovou skupinu nebo naftyllovou skupinu, popřípadě substituovanou atomem halogenu, jako je chlor nebo brom,

nebo ve kterém značí

- 30 R fenyلكalkylovou skupinu se 2 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části,

nebo ve kterém značí

- 35 R cykloalkylovou nebo cykloalkenylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy nebo cykloalkylalkylovou nebo cykloalkenylalkylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy v cykloalkylové nebo cykloalkenylové části, a s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části, a cyklus je popřípadě substituován alkylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy,

nebo ve kterém značí

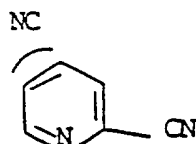
40

- R cykloalkylovou nebo cykloalkenylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy nebo cykloalkylalkylovou nebo cykloalkenylalkylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy v cykloalkylové nebo cykloalkenylové části a s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části.

- 45 Dále jsou také výhodné sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém jsou zbytky R pro oba substituenty identické nebo ve kterém jsou substituční vzory pro substituenty A (2,4 nebo 2,5) identické.

Sloučeniny obecného vzorce I se mohou vyrobit tak, že se sloučenina obecného vzorce II

50



(II)

nechá reagovat s NaN_3 a NH_4Cl ve vhodném organickém rozpouštědle.

Jestliže se mají získat sloučeniny obecného vzorce I, ve kterých R neznáčí vodíkový atom, pak se k uvedené reakci připojí ještě substituční reakce, při které se vodík nahradí odpovídajícím substituentem. Za tím účelem se k roztoku 2,4-bis-(tetrazol-5-yl)-pyridinu nebo 2,5-bis-(tetrazol-5-yl)-pyridinu ve vhodném rozpouštědle, výhodně dimethylformamidu nebo acetonu, přidá při teplotě místnosti vhodná báze, například triethylamin nebo hydroxid sodný. Potom se přidá například alkylační činidlo, popřípadě rozpuštěné v dimethylformamidu, a reakční směs se míchá nebo se zahřívá k varu pod zpětným chladičem tak dlouho, až se pomocí chromatografie na tenké vrstvě /silikagel, eluční činidlo, ethylacetát/ již nedá dokázat žádný nebo jen velmi malý edukt. Přebytké alkylační činidlo se eventuálně rozruší přidávkou koncentrovaného amoniaku. Zpracování se provádí buď

a/ odpařením směsi s bleskovým chromatografickým čištěním nebo překrystalováním zbytku, nebo

b/ rozdělením mezi vodu a vhodné rozpouštědlo, s výhodou ethylacetát nebo CH_2Cl_2 , sušením organických fází Na_2SO_4 , odpařením roztoku a bleskovým chromatografickým čištěním nebo překrystalováním zbytku.

Sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu mají cenné farmakologické vlastnosti a vykazují zejména účinnost jako inhibitory prolinhydroxylázy a lysinhydroxylázy, jako fibrosupresiva a imunosupresiva.

Aktivita fibrigenázy se může zjišťovat radioimunologickým stanovením propeptidu kolagenu typu III s terminálním N nebo příčně zesíťovaných domén kolagenu typu IV s terminálním N popřípadě C /7s-kolagen popřípadě typu IV kolagenu NC_1 / v séru.

K tomuto účelu byly měřeny koncentrace hydroxyprolinu, prokolagenu-III-peptidu, 7-s-kolagenu a kolagenu- NC_1 typu IV v játrech

a/ neošetřených krys /kontrola/,

b/ krys, jímž byl podán tetrachlormethan /kontrola CCl_4 /

c/ krys, jímž byl podán nejdříve CCl_4 a potom sloučenina podle vynálezu /tato testovací metoda je popsána Roullier C., experimental toxic injury of the liver; in The Liver C. Roullier, sv. 2, str. 335 - 476, New York, Academic Press, 1964/.

Sloučeniny obecného vzorce I se mohou používat ve formě farmaceutických preparátů, které je obsahují popřípadě spolu se snesitelnými farmaceutickými nosiči. Sloučeniny se mohou používat jako léčiva, například ve formě farmaceutických preparátů, které obsahují tyto sloučeniny ve směsi s farmaceutickým, organickým nebo anorganickým nosičem, vhodným pro enterální, perkutánní nebo parenterální aplikaci, jako například vodu, arabskou gumu, želatinu, mléčný cukr, škrob, magneziumstearát, talek, rostlinné oleje, polyalkylenglykoly, vazelinu atd.

Pro tento účel se mohou aplikovat perorálně v dávkách 0,01 až 25,0 mg/kg, s výhodou 0,01 až 5,0 mg/kg, nebo parenterálně v dávkách 0,001 až 5 mg/kg/den, s výhodou 0,001 až 2,5 mg/kg/den a nejvýhodněji 0,005 až 1,0 mg/kg/den. Dávka se může v těžkých případech i zvýšit. V mnoha případech postačí i menší dávky. Tyto údaje se vztahují na dospělou osobu s hmotností asi 75 kg.

Vynález zahrnuje dále použití sloučenin podle vynálezu při výrobě léčiv, které se používají k léčení a profylaxi výše uvedených poruch látkové výměny.

Dalším předmětem vynálezu jsou léčiva, která obsahují jednu nebo více sloučenin obecného vzorce I podle vynálezu a/nebo jejich fyziologicky snesitelné soli.

- 5 Léčiva se vyrábí o sobě známým způsobem, který je pro odborníka běžný. Jako léčiva se farmakologicky účinné sloučeniny podle vynálezu $\neq$ účinné látky/ používají buď jako takové, nebo s výhodou v kombinaci s vhodnými farmaceutickými pomocnými prostředky nebo nosiči ve formě tablet, dražé, kapslí, čípků, emulzí, suspenzí nebo roztoků, přičemž obsah účinné látky činí až asi 95 %, s výhodou se pohybuje mezi 10 až 75 %.

- 10 Vhodné pomocné prostředky, popřípadě nosiče pro požadované formulace léčiv jsou například vedle rozpouštědel, látek zamezujících žloutnutí, základních hmot pro čípky, pomocných tabletovacích směsí a jiných nosičů účinných látek i antioxidanty, dispergační činidla, emulgátory, odpěňovadla, korigencia chuti, konzervační prostředky, látky napomáhající rozpouštění nebo barviva.
- 15

Účinné látky se mohou aplikovat perorálně, parenterálně nebo rektálně.

- Účinné sloučeniny se směšují s vhodnými přísadami, jako nosiči, stabilizátory nebo inertními zředňovacími, a zpracovávají se obvyklými metodami na vhodné formy pro podávání, jako tablety, dražé, zasouvací kapsle, vodné, alkoholické nebo olejové suspenze nebo vodné nebo olejové roztoky.
- 20

- Jako inertní nosiče se mohou používat například arabská guma, magnezie, magneziumkarbonát, kaliumfosfát, mléčný cukr, glukóza nebo škrob, zejména kukuřičný škrob. Přitom se příprava může provádět jak jako suchá granulace, tak i jako granulace za vlhka. Jako olejové nosiče nebo rozpouštědla přichází v úvahu například rostlinné nebo zvířecí oleje, jako slunečnicový olej nebo rybí tuk.
- 25

- Pro subkutánní nebo intravenózní aplikaci se aktivní sloučeniny převedou popřípadě se vhodnými látkami, jako látkami, napomáhajícími rozpouštění, emulgátory nebo dalšími pomocnými látkami do roztoku, suspenze nebo emulze. Jako rozpouštědla přichází v úvahu například fyziologický roztok kuchyňské soli nebo alkoholy, například ethanol, propanol, glycerin a vedle toho i cukerné roztoky, jako roztok glukózy nebo manitu, nebo i směs různých uvedených rozpouštědel.
- 30
- 35

Příklady provedení vynálezu

- 40 Dále je vynález blíže vysvětlen pomocí příkladů.

Příklad 1

- 45 2,4-bis-/tétrazol-5-yl/-pyridin /I/

- Směs 100 g 2,5-dikyanopyridinu, 122,8 g NaN_3 a 12,8 g NH_4C byla zahřívána v 910 ml absolutního DMF 36 hodin na 80 až 100 °C. Vytvořená běžová krystalická kaše byla doplněna 500 ml vody a potom za míchání a chlazení ledem se okyselila koncentrovanou kyselinou solnou HCl až na pH 1. Vytvořená kaše se odsála, zbytek byl rozpuštěn asi v 1 l 2N roztoku NaOH za míchání a zfiltrován. Po opětovném okyselení na pH 1 koncentrovanou HCl se opět odsála a zbytek se usušil ve vakuu při 50 °C. Získalo se 165,0 g /99 %/ 1, běžových krystalů, t.t. 265 až 267 °C /rozkl./.
- 50

¹H-NMR /60 MHz, DMSO-d₆/

δ = 8,1 /dd, J = 6Hz, J' = 2Hz, 1H/, 8,8 /s, 1H/, 9,0 /d = 5Hz, 1H/, 7-10 /bs, 2H/ ppm

C₇H₆N₉ vypoč. 216, nal. 216 /M⁺ + H⁺/

5

Příklad 2

2,5-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridin /2/

- 10 230 mg 2,5-dikyanopyridin, 283 mg NaN₃, a 36 mg NH₄Cl byly suspendovány ve 3 ml absolutního DMF a 36 hodin se míchalo při 80 až 100 °C. Po ochlazení se zředilo vodou, zfiltrovalo přes amberlit IR-120 /H⁺ forma/ a dodatečně bylo opláchnuto vodou. Filtrát byl odpařen ve vakuu: 348 mg /91 %/, 2, bezbarvé krystaly, t.t. > 200 °C.

- 15 ¹H- NMR /60 MHz, DMSO-d₆/

δ = 5,5-8,0 /bs/, 8,6 /m, 2H/, 9,5 /s, 1H/ ppm.

C₇H₆N₉ vypoč. 216, nal. 216 /M⁺ + H⁺/

- 20 Příklad 3

Isomery 2,4-bis-/methyltetrazol-5-yl/-pyridinu /3a,b/

- 25 K suspenzi 1,2 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu v 15 ml acetonu bylo přidáno při teplotě místnosti 0,69 ml /11,2 mmol/ methyljodidu stříkačkou. Potom bylo přidáno tolik 2N roztoku NaOH, až vznikl jasný roztok /asi 6 ml/ a roztok se zahříval za míchání při zpětném toku k varu. Po 2 hodinách se přikapalo ještě 0,69 ml methyljodidu. Po celkové reakční době 5 hodin se ochladilo a přidalo se 10 ml koncentrovaného roztoku amoniaku. Směs se extrahovala vícekrát CH₂Cl₂, organické fáze se usušily a odpařily ve vakuu. Získalo se 2,21 g oleje, který byl čištěn tím, že se nechal projít sloupcem silikagelu /200 g/ s ethylacetátem jako elučním činidlem.

30

0,74 g 3a, bezbarvé krystaly, t.t. 198 až 198,5 °C /ethylacetát/cyklohexan/.

¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

- 35 δ = 4,5 /s, 3H/, 4,6 /s, 3H/, 8,2 /dd, J = 5Hz, J' = 2Hz, 1H/, 8,9 /d, J = 5Hz, 1H/, 9,1 /s, 1H/ ppm.

C₆H₁₀N₉ vypoč. 244, nal. 244 /M⁺ + H⁺/

jakož i 0,29 g 3b, bezbarvé krystaly, t.t. 214 až 215 °C /ethylacetát/cyklohexan/.

- 40 ¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

δ = 4,5 /s, 6H/, 8,2 /dd, J = 5Hz, J' = 2Hz, 1H/, 8,95 /d, J = 4Hz, 1H/ překryto s: 9,0 /s, 1H/ ppm.

C₉H₁₀N₉ vypoč. 244, nalez. 244 /M⁺ + H⁺/.

- 45 Příklad 4

2,5-bis-/2-methyltetrazol-5-yl/-pyridin /4/

- 50 K roztoku 1,5 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu a 1,4 ml triethylaminu v 7 ml abs. DMF bylo stříkačkou přidáno 0,85 ml CH₃I a směs se zahřívala 8 hodin za míchání pod zpětným tokem k varu. Po ochlazení bylo přidáno 10 ml koncentrovaného roztoku amoniaku. Směs byla vícekrát extrahována ethylacetátem, organické fáze se usušily a ve vakuu odpařily. Zbylý olej byl čištěn na silikagelu /200 g/ s heptan/ethylacetátem jako eluens. Bezbarvé jehličky, t.t. 225 až 226 °C.

¹H-NMR /DMSO-d₆, 60 MHz/

δ = 4,5 /s, 3H/, 4,55 /s, 3H/, 8,6 /m, 2H/, 9,5 /s, 1H/ ppm.

C₉H₁₀N₉ vypoč. 244, nal. 244 /M⁺ + H⁺/.

5

Příklad 5

Isomery 2,4-bis-/fenacyltetrazol-5-yl/-pyridinu /5a,b/

10

K suspenzi 1,5 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu v 7 ml absolutního DMF bylo přikapáno stříkačkou 1,4 ml NEt₃. K roztoku, který je nyní čirý, se za míchání při teplotě místnosti přidalo najednou 2,78 g fenacylbromidu. Po několika minutách se roztok zakalil. Po 2 hodinách se přidal ethanol, zfiltrovalo se a filtrát se ve vakuu odpařil. Zbývající žlutý olej byl chromatografován přes silikagelový sloupec /200 g/ s ethylacetátem/heptanem 2 : 1 jako eluens: 541 mg 5a, bezbarvé jemné jehličky, t.t.: 164 až 165 °C /ethylacetát/.

15

¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

δ = 6,2 /s, 1H/, 6,5 /s, 2H/, 7,7 /m, 6H/, 8,0-8,3 /sh, 5H/, 8,6 /d, J = 6Hz, 1H/, 9,2 /s, 1H/ ppm.

20

C₂₃H₁₈N₉O₂ vypoč. 452, nal. 452 /M⁺ + H⁺/,

611 mg 5b, bezbarvý krystalicky prášek, t.t. 188 až 189 °C /rozklad/.

¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

25

δ = 6,3 /s, 6H/, 7,5 /m, 6H/, 7,9-8,3 /sh, 3H/, 8,8-9,2 /m, 2H/ ppm.

C₂₃H₁₈N₉O₂ vypoč. 452, nalez. 452 /M⁺ + H⁺/.

Příklad 6

30

2,4-bis-[2-/N-2-methoxyethylacetamido/-tetrazol-5-yl]pyridin /6/

2-methoxyethylamid kyseliny chloromravenčí

35

Ke směsi 30,09 g 2-methoxyethylaminu, 100 g 20% vodného roztoku NaOH a 150 ml 1,2-dichlorethanu bylo přikapáno za mohutného míchání a chlazení na - 10 až - 15 °C 7 ml chloracetylchloridu. Po 1 hodině byly fáze odděleny a vodná fáze byla extrahována dvakrát CH₂Cl₂. Spojené organické fáze byly potom promyty po sobě 2N HCl, nasyceným roztokem NaHCO₃ a H₂O a organické fáze se usušily. Po odpaření rozpouštědla zbylo 60,3 g bezbarvého oleje, který se použije dále bez dalšího čištění.

40

Roztok 1,5 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu, 1,4 ml triethylaminu a 2,12 g 2-methoxyethylamidu chloromravenčí kyseliny v 7 ml DMF byl zahříván po přidavku KJ, kterého bylo přidáno na špičku špátle, 48 hodin na 80 °C. Potom se ochladilo, zředilo ethylacetátem a zfiltrovalo. Po zahuštění filtrátu vykristaluje 1,46 g 6, bezbarvých krystalů, t.t. 192 až 194 °C.

45

¹H-NMR /60 MHz, DMSO-d₆/

δ = 3,3 /sh, 14H/, 5,6 /bs, 4H/, 8,1-9,1 /sh, 5H/ ppm,

C₁₇H₂₄N₁₁O₄ vypoč. 446, nalez. 446 /M⁺ + H⁺/.

50

Příklad 7

2,5-bis-[2-/N-2-methoxyethylacetamido/-tetrazol-5-yl]pyridin /7/

- 5 Analogicky se vyrobil 2,4-bis-[2-/N-2-methoxyethylacetamido/-tetrazol-5-yl]pyridin. Bezbarvý krystalický prášek, t.t. 250 °C /rozklad/.

¹H-NMR /DMSO-d₆, 60 MHz/

δ = 3,1 -3,5 /sh, 14H/, 5,65 /s, 4H/, 8,3-9,0 /sh, 4H/, 9,45 /m, 1H/ ppm.

- 10 C₁₇H₂₄N₁₁O₄ vypoč. 446, nalez. 446 /M⁺ + H⁺/.

Příklad 8

- 15 2,4-bis-[2-/ftalimido-N-methyl/-tetrazol-5-yl]pyridin /8/

- Roztok 1 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu, 1 ml triethylaminu a 1,63 g chlormethylftalimidu ve 4,6 ml absolutního DMF se míchalo při teplotě místnosti 48 h, potom se odpařilo a zbytek se čistil přes silikagelový sloupec /200 g/ s ethylacetátem/heptanem 1 : 1 jako eluens/ 100 mg 8, bezbarvé krystaly s t.t. 224 až 226 °C /rozklad/.

¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

δ = 5,6 /s, 4H/, 7,0 /s, 4H/, 7,7-8,2 /sh, 8H/, 8,3 /dd, J = 5Hz, J' = 6Hz, 1H/, 9,1 /s, 1H/ ppm.

- 25 C₂₅H₁₆N₁₁O₄ vypoč. 534, nalez. 534 /M⁺ + H⁺/.

Příklad 9

- 30 2,4-bis-[2-/2,5-dioxopyrrolidon-1-methyl/-tetrazol-5-yl/-pyridin /9/

- Roztok 0,94 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu, 1,7 ml triethylaminu a 1,3 g N-chlormethylsukcinimidu v 10 ml absolutního DMF byl míchán 24 hodin při teplotě místnosti. Potom byla směs rozdělena mezi ethylacetát a vodu, organické fáze se usušily a odpařily. Zbyly 2,05 g oleje, který se čistil přes silikagelový sloupec /40 g/ ethylacetátem jako eluens. Získalo se 0,72 g 9, bezbarvé krystaly, t.t. 190 až 192 °C.

¹H-NMR /60 MHz, DMSO-d₆/

δ = 2,6 /s, 4H/, 2,7 /s, 4H/, 6,3 /s, 2H/, 6,6 /s, 2H/, 8,2 /dd, J = 5Hz, J' = 2Hz, 1H/, 8,7 /s, 1H/, 9,1 /d, J = 6Hz, 1H/ ppm.

- 40 C₁₇H₁₆N₁₁O₄ vypoč. 438, nalez. 438 /M⁺ + H⁺/.

Příklad 10

- 45 2,4-bis-[2-/N,N-dimethylkarbamoyltetrazol-5-yl/-pyridin /10/

- Roztok 0,5 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/u, 1,6 ml triethylaminu a 0,43 ml dimethylkarbamoylchloridu v 5 ml absolutního DMF se míchal 24 hodin při teplotě místnosti, přebytečný dimethylkarbamoylchlorid se rozrušil methanolem a směs se potom zahustila ve vakuu. Získalo se 1,88 g oleje, který se čistil přes silikagelový sloupec /40 g/ CH₂Cl₂/methanolem, gradient 20 : 1 až 9 : 1, jako eluens. Získalo se 0,38 g 10, bezbarvé krystaly, t.t. 150 °C /rozklad/.

¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

δ = 3,2 / s, 6H/, 3,3 /s, 6H/, 8,3 /dd, J = 5Hz, J' = 2Hz, 1H/, 9,0-9,2 /sh, 2H/ ppm.

C₁₃H₁₆N₁₁O₂ vypoč. 358, nalez. 358 /M⁺ + H⁺/.

5

Příklad 11

2,4- bis-[2-/4-methyl-1,3-dioxol-2-on-5-yl/-methyl]-tetrazol-5-yl]-pyridin /11/

10 Roztok 1,0 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu, 1,8 ml triethylaminu a 1,83 g 5-brommethyl-1,3-dioxol-4-methyl-2-onu v 10 ml absolutního DMF se míchal po dobu 5 hodin při teplotě místnosti a potom se odpařil ve vakuu. Zbytek se čistil přes silikagelový sloupec /160 g/ s n-heptanem/ethylacetátem, gradient 1 : 1 až 1 : 3, jako eluens. Získalo se 0,24 g 11, bezbarvé krystaly, t.t. 150 až 152 °C /pentan/CH₂Cl₂/.

15

¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

δ = 2,2 /s, 3H/, 2,3 /s, 3H/, 5,7 /s, 2H/, 6,15 /s, 2H/, 8,3 /d, J = 5Hz, 1H/, 8,9 /d, J = 6Hz, 1H/, 9,2 /s, 1H/ ppm.

C₁₇H₁₃N₉O₆ vypoč. 440, nalez. 440 /M⁺ + H⁺/.

20

Příklad 12

Isomery 2,4-bis-/ethoxykarbonylmethyltetrazol-5-yl/-pyridinu /12a,b/

25

Roztok 1,5 g bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu, 2,7 ml triethylaminu a 1,65 ml ethylesteru jodoctové kyseliny v 10 ml DMF se míchal 3 hodiny při 60 °C. Po kontrole reakce pomocí chromatografie na tenké vrstvě /DC/ bylo přidáno dalších 0,5 ml ethylesteru jodoctové kyseliny. Po dalších 3 hodinách se ochladil na teplotu místnosti, zředil se etherem, zfiltraval a filtrát se odpařil ve vakuu. Zbytek byl čištěn chromatograficky na silikagelovém sloupci /200 g/ s ethylacetátem jako eluens. Získalo se 1,11 g 12 a, bezbarvé krystaly, t.t. 85 až 87 °C.

30

¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

δ = 1,2 /t, J = 8Hz, 3H/, 1,4 /t, J = 8Hz, 3H/, 4,2 /q, J = 8Hz, 2H/, 4,3 /q, J = 8Hz, 2H/, 5,5 /s, 2H/, 5,75 /s, 2H/, 8,2 /dd, J=6Hz, J' = 2Hz, 1H/, 8,7 /d, J = 5Hz, 1H/, 9,2 /s, 1H/ ppm.

35

C₁₅H₁₈N₈O₄ vypoč. 388, nalez. 388 /M⁺ + H⁺/,

jakož i 0,87 g 12 b, bezbarvé krystaly, t.t. 143 až 144 °C.

40

¹H-NMR /60 MHz, CDCl₃/

δ = 1,3 /t, J = 8Hz, 3H/, 1,35 /t, J = 8Hz, 3H/, 4,25 /q, J = 8Hz, 2H/, 4,3 /q, J = 8Hz, 2H/, 5,5 /s, 4H/, 8,2 /dd, J = 6Hz, J' = 2Hz, 1H/, 9,0 /sh, 2H/ ppm.

C₁₅H₁₈N₈O₄ vypoč. 388, nalez. 388 /M⁺ + H⁺/.

45

Příklad 13

2,4-bis-[2-/2-morfolinoethyl/-tetrazol-5-yl]-pyridin /13/

50

Roztok 0,5 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu, 1,2 ml triethylaminu a 0,8 g N-/2-chloracetyl/-morfolinhydrochloridu v 5 ml absolutního DMF se míchal 5 dní při teplotě místnosti, potom se zředil etherem, zfiltraval a filtrát se odpařil ve vakuu. Zbytek se čistil chromatograficky na silikagelovém sloupci /100 g/ s CH₂Cl₂/methanolem 40 : 1 jako eluens. Získalo se 214 g 13 jako

bezbarvý, viskózní olej.

$^1\text{H-NMR}$ /60 MHz, CDCl_3 /

$\delta = 2,1$ /t, J = 5Hz, 4H/, 2,2 /t, J = 5Hz, 4H/, 2,9 /t, J = 6Hz, 2H/, 3,1 /t, J = 6Hz, 2H, 3,5 /t, J = 5Hz, 4H, 3,7 /t, J = 5Hz, 4H/, 4,9 /t, J = 6Hz, 2H/, 5,2 /J = 5Hz, 2H/, 8,2 /dd, J = 6Hz, J' = 2Hz, 1H/, 8,9 /d, J = 6Hz, 1H/, 9,1 /s, 1H/ ppm.

$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_{11}\text{O}_2$ vypoč. 442, nalez. 442 / $\text{M}^+ + \text{H}^+$ /.

10 Příklad 14

2,4-bis-/2-benzyloxymethyltetrazol-5-yl/-pyridin /14/

K roztoku 1,5 g 2,4-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu a 1,4 ml triethylaminu v 7 ml absolutní DMF bylo stříkačkou přikapáno 2,8 ml benzylchlormethyletheru a směs se míchala 2 hodiny při teplotě místnosti. Potom se doplnila ethanolem, zfiltrovala a filtrát se odpařil ve vakuu. Zbytek se čistil na silikagelovém sloupci /200 g/ ethylacetátem/heptanem 1 : 1 jako eluens. Získalo se 0,56 g 14, bezbarvý, viskózní olej. Velmi čistý produkt byl získán následující chromatografií na RP_{18} -silikagelu s eluens H_2O /acetonitrilem.

$^1\text{H-NMR}$ /60 MHz, CDCl_3 /

$\delta = 4,8$ /s, 4H/, 6,1 /2s, 4H/, 7,4 /2s, 12H/, 8,2 /dd, J = 6Hz, J' = 2Hz, 1H/, 9,0 /sh, 2H/ ppm.

$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_9\text{O}_2$ vypoč. 456, nalez. 456 / $\text{M}^+ + \text{H}^+$ /.

25

Příklad 15

Isomery 2,5-bis-/benzyloxymethyltetrazol-5-yl/-pyridinu /15a-d/

Analogicky jako u výše uvedeného předpisu se nechalo zreagovat 1,5 g 2,5-bis-/tetrazol-5-yl/-pyridinu se 2,8 ml benzylchlormethyletheru. Chromatografie surového produktu na silikagelu /200 g/ s heptan/ethylacetátem 1 : 1 jako eluátem poskytla všechny isomerní substituované produkty. V pořadí eluce se získal: 15a, bezbarvé jehličky, t.t. 103 až 104 °C /heptan/-ethylacetát/.

$^1\text{H-NMR}$ / CDCl_3 , 60 MHz/

$\delta = 4,75$ /s, 2H/, 4,80 /s, 2H/, 6,1 /s, 2H/, 6,5 /s, 2H/, 7,35 /s, 5H/, 7,40 /s, 5H/, 8,7 /sh, 2H/, 9,6 /bs, 1H/ ppm.

$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_9\text{O}_2$ vypoč. 456, nalez. 456 / $\text{M}^+ + \text{H}^+$ /.

40

15b, bezbarvý krystalický prášek, t.t. 137,5 až 138,5 °C /heptan/ethylacetát/.

$^1\text{H-NMR}$ / CDCl_3 , 60 MHz/

$\delta = 4,75$ /s, 4H/, 6,05 a 6,10 /s, je 2H/, 7,5 /s, 10H/, 8,6 /m, 2H/, 9,65 /bs, 1H/ ppm.

$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_9\text{O}_2$ vypoč. 456, nalez. 456 / $\text{M}^+ + \text{H}^+$ /.

15c, bezbarvé, jemné jehličky, t.t. 132 až 133 °C /ethylacetát/heptan/.

$^1\text{H-NMR}$ / CDCl_3 , 60 MHz/

$\delta = 4,7$ /s, 2H/, 4,8 /s, 2H/, 5,9 /s, 2H/, 6,5 /s, 2H/, 7,3 /s, 5H/, 7,4 /s, 5H/, 8,6 /d, J = Hz, 2H/, 9,4 /s, 1H/ ppm.

$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_9\text{O}_2$ vypoč. 456, nalez. 456 / $\text{M}^+ + \text{H}^+$ /.

15 d, bezbarvé měkké jehličky, t.t. 120,5 až 121 °C /heptan/ethylacetát/.

¹H-NMR /CDCl₃, 60 MHz/

δ = 4,7 /s, 4H/, 5,9 /s, 2H/, 6,1 /s, 2H/, 7,4 /s, 10H/, 8,55 /s, 2H/, 9,5 /bs, 1H/ ppm.

5 C₂₃H₂₂N₉O₂ vypoč. 456, nalez. 456 /M⁺ + H⁺/.

Test na prolyl-4-hydroxylázovou aktivitu.

10 Prolyl-4-hydroxyláza byla vyčištěna (izolována) z embryí kuřat za použití běžných standardních metod. Tento enzym byl potom inkubován po dobu 40 minut při teplotě 37 °C v objemu 50 μl, obsahujícím 0,04 M Tris/HCl, pH 7,5, 0,05 mM FeSO₄, 10 000 dpm (0,1 mM) 2-oxo[5-¹⁴C]glutarátu, 20 μg syntetického peptidu (Pro-Pro-Gly)₁₀, 1 mM askorbátu, 20 μg katalázy, 0,5 mM dithiothreitolu a 100 μg albuminu bovinního séra. Po proběhnutí inkubační doby bylo
15 přidáno 25 μl roztoku, obsahujícího 20 mM jednak neoznačeného sukcinátu, a jednak 2-oxoglutarátu (sloužící jako nosičová látka), přičemž 2-oxoglutarát byl vysrážen 25 μl 0,16 M 2,4-dinitrofenylhydrazinu ve 30 % HClO₄, což bylo provedeno běžnou standardní metodou. Radioaktivita v supernatantu odpovídala sukcinátu, přičemž byla generována z 2-oxoglutarátu účinkem prolyl-4-hydroxylázy a vztažena na aktivitu enzymu.

20 Výsledky

V popsaném testovacím systému bylo jako inhibitorů použito 2,4-bis(5-tetrazolyl)pyridinu a 2,5-bis(5-tetrazolyl)pyridinu. Hodnoty K_i byly stanoveny Lineweaver-Burkovými kinetickými metodami, přičemž bylo použito standardního postupu. Získané hodnoty byly porovnány
25 s hodnotami K_i, získanými za pomoci porovnávacích látek, tzn. 2,4- a 2,5-pyridindi-karboxylových kyselin.

Druh sloučeniny	Hodnota K _i isomeru (μM)	
	2,4-isomer	2,5-isomer
Dikarboxylové kyseliny	2,1	0,8
Bis-tetrazolylové sloučeniny	0,3	0,18

30 Diskuze

Bylo potvrzeno, že oba izomery nově objevené skupiny prolyl-4-hydroxylázových inhibitorů, tzn. 2,4- a 2,5-bis-(5-tetrazolyl)pyridin představují účinnější inhibitory prolyl-4-hydroxylázové aktivity, než odpovídající dikarboxyláty.

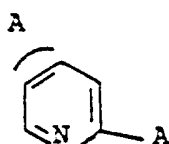
35

PATENTOVÉ NÁROKY

40

1. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny obecného vzorce I

45

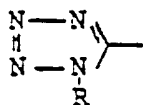


(I),

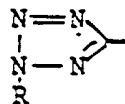
ve kterém značí

A skupinu

5



nebo



10 přičemž v těchto vzorcích značí

R vodíkový atom, alkylovou skupinu s 1 až 6 uhlíkovými atomy, popřípadě substituovanou karboxylovou skupinou nebo alkoxykarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkoxyly, fenylkarbonylovou skupinou, alkylaminokarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkylové části, přičemž alkylová skupina může být sama substituovaná alkoxy skupinou s 1 až 6 uhlíkovými atomy a dále aminokarbonylovou skupinou, přičemž dusíkový atom může být jednou, výhodně ale dvakrát, substituován alkylovou skupinou s 1 až 3 uhlíkovými atomy, arylovou skupinu se 6 až 10 uhlíkovými atomy, popřípadě substituovanou atomem halogenu, fenylalkylovou skupinu se 2 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části, nebo cykloalkylovou nebo cykloalkenylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy a cykloalkylalkylovou nebo cykloalkenylalkylovou skupinu s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části a s 5 až 6 uhlíkovými atomy v cykloalkylové, popřípadě cykloalkenylové části, přičemž 1 až 3 CH₂-skupiny cyklu jsou nahrazeny heteroatomy, jako je kyslík, síra nebo dusík, nebo skupinou C=O, a popřípadě je cyklus substituovaný alkylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy,

jakož i jejich fyziologicky přijatelné soli.

2. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároku 1 obecného vzorce I,

30

ve kterém značí

R vodíkový atom, nebo alkylovou skupinu s 1 až 6 uhlíkovými atomy, substituovanou karboxylovou skupinou nebo alkoxykarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkoxyly, fenylkarbonylovou skupinou, alkylaminokarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkylové části, nebo aminokarbonylovou skupinou.

35

3. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I,

40

ve kterém značí

R alkylovou skupinu s 1 až 6 uhlíkovými atomy, substituovanou fenylkarbonylovou skupinou, alkoxykarbonylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy v alkoxyly, přičemž alkylová skupina je sama o sobě substituovaná alkoxy skupinou s 1 až 6 uhlíkovými atomy, nebo aminokarbonylovou skupinou, přičemž dusík je substituovaný jednou, výhodně ale dvakrát alkylovou skupinou s 1 až 3 uhlíkovými atomy.

45

4. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároku 1, obecného vzorce I,

50

ve kterém značí

R arylovou skupinu se 6 až 10 uhlíkovými atomy, obzvláště fenylovou skupinu nebo naftylovou skupinu, popřípadě substituovanou atomem halogenu, jako je chlor nebo brom.

5. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároku 1, obecného vzorce I,

ve kterém značí

5

R fenylalkylovou skupinu se 2 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části.

6. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároku 1, obecného vzorce I,

10

ve kterém značí

R cykloalkylovou nebo cykloalkenylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy nebo
cykloalkylalkylovou nebo cykloalkenylalkylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy
v cykloalkylové nebo cykloalkenylové části a s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části
a cyklus je popřípadě substituován alkylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy.

15

7. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároků 1 nebo 6, obecného vzorce I,

ve kterém značí

20

R cykloalkylovou nebo cykloalkenylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy nebo
cykloalkylalkylovou nebo cykloalkenylalkylovou skupinu se vždy 5 až 6 uhlíkovými atomy
v cykloalkylové nebo cykloalkenylové části a s 1 až 6 uhlíkovými atomy v alkylové části.

25

8. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 7, obecného
vzorce I, ve kterém jsou zbytky R pro oba substituenty identické.

9. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároku 8, obecného vzorce I, ve kterém jsou
substituční vzory pro substituenty A (2,4 nebo 2,5) identické.

30

10. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároků 1 až 9 pro inhibici prolinhydrolázy a lysin-
hydroxylázy.

11. 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridiny podle nároků 1 až 9 pro použití jako fibrosupresiva
a imunosupresiva.

35

12. Farmaceutický prostředek pro ošetření poruch biosyntézy kolagenu a látek podobných
kolagenu, popřípadě biosyntézy Cl_q, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako účinnou látku
obsahuje alespoň jeden 2,4- a 2,5-bis-tetrazolylpyridin obecného vzorce I podle nároku 1 a/nebo
jeho fyziologicky neškodnou sůl.

40

45

Konec dokumentu
