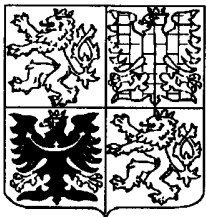


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 653-93

(13) A3

5(51)

C 07 D 209/94

A 61 K 31/40

(22) 15.10.91

(32) 15.10.91, 16.10.90, 21.12.90

(31) 91GB/9101791, 90/9022453, 90/9027895

(33) WO, GB, GB

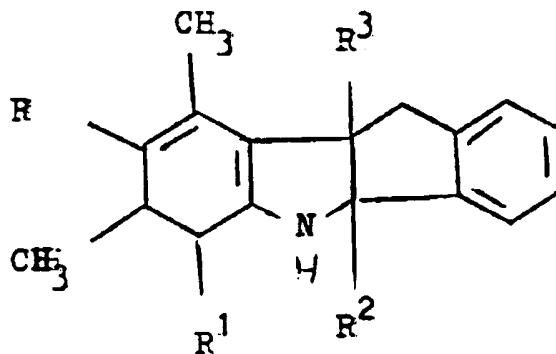
(40) 16.02.94

(71) University of Bath, British body corporate of Claverton
Down, Bath, GB;
University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, US;

(72) Sainsbury Malcolm, Bristol, GB;
Shertzer Howard, Cincinnati, Ohio, US;

(54) Derivát indenoindolu, způsob jeho přípravy a
farmaceutický prostředek, který ho obsahuje

(57) Derivát indenoindolu obecného vzorce I, kde znamená R
methoxyskupinu, R¹ methyl a R² a R³ vždy methyl, nebo R
znamená ethoxyskupinu a R¹ H a R² a R³ vždy methyl, jeho
enantiomery a soli jsou novými a účinnými antioxidanty
pro lékařské i nelékařské účely.

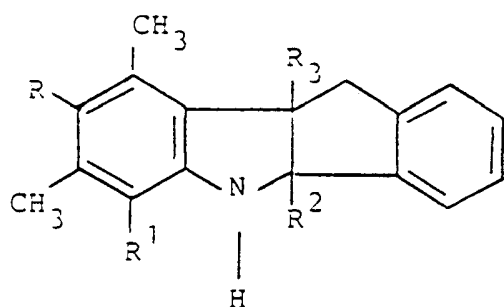


Volné radikály různých typu se stále více a více spojují s širokým oborem stavů a onemocnění, jako jsou například ischemické nebo reperfuční nemoci, aterosklerosa, trombosa a embolism, alergicko/zánětlivé stavy, jako jsou například bronchiální asthma, reumatoidní arthritida, stavy vztahující se k Alzheimerově nemoci, k Parkinsonově nemoci a ke stárnutí, šedý zákal, diabetes, neoplazmy a toxicita antineoplastických nebo imunitu potlačujících činidel a chemikálií. Jedním možným vysvětlením těchto stavů a onemocnění je, že z neznámých důvodů endogenní chránící činidla proti nepříznivému působení radikálů nejsou dostatečně účinná k ochraně tkání proti poškození radikály. Lipidická peroxidace, způsobená nadměrnou generací radikálů, může představovat významnou cestu poškození u shora uvedených stavů a nemocí. Podávání přídatných antioxidantů, které inhibují radikálové reakce například lipidickou peroxidací, by tak bylo cestou prevence nebo ošetřování shora uvedených stavů a nemocí. Vynález poskytuje nová antioxidantní činidla indenoindolového typu, která splňují oba požadavky akumulace v membránách, to znamená jsou dostatečně hydrofobní a schopná inhibovat lipidickou peroxidaci. Tato nová antioxidantní činidla se příznivě srovnávají s jinými antioxidantními činidly, například s α -tokoferolem. Sloučenin podle vynálezu se může používat také k neléčebným účelům pro stabilizaci sloučenin, citlivých k poškození oxidací, například produktů k ochraně pokožky, ke konzervaci potravin, potravinových přísad a pro ochranu jiných produktů. Vynález se týká jak způsobu stabilizace za použití tetrahydroindenoindolů tak stabilizovaných sloučenin.

Ze známého stavu techniky se uvádí patentový spis číslo PCT/GB90/00949, zveřejněný jakožto mezinárodní přihláška vynálezu WO90/15800 27. prosince 1990, která popisuje skupinu tetrahydroindenoindolů, účinných jakožto inhibitory lipidového peroxidáčního procesu a použitelných jakožto antioxidantů.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou cis-kondenzované sloučeniny obecného vzorce I



I

kde znamená

R methoxyskupinu nebo ethoxyskupinu, přičemž pokud znamená methoxyskupinu, znamená

R¹ methylovou skupinu a

R² a R³ vždy atom vodíku nebo methylovou skupinu a pokud

R znamená ethoxyskupinu, znamená

R¹ atom vodíku a

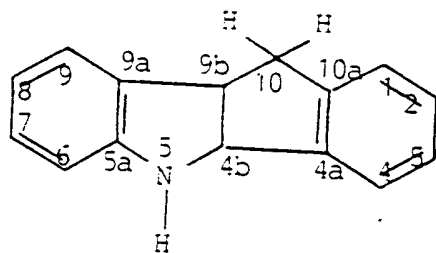
R² a R³ vždy methylovou skupinu,

a její enantiomery a soli.

Zjistilo se, že cis-kondenzované sloučeniny s tetrahydroindenoindolovou strukturou obecného vzorce I jsou vysoce účinné jakožto inhibitory lipidického peroxidačního procesu a jsou užitečné jakožto antioxidanty. Sloučeniny obecného vzorce I mohou být ve formě racemických směsí nebo ve formě čistých enantiomerů nebo jakožto vzájemné kombinace těchto forem.

Sloučeniny obecného vzorce I jsou obzvláště užitečné jakožto antioxidanty v lékařské terapii.

Indolové struktury podle vynálezu mají v kruhu následující číslování



cis-4b,5,9b,10-tetrahydroindeno[1,2-b]indol (THII)

Jakožto tetrahydroindenoindoly podle vynálezu se uvádějí:
cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-4b,6,7,9,9b-pentamethyl-8-methoxyinde-
no[1,2-b]indol,
cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-8-ethoxy-4b,7,9,9b-tetramethylindeno-
[1,2-b]indol,
cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-8-methoxy-4b,7,9-trimethylindeno-
[1,2-b]indol.

Podle vynálezu se cis-kondenzované sloučeniny obecného vzor-
ce I podávají zpravidla orálně, rektálně, dermálně nebo vstříko-
váním ve formě farmaceutických prostředků, obsahujících účinnou
látku obecného vzorce I buď ve formě volné zásady nebo ve formě
farmaceuticky vhodné netoxické adiční soli s kyselinou, například
ve formě hydrochloridu, hydrobromidu, laktátu, acetátu, fosfátu,
sulfamátu, citrátu, tartrátu, oxalátu a podobně ve formě farmace-
uticky vhodné dávkovací formy. Farmaceutické prostředky mohou ob-
sahovat farmaceuticky vhodný nosič nebo farmaceuticky vhodné ře-
didlo.

Dávkovací formou může být pevný, polopevný nebo kapalný far-
maceutický prostředek. Zpravidla takový prostředek obsahuje ú-
činnou látku ve hmotnostním množství 0,1 až 99 %, vztaženo na
farmaceutický prostředek jako celek, zvláště ve hmotnostním množ-
ství 0,5 až 20 % v případě farmaceutického prostředku určeného ke
vstříkování a 0,2 až 50 % v případě farmaceutického prostředku
pro orální podání. Dermální prostředky obsahují zpravidla hmot-
nostně 1 až 5 % účinné látky ve vhodném pojivu.

Pro výrobu farmaceutických prostředků, obsahujících jakožto
účinnou látku sloučeninu podle vynálezu obecného vzorce I, ve
formě dávkovacích jednotek pro orální podání se vybraná sloučeni-
na obecného vzorce I mísí s pevným excipientem, jako jsou napřík-
lad laktóza, sacharóza, sorbitol, mannitol, škroby, například
bramborový škrob, kukuřičný škrob nebo amylopektin, deriváty ce-
lulózy, pojiva, například želatina nebo polyvinylpyrrolidon a
s mazadlem, jako jsou například stearát hořečnatý, stearát vápe-
natý, polyethylenglykol, vosky, a parafin a pak se smés slisovává
na tablety. Mají-li se připravovat tablety povlečené, jádro, při-
pravené, jak shora uvedeno, se může povlékat koncentrovaným cu-

kerným roztokem, který může obsahovat například arabskou klovatinu, želatinu, mastek, oxid titaničitý. Nebo se tablety mohou povlékat polymerem, známým pracovníkům v oboru, rozpuštěným ve snadno těkavém organickém rozpouštědle nebo ve směsi organických rozpouštědel. Do takových povlakových hmot se mohou přidávat barviva k lepšímu rozlišování tablet, obsahujících různé účinné látky, nebo k rozlišení množství účinné látky.

Pro přípravu měkkých želatinových kapslí se účinná látka může mísit například s rostlinným olejem nebo s polyethylenglykolem. Tvrdé želatinové kapsle mohou obsahovat granule účinné látky za použití buď shora uvedených excipientů pro tablety, například laktózy, sacharózy, sorbitolu, mannitolu, škrobů (jako jsou například škrob bramborový nebo kukuřičný nebo amylopektin), derivátů celulózy nebo želatiny. Do tvrdých želatinových kapslí se také mohou plnit kapalně nebo polopevně směsi obsahující účinnou látku.

Dávkovací jednotky pro rektální podání mohou být roztoky nebo suspenze nebo se mohou připravovat ve formě čípků obsahujících účinnou látku ve směsi s neutrální mastnouází nebo ve formě želatinových kapslí obsahujících účinnou látku ve směsi s rostlinným olejem nebo s parafinovým olejem.

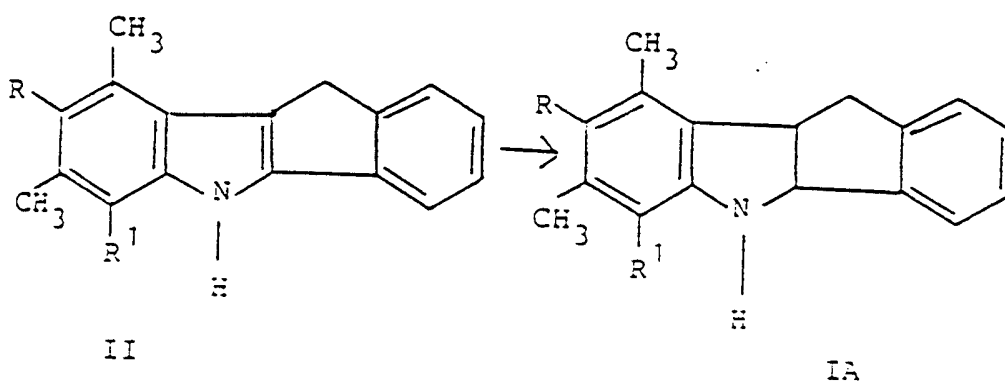
Kapalné farmaceutické prostředky pro orální podání mohou mít formu sirupů nebo suspenzí například roztoků obsahujících hmotnostně přibližně 0,2 až 20 % shora popsané účinné látky obecného vzorce I doplněné cukrem a směsí ethanolu, vody, glycerolu a propylenglykolu. Popřípadě takové kapalné prostředky mohou obsahovat barviva, ochucovací činidla, sacharin a karboxymethylcelulózu jakožto zahušťovadlo nebo jiné excipienty, známé pracovníkům v oboru.

Roztoky pro parenterální podání vstříkáním se mohou připravovat ve formě vodných roztoků ve vodě rozpustných farmaceuticky vhodných solí účinné látky obecného vzorce I, s výhodou ve hmotnostní koncentraci přibližně 0,5 až přibližně 10%. Tyto roztoky mohou také obsahovat stabilizační činidla a/nebo pufry a mohou se připravovat o sobě známým způsobem ve formě různých dávkovacích ampulí.

Vhodná denní dávka sloučenin podle vynálezu při farmaceutickém ošetřování lidí je přibližně 0,01 až 100 mg/kg tělesné hmotnosti v případě perorálního podávání a 0,001 až 1 mg/kg tělesné hmotnosti při parenterálním podávání.

Sloučeniny podle vynálezu obecného vzorce I se připravují například jak dále popsáno, vynález však není na uváděné způsoby přípravy omezen a sloučeniny obecného vzorce I se mohou připravovat také o sobě známými jinými způsoby.

a) 4b,5,9b,10-Tetrahydroindeno[1,2-b]indol (IA), kde znamenají R^2 a R^3 vždy atom vodíku, se mohou připravovat redukcí odpovídajícího 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indolu (DHII)

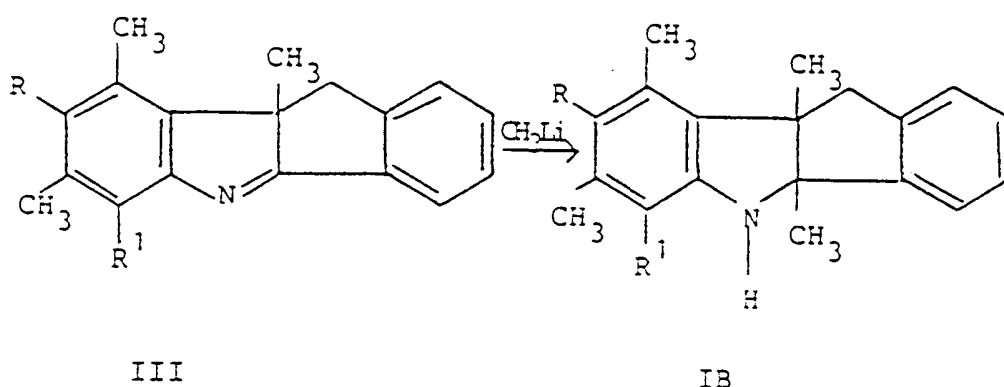


kde R a R^1 mají význam uvedený u obecného vzorce I.

5,10-Dihydroindeno[1,2-b]indol (DHII) jakožto výchozí látka se redukuje reakcí s redukčním činidlem na bázi boru, jako je například kyanoborhydrid sodný v rozpouštědle, často v kyselině octové, nebo borhydridem v tetrahydrofuranu. Nebo se může používat morfolinoboranu v rozpouštědle, často v tetrahydrofuranu nebo v dioxanu a v přítomnosti silné kyseliny, například kyseliny chlorovodíkové. Nebo se může použít trialkylsilanu. Na konci reakce se produkt izoluje zředěním reakční směsi vodou, neutralizací a buď odlifitrováním nebo rozpouštědlovou extrakcí. Nebo se redukuje provádí hydrogenací na katalyzátoru, jako je například palladium. V tomto případě se 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indol (DHII) rozpustí ve vhodném rozpouštědle, například v ethanolu, v kyselině octové nebo v ethylacetátu. V takovém případě se produkt izoluje odstraněním katalyzátoru odfiltráním a odpařením rozpouštěd-

la za sníženého tlaku. *cis*-4b,5,9b,10-Tetrahydroindeno[1,2-*b*]indol (THII) se může čistit překrystalováním ze vhodného rozpouštědla nebo sloupcovou chromatografií za použití oxidu křemičitého.

b) 4b,9b-Dimethyl-4b,5,9b,10-tetrahydroindeno[1,2-*b*]indol (1B) se může připravovat přímo reakcí indoleninů obecného vzorce III s methylithiem (CH_3Li) v aprotickém rozpouštědle, jako je například suchý tetrahydrofuran.

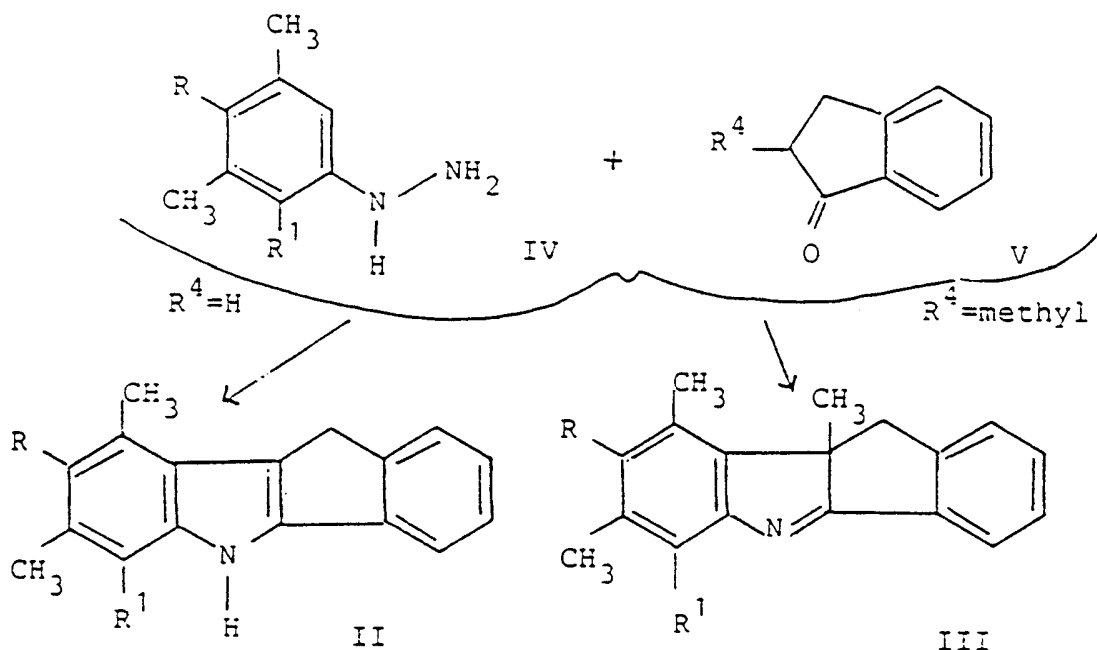


kde R a R^1 mají význam, uvedený u obecného vzorce I.

c) 4b,9b-Dimethyl-4b,5,9b,10-tetrahydroindeno[1,2-*b*]indoly (1B) se také mohou připravovat z odpovídajících v poloze 4b nesubstituovaných analogů sledem metalace, například za použití butyllithia, karbonace za použití oxidu uhličitého a druhou metalací, například použitím butyllithia a alkylací methylhalogenidem nebo methylsulfátem s následnou konečnou hydrolyzou získaných, na atomu dusíku karboxylovaných meziproductů.

5,10-Dihydroindeno[1,2-*b*]indoly (DHII) obecného vzorce II se jakožto výchozí látky mohou připravovat Fischerovou indolizací fenyldiazinu obecného vzorce IV 1-indanonem obecného vzorce V, (kde znamená R^4 atom vodíku).

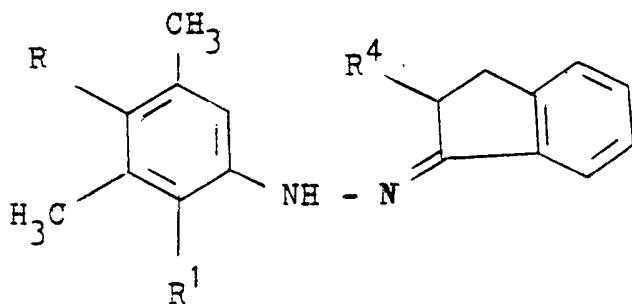
Indoleniny jakožto výchozí látky obecného vzorce III se mohou připravovat reakcí fenyldiazinu obecného vzorce IV s 2-methyl-1-indanonem obecného vzorce V (R^4 znamená methylovou skupinu).



kde R a R¹ mají význam uvedený u obecného vzorce I, a R⁴ znamená atom vodíku nebo methylovou skupinu.

Mohou se nechávat reagovat 1-methyl-1-indanony nebo 2-methyl-1-indanony obecného vzorce V buď s volnou zásadou nebo se zásadou ve formě soli, často hydrochloridu. Zpravidla se reakční složky rozpustí v rozpouštědle, s výhodou v alkoholickém rozpouštědle, například v ethanolu nebo v propanolu. V některých případech není zapotřebí tepla, v jiných je nutno reakční směs zahříváním udržovat na teplotě zpětného toku pod dobu jedné hodiny i po delší dobu.

Rakce sloučeniny obecného vzorce V a fenyldiazonů obecného vzorce IV za vzniku sloučeniny obecného vzorce II nebo III postupuje přes fenyldiazonový meziprodukt obecného vzorce VI



kde R a R¹ mají význam uvedený u obecného vzorce I, a R⁴ znamená atom vodíku nebo methylovou skupinu.

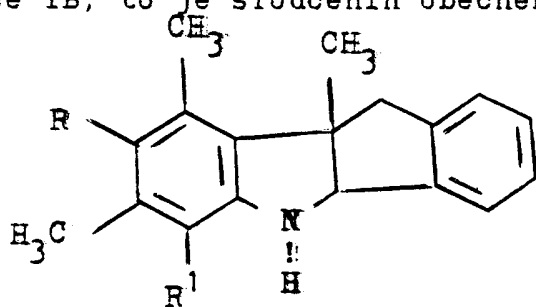
Fenyldiazonový meziprodukt se někdy může izolovat zředěním reakční směsi vodou a oddělením filtrací, nebo se může izolovat extrakcí vhodným rozpouštědlem. Dalšího čištění se dosahuje

překrystalováním nebo chromatografií. V případě chromatografie je sloupcová chromatografie na silikagelu dostačující a může se použít řady elučnic rozpouštědel.

Cyklizace fenylylhydrazonů na 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indoly (DHII) obecného vzorce II nebo na indoleniny obecného vzorce III se může provádět jejich opětovným rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle, s výhodou v alkoholu, jako je například ethanol nebo propanol a zpracováním roztoku kyselinou například kyselinou chlorovodíkovou, octovou nebo trifluoroctovou. Může být přitom zapotřebí tepla nebo ho nemusí být zapotřebí. Nebo se mohou použít jiná cyklizační činidla, jako jsou například Lewisovy kyseliny, jako například chlorid zinečnatý, nebo reakční činidla obsahující atom fosforu, jako je například chlorid fosforitý, fosforoxychlorid, tý, kyselina polyfosforečná nebo polyfosfonáty.

Pokud se má použít soli fenylylhydrazinů místo fenylylhydrazinů při reakci s indanony, pak může cyklizace fenylylhydrazonů jakožto meziproductů na 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indoly (DHII) obecného vzorce II nebo na indoleniny obecného vzorce III probíhat spontánně.

V poloze 4b nesubstituované analogy sloučeniny obecného vzorce IB, to je sloučenin obecného vzorce VII



VII

se mohou syntetizovat Fischerovou indolizací fenylylhydrazinu obecného vzorce IV a 2-methyl-1-indanonu obecného vzorce V (R^4 znamená methylovou skupinu) následovanou redukcí indoleninu jakožto meziproductu obecného vzorce III.

Redukce indoleninů obecného vzorce III na cis-4b,5,9b,10-tetrahydroindeno[1,2-b]indolové (THII) deriváty, substituované na C-9b se dosahuje za použití o sobě známých redukčních činidel, jako je například borhydrid ve vhodném rozpouštědle, například

v ethanolu. Produkty se pak izolují a čistí o sobě známým způsobem.

Způsob přípravy výchozích látek, jako je třeba 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indol (DHII), a analogů obsahujících funkční skupiny, je popsána v evropském patentovém spise EP-A- O 404536.

Následující příklady praktického provedení vynález objasňují, nijak ho však neomezují. Teploty se uvádějí ve °C.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-4b,6,7,9,9b-pentamethyl-8-methoxyindeno[1,2-b]indol

i) 2,3,6-Trimethylanisol

Přes noc se vaří pod zpětným chladičem směs 50 g (0,367 mol) 2,3,6-trimethylfenolu, 55 g (0,4 mol) uhličitanu draselného a 36 ml (0,38 mol) dimethylsulfátu v 500 ml acetonitrilu, . Přidá se 35 ml koncentrovaného vodného roztoku amoniaku a směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny. Po filtraci a odpaření se zbytek vyjme do etheru a promyje se dvakrát roztokem hydroxidu sodného a dvakrát roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Vysuší se síranem hořečnatým a odpaří se, čímž se získá 50,8 g (92 % teorie) 2,3,6-trimethylanisolu.

ii) 4-Nitro-2,3,6-trimethylanisol

Do míchaného, zahříváného (o teplotě 70 až 80 °C) roztoku 20,3 g (0,135 mol) 2,3,6-trimethylanisolu ve 200 ml kyseliny octové se přidá po kapkách 9,65 ml koncentrované vodné kyseliny dusičné ve 20 ml kyseliny octové. Po přidání se směs vlije na led a získaná směs se extrahuje třikrát methylenchloridem. Organická fáze se odpaří k odstranění kyseliny octové a methylenchloridu a zbytek se rozpustí v etheru a promyje se dvakrát roztokem hydroxidu sodného a dvakrát roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Vysuší se (síranem hořečnatým) a odpaří se, čímž se získá 19,0 g (72 % teorie) 4-nitro-2,3,6-trimethylanisolu, kterého se používá

bez dalšího čištění v dalším stupni.

iii) 4-Amino-2,3,6-trimethylanisol

Směs 19,0 g (0,097 mol) 4-nitro-2,3,6-trimethylanisolu a dvou malých lžiček Pd/C (5%) ve 200 ml ethanolu se hydrogenuje po dobu čtyř hodin v Parrově aparatuře. Katalyzátor se pak odstraní filtrací a rozpouštědlo se odpaří. Intenzivně červenavý zbytek se rozpustí v etheru a extrahuje se vodnou kyselinou chlorovodíkovou (2M).

Spojené vodné fáze se pak alkalizují roztokem hydroxidu sodného na hodnotu pH 14. Získaný zásaditý roztok se extrahuje etherem. Po vysušení (síranem hořečnatým) se produkt vysráží ve formě své hydrochloridové soli přidáním roztoku kyseliny chlorovodíkové (g) v etheru. Filtrací se získá 10,1 g (63 % teorie) 4-amino-2,3,6-trimethylanisolhydrochloridu.

iv) 4-hydrazino-2,3,6-trimethylanisol

Suspenze 5,17 g (0,0256 mol) 4-amino-2,3,6-trimethylanisolhydrochloridu v 30 ml koncentrované vodné kyseliny chlorovodíkové a 35 ml vody se zahřívá (na teplotu 80 °C) tak dlouho až se hydrochlorid rozpustí. Ochlazení na teplotu -5 °C vede k vysrážení hydrochloridu ve formě malých jemných krystalů. Do této míchané směsi se po kapkách v průběhu 30 minut přidá směs 1,77 g (0,0256 mol) dusitanu sodného v 15 ml vody za udržování reakční teploty -5 až 0 °C. Po míchání při této teplotě po dobu dalších 15 minut se přidá roztok 14,46 g (0,064 mol) dihydrátu chloridu cínatého ve 12 ml koncentrované vodné kyseliny chlorovodíkové za udržování teploty 0 °C. Reakční směs se pak nechá pomalu ohřát na teplotu místnosti pak se alkalizuje roztokem roztokem hydroxidu sodného až do hodnoty 14. Získaná směs se extrahuje etherem a pak se vyší (síranem hořečnatým), produkt se vysráží ve formě hydrochloridu přidáním kyseliny chlorovodíkové (g) v etheru. Filtrací se získá 3,8 g (69 % teorie) 4-hydrazino-2,3,6-trimethylanisolu.

v) 9b,10-Dihydro-6,7,9,9b-tetramethyl-8-methoxyindeno[1,2-b]-indol

Směs 2,2 g (0,012 mol) 4-hydrazino-2,3,6-trimethylanisolu, 1,9 g (0,013 mol) 2-methyl-1-indanonu a 2 ml koncentrované vodné kyseliny chlorovodíkové ve 20 ml ethanolu se zahřívá pod zpětným chladičem v prostředí argonu po dobu jedné hodiny. Po ochlazení se rozpouštědlo odstraní odpařením a zbytek se rozdělí mezi směs vody a methylenchloridu. Vodná fáze se neutralizuje přidáním vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a fáze se oddělí. Po vysušení (sírán hořečnatý) a odpaření organické fáze se zbylý surový produkt čistí chromatografií na oxidu křemičitém za použití methylenchloridu jakožto elučního činidla. Tak se získá 1,1 g (31 % teorie) 9b,10-dihydro-6,7,9,9b-tetramethyl-8-methoxyindeno[1,2-b]indolu, kterého se přímo používá v dalším stupni.

vi) cis-4b,5,9b,10-Tetrahydro-4b,6,7,9,9b-pentamethyl-8-methoxyindeno[1,2-b]indol

Do studeného (-80 °C) roztoku 1,1 g (0,0038 mol) 9b,10-dihydro-6,7,9,9b-tetramethyl-8-methoxyindeno[1,2-b]indolu v 20 ml suchého tetrahydrofuranu se přidá 4 ml 1,6M methyllithia v etheru v prostředí argonu. Směs se míchá při teplotě -78 °C po dobu jedné hodiny a pak při teplotě -20 °C po dobu jedné hodiny. Po dosažení teploty 0 °C se přidá vodný roztok chloridu amonného a etheru. Fáze se oddělí a organické fáze se promyjí jednou vodou, vysuší se (síránem hořečnatým) a odpaří se. Získaný surový produkt se čistí chromatografií na oxidu křemičitém za použití systému ethylacetát/isooktan (2 : 10) jakožto elučního činidla. Tak se získá 0,3 g (25 % teorie) cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-4b,6,7,9,9b-pentamethyl-8-methoxyindeno[1,2-b]indol

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 1,41 (3H, s), 1,43 (3H, s), 1,96 (3H, s), 2,07 (3H, s), 2,35 (3H, s), 3,0 (1H, d), 3,55 (3H, s), 3,65 (1H, d), 7,1 (3H, m), 7,25 (1H, m)

Příklad 2

cis-4b,5,9b,10-Tetrahydro-8-ethoxy-4b,7,9,9b-tetramethylindeno[1,2-b]indol

i) 4-Nitro-2,6-dimethyl-1-ethoxybenzen

Směs 10 g (0,0598 mol) 4-nitro-2,6-dimethylfenolu, 16,5 g (0,1196 mol) uhličitanu draselného a 18,6 g (0,1196 mol) ethyljodidu v 100 ml acetonitrilu se vaří pod zpětným chladičem po dobu 2,5 hodin. Pevný materiál se odfiltruje za horka a promyje se horkým acetonitrilem. Spojená organická fáze se odpaří a získaný zbytek se rozpustí v etheru. Etherová fáze se promyje vodou, vysuší se (síranem hořečnatým) a odpaří se, čímž se získá 11,4 g (98 % teorie) 4-nitro-2,6-dimethyl-1-ethoxybenzenu o teplotě tání 56 °C.

ii) 3,5-Dimethyl-4-ethoxyanilin

Roztok 11,4 g (0,058 mol) 4-nitro-2,6-dimethyl-1-ethoxybenzenu ve 115 ml ethanolu (95%) se hydrogenuje přes noc za použití systému Pd/C jakožto katalyzátoru. Po odstranění katalyzátoru odfiltrováním se rozpouštědlo odstraní odpařením, čímž se získá 9,2 g (96 % teorie) 3,5-dimethyl-4-ethoxyanilinu o teplotě tání 74 °C.

iii) 3,5-Dimethyl-4-ethoxyfenylhydrazin

Do ochlazené (-5 °C), míchané suspenze 9,2 g (0,0557 mol) 3,5-dimethyl-4-ethoxyanilinu v 50 ml 6N kyseliny chlorovodíkové (vodné), se přidá v průběhu 30 minut 3,8 g (0,0557 mol) dusitanu sodného v 15 ml vody. Míchá se při teplotě +5 °C po dobu 30 minut, získaná směs se přidá v prostředí argonu a za míchání do 29,1 g (0,167 mol) dithionitu sodného, rozpuštěného ve 150 ml vody. Míchá se po dobu 20 minut při teplotě + 5 °C, načej se přidá 250 ml etheru a směs se alkalizuje na hodnotu pH 9 přidáním 10 N roztoku hydroxidu sodného. Organická fáze se oddělí a promyje se roztokem chloridu sodného. Po vysušení (síranem sodným) se produkt přesraží ve formě hydrochloridu přidáním systému kyselina chlorovodíková (g)/ether (do hodnoty pH 3). Filtrací a promytím etherem se získá 9,4 g (78 % teorie) 3,5-dimethyl-4-ethoxyfenylhydrazinhydrochloridu.

iv) 9b,10-Dihydro-8-ethoxy-7,9,9b-trimethylindeno[1,2-b]indol
Roztok 2,16 g (0,01 mol) 3,5-dimethyl-4-ethoxyfenylhydrazin-

hydrochloridu a 1,46 g (0,01 mol) 2-methyl-1-indanonu ve 20 ml kyseliny octové se míchá přes noc při teplotě místnosti a pak se vaří pod zpětným chladičem po dobu tři hodin. Směs se zředí vodou, alkalizuje se 10 N roztokem hydroxidu sodného a extrahuje se třikrát methylenchloridem. Spojená organická fáze se promyje vodou, vysuší se (síranem sodným) a odpaří se, čímž se získá 2,8 g surového produktu, který se překrystaluje ze systému lehký petrolej/ethylacetát (5 : 1). Výtěžek je 2,1 g (72 % teorie) 9b,10-dihydro-8-ethoxy-7,9,9b-trimethylindeno[1,2-b]indolu o teplotě tání 164 °C.

v) cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-8-ethoxy-4b,7,9,9b-tetramethylindeno[1,2-b]indol,

Do studeného roztoku (-78 °C) 2,0 g (0,0063 mol) 9b,10-dihydro-8-ethoxy-7,9,9b-trimethylindeno[1,2-b]indolu ve 20 ml suchého tetrahydrofuranu se přidá po kapkách za míchání a v prostředí argonu 10 ml methyllithia (1,6 N) v etheru. Když je přidávání ukončeno, pokračuje se v míchání ještě po dobu jedné hodiny při teplotě -20 °C a pak jednu hodinu při teplotě místnosti. Reakce se ukončí přidáním do směsi 20 ml nasyceného roztoku chloridu amonného. Po přidání 100 ml etheru se organická fáze oddělí a promyje se dvakrát roztokem chloridu amonného. Vysuší se (síranem sodným) a odpaří se, čímž se získá 2,0 g (96 % teorie) cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-8-ethoxy-4b,7,9,9b-tetramethylindeno[1,2-b]indolu.

¹H NMR (CDCl₃): 1,35 (3H, t), 1,40 (6H, d), 2,10 (3H, s), 2,35 (3H, s), 2,95 - 3,05 (1H, d), 3,55 - 3,75 (3H, m), 6,10 (1H, s), 7,00 - 7,3 (4H, m)

Příklad 3

cis-4b,5,9b,10-Tetrahydro-8-methoxy-6,7,9-trimethylindeno[1,2-b]indol

i) 5,10-Dihydro-8-methoxy-6,7,9-trimethylindeno[1,2-b]indol
Směs 1,95 g (0,009 mol) 4-hydrazino-2,3,6-trimethylanisolhydrochloridu (přípraveného způsobem podle příkladu 1) a 1,06 g

(0,008 mol) 1-indanonu v 20 ml ethanolu a 2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové se vaří pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny. Rozpouštědlo se odstraní odpařením a zbytek se rozdělí mezi ether a vodu. Vodná fáze se alkalizuje roztokem hydroxidu sodného. Organická fáze se oddělí a promyje se vodou, vysuší se (síranem sodným) a odpaří se, čímž se získá surový produkt, který se čistí chromatografií za použití systému methylenchlorid/lehký petrolej (20/80) jakožto elučního činidla. Konečná krystalizace poskytuje 1,08 g (49 % teorie) 5,10-dihydro-8-methoxy-6,7,9-trimethylindeno[1,2-b]indolu.

ii) cis-4b,5,9b,10-Tetrahydro-8-methoxy-6,7,9-trimethylindeno[1,2-b]indol

Do roztoku 0,65 g (0,00234 mol) 5,10-dihydro-8-methoxy-6,7,9-trimethylindeno[1,2-b]indolu a 0,95 g (0,00957 mol) morfolinoboranu ve 4 ml dioxanu se přidá po kapkách 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu 30 minut, ochladí se na teplotu místnosti, načež se přidá 3 ml 6N kyseliny chlorovodíkové. Směs se pak vaří pod zpětným chladičem po dobu dalších 30 minut. Po ochlazení na teplotu místnosti se surový produkt rozdělí mezi ether a vodný roztok hydroxidu sodného, organická fáze se oddělí a promyje se vodným roztokem hydroxidu sodného a vodou, vysuší se (síranem hořečnatým) a odpařením se získá surový produkt, který se překrystaluje ze systému ethylacetát/lehký petrolej. Výtěžkem je 0,46 g (70 % teorie) cis-4b,5,9b-10-tetrahydro-8-methoxy-6,7,9-trimethylindeno[1,2-b]indolu.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 2,00 (3H, s), 2,14 (3H, s), 2,28 (3H, s), 3,17 (1H, dd), 3,55 (1H, dd), 3,64 (1H, s), 4,28 (1H, ddd), 5,38 (1H, d), 7,20 - 7,27 (3H, m), 7,39 (1H, d)

Farmakologické vlastnosti

Indenoindoly podle vynálezu jsou hydrofobní a stabilní struktury, které vytvářejí kationty, stabilní kationtové radikály nebo radikály po oxidaci. Jsou účinnými antioxidanty, měřeno inhibicí systémem askorbát-železnatý iont indukované lipidové per-

oxidace in vitro, s hodnotou IC_{50} nízkou například 10 nM. Sloučeniny obecného vzorce I předcházejí účinně oxidaci lipoproteinů v lidské plasmě v přítomnosti králičích buněk krátkých svalů nebo myších peritoneálních makrofágů. Také přecházejí ischemickému/reperfuznímu poškození srdce izolovaného perfuzního krysího srdce a chrání proti poškození jater myši nebo izolovaných krysích hepatocytů navozenému chloridem uhličitým, acetaminofenem, methylmethansulfonátem, menadionem, terc.-butylhydroperoxidem a N-methyl-N¹-nitro-N-nitrosoguenidinem.

Pro tyto vlastnosti mají sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu použitelnost při ochraně nebo ošetřování ischemických nebo reperfuzních poruch, zvláště mozkového a srdečního stavu ischemie/infarkt, atheroskerosy, trombózy, embolismu, Parkinsonovy choroby, stárnutí, Alzheimerovy nemoci, neoplasmů a toxicity anti-neoplastových drog, činidel potlačujících imunitu a stavů zánětů navozujících alergické/zánětlivé stavy jako je bronchiální astma a reumatoidní arthritida. Jakožto jiná možná použití se uvádějí chemoprevence proti chemické otravě a proti poškození ozáření. Indenoindolové sloučeniny nejsou podstatněji aktivovány ultrafialovým světlem, čímž by byly vhodné k použití pro prostředky k péči o pokožku. Jinou zajímavou a důležitou charakteristikou indenoindolových sloučenin podle vynálezu je jejich schopnost stabilizovat membrány.

Farmakologické testy

Nejdůležitější charakteristikou sloučenin obecného vzorce podle vynálezu je jejich účinnost jakožto poutače volných radikálů nebo antioxidantů. Používá se zkušební systém pro stanovení koncentrace sloučenin obecného vzorce I potřebné k inhibici lipidové peroxidace o 50 % (IC_{50}). Tato zkouška je dále popsána v odstavci 1. a získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce I. Kromě toho je v odstavci 2. popsán test inhibice makrofagu navozené LDL-peroxidací a získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce II.

1. Lipidická peroxidace závislá na systému askorbát/železnatý

iont

Pro železnato/askorbát lipidický peroxidační systém se přidá 6,25 ml 0,1 M kaliumfosfátového pufru (KP_i), hodnota pH 7,4 do 12,5 mg suchého sojového fosfolipidu. Promývá se argonem po dobu 2 minut, suspenze se utěsni pěti vrstvami Parafilmu a působí se zvukem až se dosáhne průsvitnosti suspenze. Konečná reakční směs se skládá z 200 $\mu\text{g/ml}$ fosfolipidu, 10 μM síranu železitoamonného $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2]$ nebo síranu železnatoamonného $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2]$ a 100 μM kyseliny askorbové v 0,1 M KP_i (hodnota pH 7,4) a antioxidant se zkouší v acetonu nebo v dimethylsulfoxidu. Objem pojiva nikdy nepřekročí 1 % celkového objemu. Reakce se iniciuje přidáním kyseliny askorbové plus železa. Reakce pokračuje při teplotě místnosti v protřepávané vodní lázni po dobu 30 minut a pak se zastaví přidáním 10 μM 0,5 M butylovaného hydroxytoluenu v dimethylsulfoxidu. Shora uvedený proces a následné stanovení systému 2-thiobarbiturová kyselina - reaktivní materiál jsou popsány v publikaci Shertzer H.G. a kol., Biochem, Pharmacol. 37, str. 333 (1988). Tabulka I objasňuje vliv indenoindolů a α -tokoferolu na lipidickou peroxidaci závislou na systému askorbát/železnatý iont.

Tabulka I

Sloučenina	pIC_{50}
cis-8-methoxy-6,7,9-trimethyl-THII	8,0
cis-8-ethoxy-4b,7,9,9b-tetramethyl-THII	7,9
cis-8-methoxy-4b,6,7,9,9b-pentamethyl-THII	7,6

2. Inhibice makrofagu, navozená LDL-peroxidací

Myší peritoneální makrofagy se inkubují v prostředí Ham F10 v přítomnosti 25 μg lidských lipoproteinů (LDL)/ml o nízké hustotě makrofagového prostředí. Sloučenina obecného vzorce I podle vynálezu se rozpustí v ethanolu a přidá se do konečné koncentrace 10^{-5} až 10^{-10}M . Buňky v triplikátu se inkubují po dobu 24 hodin. Buněčné prostředí se pak odstraní a lipidická peroxidace se zkouší měřením vytvoření kyseliny thiobarbiturové jakožto reaktivní substance (TBARS) způsobem, který popsal Steinbrecher a kol. v Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, str. 3883 (1984). Výsledky jsou

uvedeny v tabulce II jakožto $-\log$ koncentrací nutných ke snížení lipidické peroxidace o 50 % ve srovnání s kontrolou (pIC_{50})

Tabulka II

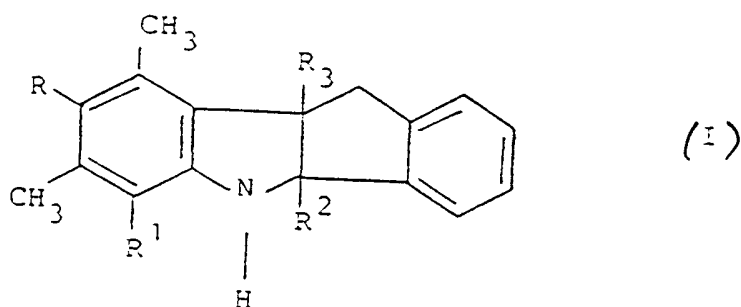
Sloučenina	pIC_{50}
cis-8-methoxy-4b,6,7,9,9b-pentamethyl-THII	7,9
cis-8-ethoxy-4b,7,9,9b-tetramethyl-THII	7,8
cis-8-methoxy-6,7,9-trimethyl-THII	7,9

Průmyslová využitelnost

Derivát indenoindolu, jeho enantiomery a soli jsou novými a účinnými antioxidanty pro lékařské i nelékařské účely.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Derivát indenoindolu obecného vzorce I



kde znamená

- R methoxyskupinu nebo ethoxyskupinu, přičemž pokud znamená methoxyskupinu, znamená
- R¹ methylovou skupinu a
- R² a R³ vždy atom vodíku nebo methylovou skupinu a pokud
- R znamená ethoxyskupinu, znamená
- R¹ atom vodíku a
- R² a R³ vždy methylovou skupinu,
a jeho enantiomery a soli.

2. Derivát indenoindolu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-8-ethoxy-4b,7,9,9b-tetramethylindeno[1,2-b]indol a jeho enantiomery a soli.

3. Derivát indenoindolu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-8-methoxy-6,7,9,-trimethylindeno[1,2-b]indol a jeho enantiomery a soli.

4. Derivát indenoindolu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je cis-4b,5,9b,10-tetrahydro-8-methoxy-4b,6,7,9,9b-pentamethylindeno[1,2-b]indol a jeho enantiomery a soli.

~~5. Derivát indenoindolu podle nároku 1 až 6 a jeho enantiomery a farmaceuticky vhodné soli, použitelný pro léčení lidí nebo~~

~~zviřat)~~

~~6. Použití derivátu indenoindolu podle nároku 5 pro ošetřování
atherosklerosy)~~

~~7. Použití derivátu indenoindolu podle nároku 5 pro ošetřování
ischemických nebo reperfusních chorob, thrombocy a embolismu)~~

~~8. Použití derivátu indenoindolu podle nároku 5 pro ošetřování
nebo prevenci neoplasmů nebo pro ošetřování Parkinsonovy choroby,
Alzheimerovy choroby nebo stavů stárnutí, alergicko/zánětlivých
stavů jako bronchiálního asthma a rheumatoidní arthritidy, poškození
způsobených chemikáliemi, radiací, jako antineoplastických nebo
imunitu potlačujících činidel).~~

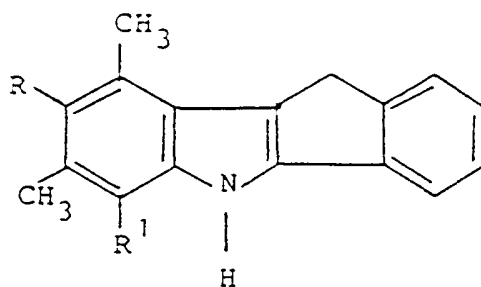
5. Farmaceutický prostředek pro ošetřování lidí i zvířat zvláště pro ošetřování atherosklerosy, ischemických nebo reperfusních chorob, thrombocy a embolismu, pro ošetřování nebo prevenci neoplasmů nebo pro ošetřování Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby nebo stavů stárnutí, alergicko/zánětlivých stavů jako bronchiálního asthma a rheumatoidní arthritidy, poškození způsobených chemikáliemi, radiací, jako antineoplastických nebo imunitu potlačujících činidel, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako účinnou látku obsahuje derivát indenoindolu podle nároku 1 až 4, jeho enantiomer nebo jeho farmaceuticky vhodnou sůl.

6. Použití derivátu indenoindolu podle nároku 1 až 4, jeho enantiomeru nebo jeho farmaceuticky vhodné soli pro výrobu léčiv pro ošetřování atherosklerosy, ischemických nebo reperfusních chorob, thrombocy a embolismu, pro ošetřování nebo prevenci neoplasmů nebo pro ošetřování Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby nebo stavů stárnutí, alergicko/zánětlivých stavů jako bronchiálního asthma a rheumatoidní arthritidy, poškození způsobených chemikáliemi, radiací, jako antineoplastických nebo imunitu potlačujících činidel.

7.

11. Způsob přípravy derivátu indenoindolu podle nároku 1 až 4, obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají v nároku 1 uvedený význam, vyznačující se tím, že

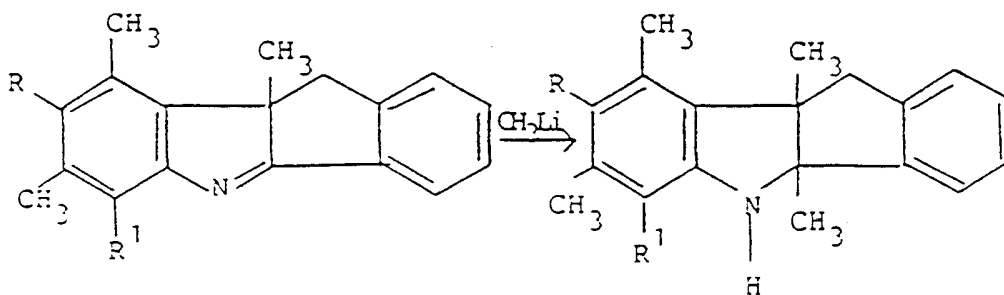
a) se redukuje 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indo (DHII)



II

kde R a R¹ mají význam uvedený u obecného vzorce I,

b) nechává se ragovat indolenin obecného vzorce III s methyl-lithiem

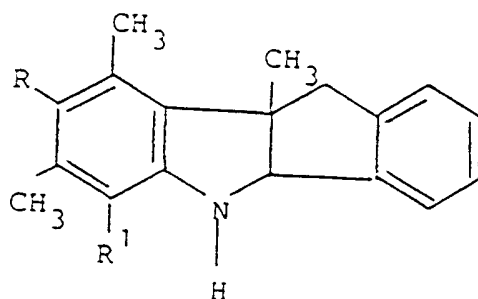


III

IB

kde R a R¹ mají význam, uvedený u obecného vzorce I,

c) pro přípravu 4b,9b-dimethylsloučenin se metalluje sloučenina obecného vzorce VII

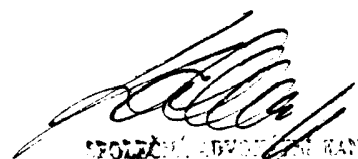


VII

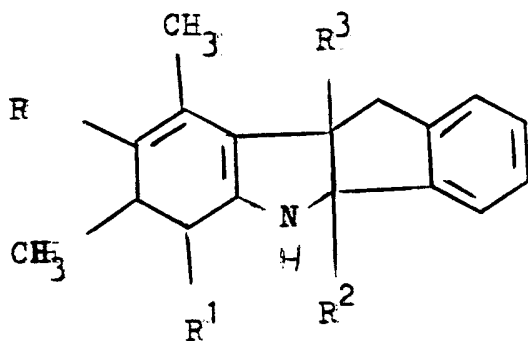
kde R a R¹ mají význam, uvedený u obecného vzorce I, získaná sloučenina se nechává reagovat s oxidem uhličitým, znovu se metaluje a alkyluje se methylhalogenidem nebo methylsulfátem s následnou konečnou hydrolyzou.

8. **Kompozice**
12. ~~Prostředek~~, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje sloučeninu citlivou k oxidačnímu poškození a sloučeninu podle nároku 1 až 4 nebo její enantiomer nebo její sůl.

9.
12. Způsob stabilizace sloučenin, citlivých k oxidačnímu poškození, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se sloučenina, citlivá k oxidačnímu poškození, uvádí do styku se sloučeninou obecného vzorce I podle nároku 1 až 4 nebo s jejím enantiomerem nebo s její solí.


SPOLKOVÝ ADVOKÁT A KANCELÁŘ
VŠETČINA A PARTNERI
MILANOVA 1
100 00 PRAHA 1

Vzorec I pro anotaci



SPolečná advokátní kancelář
VŠETEČKA A PARTNERI
Hájkova 2
120 00 Praha 2

Měščí