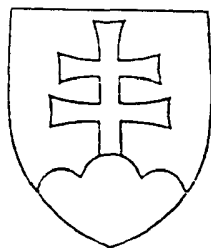


SLOVENSKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(21) 789-93

(13) A3

5(51) C 07 D 273/00, 413/12
A 61 K 31/41

(22) 26.07.93

(32) 12.02.91

(31) 238/91

(33) DK

(40) 02.03.94

(71) A/S GEA FARMACEUTISK FABRIK, Frederiksberg, DK;

(72) KARUP Gunnar Leo, Copenhagen , DK; PREIKSCHAT
Herbert Fritz, Birkerød, DK; CORELL Tim Niss,
Lyngby, DK; LISSAU Bodil Gyllembourg, Frederiks-
berg, DK; CLAUSEN Finn Priess, Allerød, DK; PETER-
SEN Søren Bols, Hvidovre, DK; ALHEDE Borge Ingvar
Frisch, Greve Strand, DK;

(54) 3-substituované 1,2,3,4-oxatriazol-5-imínové zlú-
čeniny, spôsob ich prípravy a farmaceutický
prípravok

(57) 3-substituované 1,2,3,4-oxatriazol-5-imínové zlú-
čeniny všeobecného vzorca I majú takú biologickú
účinnosť, ktorá im umožňuje ich používanie na lie-
čenie kardiovaskulárnych chorôb (krvných zraze-
nín), angíny pectoris a astmy. Riešenie popisuje
aj spôsob prípravy týchto zlúčenín a farmaceutický
prípravok obsahujúci tieto zlúčeniny.

3-substituované 1,2,3,4-oxatriazol-5-imínové zlúčeniny,
spôsob ich prípravy a farmaceutický prípravok

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka dosiaľ neznámych 3-substituovaných 1,2,3,4-oxatriazol-5-imínových zlúčenín s takými biologickými vlastnosťami, ktoré sú vhodné na liečenie kardiovaskulárnych chorôb /krvných zrazenín/ a astmy, spôsobu ich prípravy a farmaceutického prípravku, ktorý tieto zlúčeniny obsahuje.

Doterajší stav techniky

K. Matsuda a spol., Chem. Pharm. Bull. 18/3/, str. 559-563 /1971/ popisuje 3-aryl-1,2,3,4-oxatriazol-5-imínové zlúčeniny a ich acylové deriváty, kde acylová skupina môže byť monosubstituovaná metylom alebo halogénom. Aj keď tieto zlúčeniny boli syntetizované v nádeji, že budú nájdené nové hypotenzívne činidlá, neboli popísané žiadne biologické účinky týchto zlúčenín.

C. Christophersen a spol., Acta Chemica Scandinavica 25, str. 625-630 /1971/ popisuje 3-substituované 1,2,3,4-oxatriazol-5-iminozlúčeniny, kde 3-substituentom môže byť propyl alebo fenyl alebo cyklohexyl. Nie sú však popísané žiadne biologické účinky uvedených zlúčenín.

Hanley a spol., J.Chem.Soc.Perkin Trans I, str. 736-740, 1979 popisujú 3-aryl-1,2,3,4-oxatriazol-5-imínové zlúčeniny, kde arylová skupina môže byť monosubstituovaná metylom alebo halogénom. Nie sú však popísané žiadne biologické účinky týchto zlúčenín.

JP patenty č. 2094/70 a 21102/70 popisujú 3-substituova-

né 1,2,3,4-oxatriazol-5-iminové soli a ich acylové deriváty, kde 3-substituentom môže byť aryl prípadne monosubstituovaný chlóróm alebo metylom. O týchto zlúčeninách sa uvádza, že vykazujú aktivitu vazodepresorov.

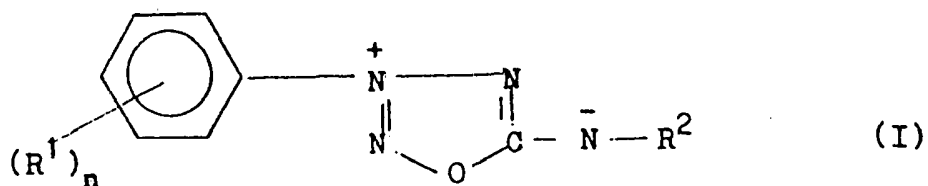
GB publikovaná prihláška č. 2015878 popisuje 3-fenyl-1,2,3,4-oxatriazol-5-iminové zlúčeniny, v ktorých bola nájdená pesticídna a/alebo pestovicídna a/alebo herbicídna účinnosť.

US patentová prihláška č. 4329355 popisuje anhydro-5-imino-1,2,3,4-oxatriazolimidhydroxidy podobnej štruktúry ako majú zlúčeniny podľa tohto vynálezu. Avšak o zlúčeninách známych z popisu tohto patentu je len uvedené, že sú vhodné na liečenie rakoviny.

Z J.C.S. Perkin Trans I, str. 747 až 751 /1979/ sú ďalej známe zlúčeniny podobnej štruktúry ako majú zlúčeniny podľa predloženého vynálezu. Nie sú však uvádzané žiadne biologické účinky týchto zlúčení.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa týka dosiaľ neznámych 3-substituovaných 1,2,3,4-oxatriazol-5-iminových zlúčení všeobecného vzorca I a ich adičných solí s kyselinami



kde R^1 predstavuje rovnaký alebo rozdielny alkyl alebo alkoxyl s 1 až 3 atómami uhlíka, halogén, trifluormetyl, nitro, kyano, fenyl alebo alkylsulfónovú skupinu,

n je 1 až 5 a

R^2 je vodík alebo skupina vzorca II

kde X je -C/O/-, -C/O/O-, -C/O/NH-, -S/O/₂ alebo priama väzba, Y je alkenylová skupina s 1 až 4 atómami uhlíka alebo priama väzba a Q je alkylová, cykloalkylová, alkoxylová alebo fenylová, pyridylová, furanylová, thienylová alebo pyrazinylová skupina prípadne substituovaná substituentom Z, kde Z je alkylová alebo alkoxylová skupina s 1 až 3 atómami uhlíka, halogén, hydroxy, acyloxy, trifluormetyl, nitro, kyano alebo alkylsulfonyl a m je 1 až 3, kde Z tiež, ak X je -C/O/- alebo -C/O/NH-, je Y priama väzba a Q je substituovaný fenyl, môže mať vzorec I, kde R² má rovnaký význam pokiaľ ide o X, Y a Q vtedy, ako R² nie je vodík, alkyl, benzoyl, trifluoracetyl alebo prípadne substituovaný fenyl, ak je R¹ metyl alebo chlór a n je 1 a R² nie je vodík alebo prípadne substituovaná fenylová skupina, ak R¹ je nitro, alkoxy, fluór alebo bróm a n je 1.

Tieto zlúčeniny sa odlišujú od vyššie uvedených známych zlúčenín svojou chemickou stavbou tým, že majú inú substitúciu v polohe 3 a/alebo v polohe 5 oxatriazolového kruhu a odlišujú sa od zlúčenín z vyššie citovaných patentov svojím biologickým účinkom, takže inhibujú agregáciu krvných doštičiek a majú relaxačný vplyv na traceu.

Vynález sa týka taktiež farmaceutického prípravku charakterizovaného obsahom účinnej zložky zlúčeniny vzorca I v spojení s farmaceuticky prijateľným nosičom alebo riedidlom.

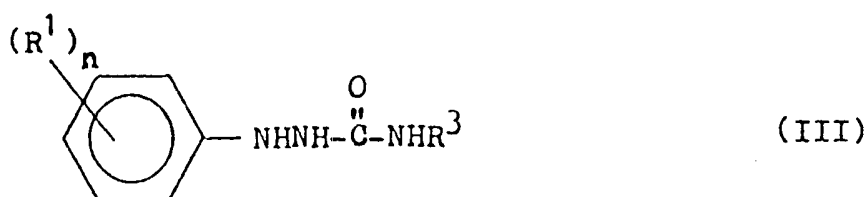
V súlade s uvedeným sú výhodnými zlúčeninami všeobecného vzorca I tie, kde n je 2 až 4.

Vo všeobecnom vzorci II Q výhodne predstavuje alkylové a alkoxylové skupiny s 1 až 6 atómami uhlíka.

Zlúčeniny podľa vynálezu môžu vytvárať adičné soli s kyselinami ako organickými, tak i anorganickými. Vhodnými kyselinami je napríklad chlorovodík, bromovodík, kyselina fosforečná, kyselina dusičná, sírová, šťavelová, mliečna, vínna, octová, salicylová, benzoová, mravčia, propiónová, pivalová, malónová, jantarová, pimelová, fumarová, maleínová, jablčná, sulfamová, fenylpropiónová, glukónová, askorbová, izonikotínová, metansulfónová, p-toluénsulfónová, citrónová alebo adipová.

Predložený vynález sa týka tiež spôsobu prípravy 3-substituovaných 1,2,3,4-oxatriazol-5-iminových zlúčenín všeobecného vzorca I a ich adičných solí s kyselinami, ktorý sa vyznačuje tým, že sa

a/ uzatvorí kruh 1-aryltiosemikarbazidového derivátu všeobecného vzorca III



kde R^1 má rovnaký význam ako vo vzorci I a R^3 je alebo vodík alebo skupina vzorca IV



kde X je priama väzba a Y a $Q-/Z/_m$ majú rovnaký význam ako vo vzorci I, spracovaním s alkylnitritom, kde alkyl má 1 až 6 atómov uhlíka, alebo s dusitanom alkalického kovu v kyslých podmienkach pri asi 0 až 10° C, pričom sa výsledná soľ prípadne prevedie na voľnú zlúčeninu a ak je to potrebné, podrobí sa acylácii.

Spôsob využívajúci alkylnitrit s 1 až 6 atómami uhlíka je nový a je výhodný na prípravu zlúčenín podľa vynálezu, pretože je možné ním získať kvantitatívny výťažok pred čistením.

Pri spôsobe podľa vynálezu je zvýhodňované použitie etylnitritu ako alkylnitritu s 1 až 6 atómami uhlíka a dusitanu sodného ako dusitanu alkalického kovu.

Je známa cyklizácia 1,4-disubstituovaných tiosemikarbazidov kyselinou dusitou /dusitan sodný a kyselina/ za vzniku 3-substituovaných 1,2,3,4-oxatriazol-5-imínov. Výsledky tejto reakcie sú uvedené medzi 18 až 57 %.

Pri reakcii 1 ekvivalenta 1-aryl-tiosemikarbazidového derivátu s alkylnitritom majúci 1 až 6 atómov uhlíka, je výhodné použitie 2 až 2,5 ekvivalentov alkylnitritu vo vhodnom

rozpúšťadla, ako je alkylalkohol s 1 až 6 atómami uhlíka za vzniku 3-arylsubstituovanej 1,2,3,4-oxatriazol-5-iminovej soli v podstate v kvantitatívnom výťažku. Po filtrácii vyzrážanej síry a odparení rozpúšťadla, sa produkt, ak je to potrebné, rekryštalizuje napríklad z alkylalkoholu s 1 až 6 atómami uhlíka, acetonitrilu alebo nitrometánu, čím výťažok čistého produktu je obyčajne medzi 60 až 95 %.

Výhodne sa používa metanol a etanol ako alkylalkohol s 1 až 6 atómami uhlíka.

Príprava acylovaných zlúčenín podľa vynálezu sa výhodne uskutočňuje rozpustením 3-aryl-1,2,3,4-oxatriazol-5-iminhydrochloridu v dvojfázovom systéme obsahujúcom vodu a halogénovaný uhľovodík, výhodne metylénchlorid, ku ktorému sa pridajú v ekvivalentných množstvách pre reakciu zásady, napríklad hydrogénuhličitan sodný a acylačné činidlo. Výsledný produkt môže byť získaný odparením organickej fázy a prípadne sa rekryštalizuje z alkylalkoholu s 1 až 6 atómami uhlíka alebo acetonitrilu. Výťažky týchto zlúčenín sú zvyčajne v rozsahu 50 až 95%. Acylované zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť ďalej pripravené známou reakciou 3-aryl-1,2,3,4-oxatriazol-5-iminhydrochloridu s acylačným činidlom v pyridíne.

Vhodnými acylačnými činidlami sú napríklad estery kyseliny halogénmravčej, chloridy kyselín, anhydridy, O-alkyl a O-arylestery, alkyl a arylizokyanáty, alkyl a arylizotiokyanáty.

5-iminoalkylované deriváty 3-aryl-1,2,3,4-oxatriazol-5-iminov podľa vynálezu sa pripravujú výhodne z 1-aryl-4-substituovaných tiosemikarbazidov spôsobom podľa vynálezu použitím C_{1-6} alkylalkoholu ako rozpúšťadla, výhodne metanolu alebo etanolu. Výťažky týchto zlúčenín sú zvyčajne medzi 80 až 90 %.

Adičné soli s kyselinami vznikajú zvyčajne zo syntézy zlúčenín vzorca I, kde R^2 je H, aryl, alkyl alebo cykloalkyl. Voľné zlúčeniny môžu sa získať z adičných solí s kyselinami spôsobom, ktorý je sám o sebe známy, ako napríklad rozpúšťaním alebo suspenziou vo vode a následnou reakciou s bázou až

do alkalickéj reakcie /výhodne na hodnotu pH 8,0 až 9,5/, napríklad s hydrogénuhličitanom sodným a potom môžu byť izolované.

Nutné východiskové zlúčeniny všeobecného vzorca III môžu byť pripravené spôsobom, ktorý je sám o sebe známy. Východiskové zlúčeniny vzorca III, kde R^3 je H môžu byť napríklad pripravené reakciou substituovaného arylhydrazín-hydrochloridu s tiokyanátom alkalického kovu alebo tiokyanátom amónnym vo vhodnom rozpúšťadle, ako je alkohol alebo voda počas 6 až 18 hodín refluxu, ako je napríklad popísané v Houben-Weyl : "Methoden der Organischen Chemie E 4", str. 513. Východiskové zlúčeniny všeobecného vzorca III, kde R^3 je alkyl alebo aryl, môžu byť podobne pripravené známym spôsobom, ako napríklad reakciou arylhydrazínu s alkyl alebo aryltiokyanátom vo vhodnom rozpúšťadle, ako je éter, metanol, etanol, benzén alebo toluén, ako je to popísané v Houben-Weyl : "Methoden der Organischen Chemie E 4", str. 506.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príprava východiskových látok

Príprava 1-/3-chlór-2-metylfenyl/tiosemikarbazidu

19,3 g /0,1 mólu/ 3-chlór-2-metylfenylhydrazín-hydrochloridu sa rozpustí v 200 ml absolútneho etanolu. K roztoku sa pridá 11,64 g /0,12 mólu/ tiokyanátu draselného a zmes sa zahrieva pod refluxom 16 hodín. Potom sa zmes ochladí, produkt sa pritom čiastočne vyzráža a zmes sa potom odparí do sucha rotačnou odparkou. Produkt sa rekryštalizuje z 200 ml vody a 250 ml metanolu, oddelí sa filtráciou a dôkladne sa premyje vodou.

Výťažok : 17,8 g - 82,5 %

Teplota topenia : 192 až 193° C

Elementárna analýza pre $C_8H_{10}ClN_3S$

vypočítané	44,54 % C,	4,67 % H,	19,48 % N,	14,86 % S
nájdené	44,22 % C,	4,58 % H,	19,60 % N,	14,67 % S

500 MHz ^1H NMR / d_6 - DMSO/

δ 9,33 /š s, 1H, NH/, δ 7,80 /š s, 1H, NH/, δ 7,72 /š s, 1H, NH/,
 δ 7,52 /š s, 1H, NH/, δ 6,80 /m, 3H, ArH/, δ 2,18 /s, 3H, CH_3 /.

Príprava 1-/3-chlór-2-metylfenyl/-4-/1-metylpropyl/-tiosemi-
karbazidu

1,44 g /10 mmólov/ sek. butylizokyanátu sa pridá k 1,56 g
/10 mmólov/ 3-chlór-2-metylfenylhydrazínu rozpustenému v 120
ml toluénu a zmes sa refluxuje 2 hodiny a potom sa odparí.
Zvyšok sa zmieša s malým množstvom hexánu, oddelí sa filtrá-
ciou a suší.

Výťažok : 2,3 g - 96,6 %

Teplota topenia : 145 až 146 $^{\circ}$ C

Elementárna analýza

vypočítané 53,02 % C, 6,67 % H, 15,46 % N, 11,79 % S, 13,04 % Cl

nájdené 53,22 % C, 6,33 % H, 15,52 % N, 11,84 % S, 13,02 % Cl

500 MHz ^1H NMR / CDCl_3 / :

δ 7,48 /s, 1H, NH/, δ 6,94 /m, 3H, ArH/, δ 6,90 /š s, 1H, NH/,
 δ 5,92 /s, 1H, NH/, δ 4,40 /m, 1H, CH/, δ 2,60 /s, 3H, CH_3 /,
 δ 1,54 /m, 2H, CH_2 /, δ 1,18 /d, 3H, CH_3 /, δ 0,88 /t, 3H, CH_3 /.

Príklad 1

3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imin-hydrochlorid

8,6 g /40 mmólov/ 1-/3-chlór-2-metylfenyl/tiosemikarba-
zidu sa rozpustí v 100 ml metanole a 5 ml 37 %-nej kyseliny
chlorovodíkovej za miešania pri teplote miestnosti. Zmes sa
ochladí na 0 až 5 $^{\circ}$ C ľadovým kúpeľom a potom sa po malých
častiach počas asi 5 minút pridá 6,3 g /7 ml/ etylnitritu.
Zmes sa parami nitrozných plynov zafarbí tmavo, ale počas
niekoľkých minút zosvetlie a súčasne sa vyzráža voľná síra.
Zmes sa 10 minút mieša a potom sa pridá ďalších 0,9 g /1 ml/
etylnitritu a reakčná zmes sa nechá asi 20 minút miešať. Síra

sa oddelí filtráciou a zmes sa odparí na rotačnej odparke pri teplote kúpeľa 30° C. Ak je to potrebné, zmes sa zbaví vody odparením spolu s toluénom/etanolom. Kryštály sa miešajú s dietyléterom, oddelia filtráciou a ďalej premývajú malým množstvom dietyléterom.

Výťažok : 9,2 g - 94 %

Teplota topenia : 194 až 195° C /rozklad/

Elementárna analýza pre $C_8H_7ClN_4O \cdot HCl \cdot \frac{1}{4} H_2O$

vypočítané 38,19 % C, 3,41 % H, 22,28 % N, 28,18 % Cl

nájdené 38,07 % C, 3,19 % H, 22,30 % N, 28,58 % Cl

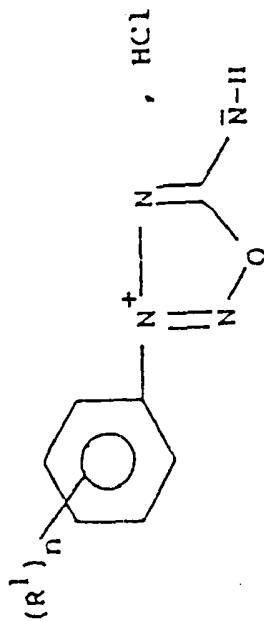
500 MHz 1H NMR / D_2O / :

δ 7,52 /m, 3H, ArH/, δ 2,38 /s, 3H, CH_3 /

Príklady 2 až 28

Zlúčeniny uvedené v tabuľke 1 boli pripravené rovnakým spôsobom ako je popísaný v príklade 1.

Tabuľka 1



Príklad číslo	$(R^1)_n$	výťažok	teplota topenia °C	IR (KBr) (cm ⁻¹)	UV voda / ethanol ^b) (nm)
2	2-CF ₃	71.8%	162-164	1720 (C-NH ⁺ , HCl); 1320, 1300 (CF ₃)	282 ^a
3	3-CF ₃	81.8%	170-172	1710 (C-NH ⁺ , HCl); 1330, 1300 (CF ₃)	265 ^b
4	4-CF ₃	55.6%	182-184	1700 (C-NH ⁺ , HCl); 1330 (CF ₃)	
7	3-CN	96.2%	199-200 d	2220 (CN); 1750, 1700 (C-NH ⁺ , HCl)	
8	4-CN	59.4%	190-191 d	2220 (CN); 1700 (C-NH ⁺ , HCl)	
10	4-CH ₃ SO ₂	71.2%	193-195	1700 (C-NH ⁺ , HCl); 1290, 1150 (SO ₂)	
11	2-CH ₃ , 3-CH ₃	59.9%	188-189	1700 (C-NH ⁺ , HCl)	294 ^a
12	2-CH ₃ , 6-CH ₃	55.8%	173-174	1705 (C-NH ⁺ , HCl)	279 ^b
13	2-CH ₃ , 4-Cl	82.2%	206-208 d	1745, 1700 (C-NH ⁺ , HCl); 1450, 1350 (CH ₃)	300 ^a
14	2-CH ₃ , 5-Cl	99.5%	193-194 d	1740, 1700 (C-NH ⁺ , HCl); 1450, 1350 (CH ₃)	288 ^a
15	4-CH ₃ , 3-Cl	70.7%	174-176	1700 (C-NH ⁺ , HCl); 1450, 1350 (CH ₃)	292 ^a
16	2-CH ₃ , 3-F	64.1%	187-188	1730, 1700 (C-NH ⁺ , HCl)	290 ^a
17	3-CF ₃ , 5-CF ₃	67.8%	187-188	1710 (C-NH ⁺ , HCl); 1330, 1310, 1285 (CF ₃)	
18	3-CF ₃ , 4-Cl	89.2%	200-201	1740, 1700 (C-NH ⁺ , HCl); 1320, 1300 (CF ₃)	
19	5-CF ₃ , 2-Cl	82.9%	195-197	1740, 1700 (C-NH ⁺ , HCl); 1320, 1300 (CF ₃)	
20	2-CH ₃ , 5-Cl	55.6%	181-182	1710 (C-NH ⁺ , HCl); 1010 (OCH ₃)	278 ^a
21	2-Cl, 3-Cl	47.6%	163-164	1700 (C-NH ⁺ , HCl)	290 ^a
22	2-Cl, 4-Cl	70.8%	178-180	1740, 1700 (C-NH ⁺ , HCl)	296 ^a
23	2-Cl, 6-Cl	77.3%	122-125	1710 (C-NH ⁺ , HCl)	288 ^b

Tabulka 1 (pokrač.)

Příklad č.	(R ¹) _n	tepnota		IR (KBr) (cm ⁻¹)	UV voda / ethanolb) (nm)
		výťažok	topenia		
24	3-Cl, 4-Cl	78.7%	183-184	1710 (C-NH ⁺ , HCl)	291a
25	3-Cl, 4-F	93.5%	192-193	1690 (C-NH ⁺ , HCl)	
26	4-Cl, 2-F	67.5%	174-175	1710, 1690 (C-NH ⁺ , HCl)	288a
27	2-F, 3-F, 4-F	93.5%	174-175	1740, 1600 (C-NH ⁺ , HCl)	
28	2,3,4,5,6-F	40.1%	142-143	1710 (C-NH ⁺ , HCl)	

Príklad 29

3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín

1,23 g /5 mmólov/ 3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochloridu pripraveného v príklade 1 sa rozpustí v dvojfázovom systéme obsahujúcom 30 ml vody a 10 ml dichlórmétanu. Zmes sa ochladí ľadovým kúpeľom na 5° C a potom sa po malých dávkach opatrne pridáva 0,84 g /10 mmólov/ hydrogénuhličitanu sodného. Po ukončení vývoja oxidu uhličitého sa zmes intenzívne mieša asi 10 minút, potom sa organická fáza oddelí a odparí.

Výťažok : 0,89 g - 84,6 %

Teplota topenia : 54 až 56° C

Elementárna analýza pre $C_6H_7ClN_4O$:

vypočítané 45,62 % C, 3,35 % H, 26,60 % N, 16,83 % Cl

nájdene 45,95 % C, 3,35 % H, 26,30 % N, 17,27 % Cl.

Príklad 30

3-/3-trifluormetylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-3-trifluormetylbenzylkarbonyl/imín

2,66 g /10 mmólov/ 3-/3-trifluormetylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochloridu pripraveného v príklade 1 sa rozpustí v 45 ml vody a potom sa opatrne pridá 1,68 g /20 mmólov/ hydrogénuhličitanu sodného po malých množstvách. 20 ml dichlórmétanu sa pridá k vyzrážanej voľnej báze, ktorá sa úplne rozpustí a zmes sa ochladí na 5° C ľadovým kúpeľom. Potom sa počas intenzívneho miešania k zmesi pridá 2,23 g /10 mmólov/ chloridu kyseliny 3-trifluormetylbenzylkarboxylovej. Zmes sa potom mieša 45 minút, potom sa organická fáza oddelí a premyje sa dvakrát 30 ml vody. Na rotačnej odparke sa odparí metylénchlorid a výsledná substancia sa dôkladne premieša s dietyléterom, oddelí sa filtráciou a suší.

Výťažok : 2,98 g - 71,6 %

Teplota topenia : 106 až 108° C

IR : 1655 cm⁻¹, 1620 - 1590 cm⁻¹, 1350 - 1320 cm⁻¹

Elementárna analýza pre C₁₇H₁₀F₆N₄O₂

vypočítané 49,04 % C, 2,42 % H, 13,46 % N

nájdene 48,8 % C, 2,30 % H, 13,59 % N

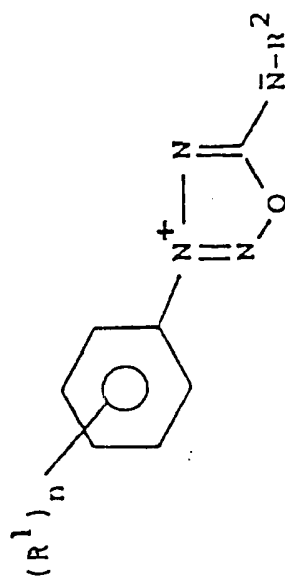
500 MHz ¹H NMR /d₆ - DMSO/ :

δ 8,02 /m, 8H, ArH/, δ 3,88 /s, 2H, CH₂/

Príklady 31 až 45

Zlúčeniny uvedené v tabuľke 2 boli pripravené tak, ako je popísané v príklade 30.

Tabuľka 2



Príklad č.	(R ¹) _n	R ₂	výťažok topenia, %	tepota topenia, °C	IR (KBr) cm ⁻¹	UV (etha- nol (nm))
31	3-CF ₃	CO ₂ C ₂ H ₅	79%	58-60 d	1710-1630 (C-N ⁻ -CO), (ester); 1330-1300 (CF ₃); 1210 (ester)	
32	3-CF ₃	COC ₆ H ₁₁	30%	98-101	2940, 2860 (alif.); 1670, 1580 (C-N ⁻ -CO); 1330-1300 (CF ₃)	
33	3-CF ₃	SO ₂ -C ₆ H ₄ -4-CH ₃	40%	148-149	1680-1610, 1160 (C-N ⁻ -SO ₂); 1320 (CF ₃)	
34	3-CF ₃	3-CO-C ₅ H ₄ N	40%	197-198	1650-1580 (C-N ⁻ -CO); 1350-1300 (CF ₃)	
35	4-CF ₃	CO ₂ C ₂ H ₅	54.3%	162-165	1690-1620 (C-N ⁻ -CO), (ester); 1310-1290, (CF ₃); 1210, 1175 (ester)	
36	2-CH ₃ , 3-Cl	COC ₆ H ₁₁	91.5%	128-130	2940, 2850 (alif.); 1670, 1590 (C-N ⁻ -CO)	
37	2-CH ₃ , 3-Cl	COC ₆ H ₄ -2-Cl	73.4%	155-156	1650, 1620 (C-N ⁻ -CO)	
38	2-CH ₃ , 3-Cl	COC ₆ H ₄ -2-OCOCH ₃	80%	127-128	1770, 1220, 1190 (ester); 1640, 1600-1570 (C-N ⁻ -CO)	
39	2-CH ₃ , 3-Cl	2-CO-C ₄ H ₃ O	85.6%	139-141	1640, 1590 (C-N ⁻ -CO)	272
40	2-CH ₃ , 3-Cl	2-CO-C ₄ H ₃ S	87.8%	148-150	1660, 1600 (C-N ⁻ -CO)	272
41	4-CH ₃ , 3-Cl	CO ₂ C ₂ H ₅	65.1%	166-168	1710, 1685, 1640 (C-N ⁻ -CO), ester; 1210 (ester)	
42	2-Cl, 3-Cl	COC ₆ H ₄ -3-NO ₂	67.2%	172-174	1660, 1590 (C-N ⁻ -CO); 1530, 1310 (NO ₂)	
43	2-Cl, 4-Cl	3-CO-C ₅ H ₄ N	53.6%	158-159	1660, 1580 (C-N ⁻ -CO)	
44	3-Cl, 4-F	CO ₂ C ₂ H ₅	79.8%	176-178	2980 (alif.); 1700, 1640 (C-N ⁻ -CO), (ester), 1210 (ester)	
45	2-F, 3-F, 4-F	CO ₂ C ₂ H ₅	83%	160-161 d	1775, 1710 (C-N ⁻ -CO), ester	

Príklad 46

3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-2-pyrazinoyl/-imín

2,47 g /10 mmólov/ 3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochloridu pripraveného v príklade 1 sa rozpustí v 30 ml vody a za miešania sa postupne pridáva 2,1 g /25 mmólov/ hydrogénuhličitanu sodného. Po ukončení vývoja oxidu uhličitého sa pridá 30 ml dichlórmétanu, zrazenina sa rozpustí. Potom sa pridá 2,21 g /10 mmólov/ N-hydroxysukcinimidesteru kyseliny pyrazín-2-karboxylovej. Zmes sa mieša 16 hodín, potom sa oddelí metylénchloridová fáza. Táto fáza sa premyje dvakrát 30 ml vody a odparí sa. Substancia sa mieša s malým množstvom dietyléteru a oddelí sa filtráciou.

Výťažok : 2,03 g - 64,3 %

Teplota topenia : 111 až 112° C

Elementárna analýza pre $C_{13}H_9ClN_5O$

vypočítané 49,30 % C, 2,86 % H, 26,54 % N, 11,19 % Cl

nájdene 49,10 % C, 2,89 % H, 26,37 % N, 11,40 % Cl

500 MHz 1H NMR / $CDCl_3$ / :

δ 9,26 /d, 1H, J = 1,5 Hz, ArH/, δ 8,56 /d, 1H, J = 2,5 Hz, ArH/,
 δ 8,39 /dd, 1H, J = 1, 5 Hz a J = 2,5 Hz, ArH/, δ 7,21 /m, 3H, ArH/, δ 2,58 /s, 3H, CH_3 /.

Príklad 47

3-/2-chlór-3-chlórfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-fenyl-karbamoyl/imín

2,31 g /10 mmólov/ 3-/2-chlór-3-chlórfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochloridu pripraveného v príklade 21 sa rozpustí v 30 ml vody, ku ktorej bolo pridané 0,9 g /10,7 mmólov/ hydrogénuhličitanu sodného. Po ukončení vývoja oxidu uhličitého sa pridá 30 ml dichlórmétanu a 1,20 g /10 mmólov/ fenylizokyanátu v 5 ml dichlórmétanu. Zmes sa potom intenzívne mieša 30 minút pri teplote miestnosti, pričom sa produkt čiastočne vyzráža. Pridá sa ďalších 50 ml dichlórmétanu a 30

ml vody, oddelia sa fázy. Dichlórmétánová fáza sa premyje 50 ml vody a odparí sa. Rekryštalizácia sa uskutoční v absolútnom etanole.

Výťažok : 2,10 g - 60,9 %

Teplota topenia : 149 až 151° C

Elementárna analýza pre $C_{14}H_9Cl_2N_5O_2$

vypočítané 48,02 % C, 2,59 % H, 20,01 % N, 20,25 % Cl

nájdené 48,06 % C, 2,67 % H, 19,68 % N, 20,17 % Cl

500 MHz 1H NMR / $CDCl_3$ / :

δ 6,69 /m, 3H, ArH/, δ 7,58 /š s, 1H, NH/, δ 7,19 /m, 5H, ArH/.

Príklad 47a

3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-3,4-dimethoxyfenyletylkarbamoyl/imín

2,47 g /10 mmólov/ 3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochlorid pripraveného v príklade 1 sa rozpustí v 30 ml vody, ku ktorej bolo pridané 0,9 g /10,7 mmólov/ hydrogénuhličitanu sodného. Po ukončení vývoja oxidu uhličitého sa pridá 30 ml dichlórmétánu a 2,1 g /10 mmólov/ homoveratrylizokyanátu v 5 ml dichlórmétánu. Zmes sa potom intenzívne mieša 30 minút pri teplote miestnosti, pričom sa potom oddelia fázy. Metylénychloridová fáza sa premyje vodou, odfiltruje a odparí. Substancia sa potom mieša s dietyléterom.

Výťažok : 3,60 g - 86,12 %

Teplota topenia : 148 až 151° C

IR : 1660 cm^{-1} /N-CO-NH/, 1260, 1030 cm^{-1} /OCH₃/

Elementárna analýza pre $C_{19}H_{20}ClN_5O_4$:

vypočítané 54,61 % C, 4,82 % H, 16,76 % N

nájdené 54,22 % C, 4,67 % H, 16,72 % N

Príklad 48

3-/4-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-4-pyridinoyl/-imín

0,90 g /5 mmólov/ chloridu kyseliny izonikotínovej sa

pridá k ľadom chladenej suspenzii 1,24 g /5 mmólov/ 3-/4-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochloridu pripraveného v príklade 13 v 15 ml pyridínu.

Zmes sa mieša pri teplote miestnosti hodinu a potom sa pridá 20 ml vody /vývoj tepla/. Zmes sa ochladí ľadom a substancie sa oddelia filtráciou. Substancia sa potom intenzívne premyje vodou a éterom.

Výťažok : 1,35 g - 85,52 %

Teplota topenia : 180 až 184° C

Elementárna analýza pre $C_{14}H_{10}ClN_5O_2$:

vypočítané 53,36 % C, 3,20 % H, 22,13 % N, 11,23 % Cl

nájdené 53,26 % C, 3,19 % H, 22,18 % N, % Cl

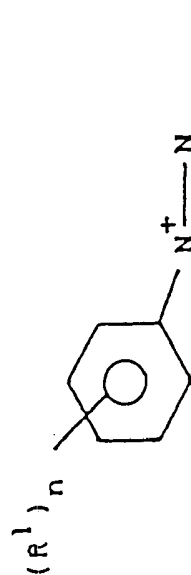
500 MHz 1H NMR / d_6 - DMSO/ :

δ 8,77 /dd, 2H, PyrH, J = 6 Hz, J = 1,5 Hz/, δ 7,99 /dd, 2H, PyrH, J = 6 Hz, J = 1,5 Hz/, δ 7,77 /d, 1H, ArH, J = 9 Hz/, δ 7,81 /d, 1H, ArH, J = 2 Hz/, δ 7,71 /dd, 1H, ArH, J = 9 Hz, J = 2 Hz/.

Príklady 49 až 59

Zlúčeniny uvedené v tabuľke 3 boli pripravené spôsobom popísaným v príklade 48.

Tabulka 3



Príklad č.	(R ¹) _n	R ₂	výťažok	teplota topenia, °C	IR (KBr) (cm ⁻¹)	UV (etha- nol (nm)
49	3-CF ₃	CO ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	30%	136-137	1710, 1210 (ester); 1630 (C-N ⁻ -CO); 1340-1310 (CF ₃)	
50	3-CF ₃	4-CO-C ₅ H ₄ N	48%	166-167	1670-1580 (C-N ⁻ -CO); 1350-1300 (CF ₃)	
51	2-CH ₃ , 3-Cl	SO ₂ CH ₃	86%	165-167	1640, 1310, 1150 (C-N ⁻ -SO ₂)	
52	2-CH ₃ , 3-Cl	SO ₂ C ₆ H ₄ -CH ₃	86.1%	172-173	1670, 1630, 1320, 1170 (C-N ⁻ -SO ₂)	
53	2-CH ₃ , 3-Cl	CO ₂ C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	98.3%	122-123	1660, 1600 (C-N ⁻ -CO); 1250, 1010 (OCH ₃)	273
54	2-CH ₃ , 3-Cl	3-CO-C ₅ H ₄ N	69%	82-84	1660, 1580 (C-N ⁻ -CO)	
55	2-CH ₃ , 3-Cl	3-CO-C ₅ H ₃ N-5-Br	92%	149-150	1670-1580 (C-N ⁻ -CO)	
56	2-CH ₃ , 3-Cl	4-CO-C ₅ H ₄ N	69.7%	122-123	1660-1590 (C-N ⁻ -CO)	
57	4-CH ₃ , 3-Cl	3-CO-C ₅ H ₄ N	36.3%	142-144	1650, 1610, 1585 (C-N ⁻ -CO)	279
58	2-CH ₃ , 5-Cl	4-CO-C ₅ H ₄ N	50.2%	157-158	1655, 1590 (C-N ⁻ -CO), 1010 (OCH ₃)	269
59	2-CH ₃ , 5-Cl	2-CO-CH ₂ C ₄ H ₃ S	46.9%	89-91 d	1675, 1630 (C-N ⁻ -CO)	

Príklad 60

3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-1-metylpropyl/imín-hydrochlorid

1,5 g /20 mmólov/ etylnitritu sa prikvapká do ľadom chladenej zmesi 2,16 g /8 mmólov/ 1-/3-chlór-2-metylfenyl/-4-/1-metylpropyl/tiosemikarbazidu a 2 ml 37 %-nej kyseliny chlorovodíkovej v 80 ml etanolu počas 5 minút. Krátko na to sa začne zrážať síra. Zmes sa potom hodinu mieša, síra sa odfiltruje a zmes sa odparí. Pridá sa éter /asi 50 ml/ a substancia začne pomaly kryštalizovať. Kryštály sa oddelia filtráciou a usušia sa.

Výťažok : 2,00 g - 93,73 %

Teplota topenia : 151 až 153° C

Elementárna analýza pre $C_{12}H_{15}ClN_4O \cdot HCl \cdot 1/4 H_2O$

vypočítané 47,54 % C, 5,32 % H, 18,48 % N, 23,48 % Cl

nájdene 46,91 % C, 5,34 % H, 18,17 % N, 23,45 % Cl

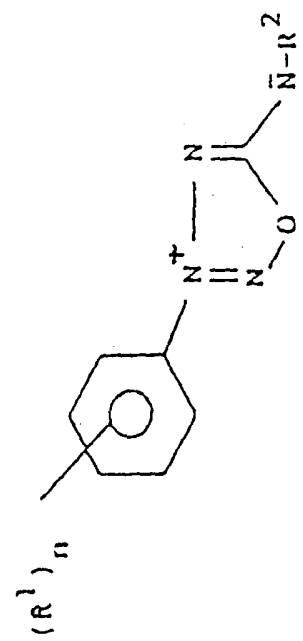
500 MHz 1H NMR / d_6 - DMSO/ :

δ 7,84 /m, 3H, ArH/, δ 3,77 /m, 1H, CH/, δ 1,69 /m, 2H, CH_2 /, δ 1,33 /d, 3H, CH_3 /, δ 0,96 /t, 3H, CH_3 /.

Príklady 62 a 63

Zlúčeniny uvedené v tabuľke 4 boli pripravené spôsobom popísaným v príklade 60.

Tabulka 4



Příklad číslo	$(R^1)_n$	R_2	výťažek	teplota topení, °C	IR (KBr) (cm^{-1})
62	CH ₃ , 3-Cl	C ₆ H ₄ -4-CH ₃ , HCl	84.3%	150-160	1680 (C-N ⁺ -C, HCl); 1460, 1380 (alif.)
63	CH ₃ , 3-Cl	C ₆ H ₁₁ , HCl	57%	164-166	3000-2700 (alif.); 1695 (C-N ⁺ -C, HCl)

Príklad 64

3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-3-metoxypyl/imín-hydrochlorid

1,15 g /4 mmólov/ 1-/3-chlór-2-metylfenyl/-4-/3-metoxypyl/tiosemikarbazidu sa suspenduje v 40 ml 96 %-ného etanole a 1 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Zmes sa ochladí ľadom a prikvapká sa roztok 0,55 g /8 mmólov/ dusitanu sodného v 2 ml vody s tým výsledkom, že suspenzia sa rozpustí a potom začne zrážanie síry. Zmes sa znova mieša jednu hodinu a potom sa sfiltruje. Zmes sa odparí pri maximálne 30° C a pridá sa 10 ml etanolu a potom 50 ml éteru na substanciu s tým účinkom, že sa substancia vyzráža. Výsledný produkt sa oddelí filtráciou a usuší.

Výťažok : 1,0 g - 78 %

Teplota topenia : 133,1 až 133,3° C

IR /KBr/ /cm⁻¹/ : 3000 - 2700 /alifatický/, 1710 /C-N⁻-C, HCl/, 1085 /OCH₃/.

Príklad 65

3-/4-metylsulfonylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochlorid

Roztok 4,66 g /25 mmólov/ 4-metylsulfonylfenylhydrazínu v 100 ml suchého tetrahydrofuránu sa pri 0° C pridá k roztoku 1,32 g /12,5 mmólov/ brómkyanu v 10ml éteru. Zmes sa za chladu zmieša hodinu a potom sa oddelí filtráciou a premyje sa suchým éterom. Filtrát sa ochladí na teplotu medzi -20 a -40° C a potom sa pridáva oxid dusnatý počas asi 45 minút.

K zmesi sa potom pridá nadbytok etanolu/kyseliny chlorovodíkovej a zmes sa ďalej mieša pri 5° C 4 hodiny. Výsledné kryštály sa oddelia filtráciou po rekryštalizácii z etanolu.

Výťažok : 1,20 g - 35 %

Teplota topenia : 193 až 195° C

IR a UV majú rovnaké výsledky ako boli získané v produkte podľa príkladu 10.

Príklad 66

1,2-bis-/3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazolyl-5-karbamoyl/benzén

4,94 g /20 mmólov/ 3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochloridu pripraveného v príklade 1 sa rozpustí v 60 ml vody, potom sa za miešania pridá 3,78 g /45 mmólov/ hydrogenuhličitanu sodného. Po ukončení vývoja oxidu uhličitého sa pridá 60 ml dichlórmétanu, výsledná substancia sa rozpustí. Potom sa pridá 2,13 g /10 mmólov/ etylchloridu k zmesi. Zmes sa 45 minút mieša pri teplote miestnosti, potom sa oddelí metylénchloridová fáza. Táto fáza sa dvakrát premyje 60 ml vody a potom sa odparí. Substancia sa mieša s malým množstvom dietyléteru a oddelí sa filtráciou.

Výťažok : 3,53 g - 64,1 %

Teplota topenia : 176 až 178° C

IR : 1685 cm⁻¹ široký /C-N-CO/.

Elementárna analýza pre C₂₄H₁₆Cl₂N₂O₄

vypočítané 52,28 % C, 2,93 % H, 20,32 % N, 12,86 % Cl

nájdene 51,87 % C, 3,17 % H, 20,02 % N, 12,55 % Cl

Príklad 67

1,4-bis-/3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazolyl-5-karbamoylamino/benzén

3,40 g /13,4 mmólov/ 3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-imín-hydrochloridu pripraveného v príklade 1 sa rozpustí v 50 ml vody a pridá sa za miešania postupne 2,25 g /26,8 mmólov/ hydrogenuhličitanu sodného. Po ukončení vývoja oxidu uhličitého sa pridá 50 ml dichlórmétanu, čím sa vyzrážaná substancia rozpustí a potom sa pridá 1,1 g /6,9 mmólov/ 1,4-fenyléndiizokyanátu v 20 ml metylénchloridu. Zmes sa 60 minút mieša pri teplote miestnosti a potom sa oddelí metylénchloridová fáza. Táto fáza sa dvakrát premyje 50 ml vody a

odparí. Substancia sa mieša s malým množstvom dietyléterom a oddelí sa filtráciou.

Výťažok : 3,02 g - 78,5 %

Teplota topenia : 200 až 201° C /rozklad/

IR 1660 cm⁻¹ /N-CO-NH/

Elementárna analýza pre C₂₄H₁₈Cl₂N₁₀O₄ :

vypočítané 49,53 % C, 3,12 % H, 24,10 % N, 12,20 % Cl

nájdené 49,52 % C, 3,10 % H, 23,33 % N, 12,50 % Cl.

Príklad 68

3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-1-adamantyl/-imín-hydrochlorid

5,1 g /14,6 mmólov/ 1-/3-chlór-2-metylfenyl/-4-/1-adamantyl/tiosemikarbazidu sa rozpustí v 1,5 l metanole a 1,5 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Zmes sa ochladí ľadom a pridá sa 1,26 ml /30 mmólov/ etylnitritu a zmes sa opäť mieša 2 hodiny pri teplote miestnosti. Zakalený roztok sa potom oddelí filtráciou a odparí. Substancia kryštalizuje po niekoľkých hodinách v prítomnosti dietyléteru zmiešaného s malým množstvom etanolu. Substancia sa odfiltruje a premyje sa éterom.

Výťažok : 2,9 g - 52,1 %

Teplota topenia : 204,3 až 204,8° C

Elementárna analýza pre C₁₈H₂₁ClN₄O . HCl

vypočítané 56,7 % C, 5,82 % H, 14,69 % N

nájdené 55,18 % C, 5,80 % H, 14,17 % N

IR 2910 cm⁻¹, 2860 cm⁻¹ /alifatický/, 1695 cm⁻¹ /C-N-C, HCl/.

Príklad 69

3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxatriazol-5-/N-3-hydroxyfenylkarbamoyl/imín

2,47 g /10 mmólov/ 3-/3-chlór-2-metylfenyl/-1,2,3,4-oxa-

triazol-5-imín-hydrochloridu pripraveného v príklade 1 sa rozpustí v 30 ml vody a potom sa postupne za miešania pridá 0,9 g /10,7 mmólov/ hydrogénuhličitanu sodného. Po ukončení vývoja oxidu uhličitého sa za intenzívneho miešania pridá 30 ml toluénu s 3-hydroxyfenylizokyanátom. Zmes sa potom mieša ďalej 30 minút, vyzráža sa žltá substancia. Táto substancia sa oddelí filtráciou a premyje sa dvakrát etanolom a raz dietyléterom.

Výťažok : 1,1 g - 31,8 %

Tepnota topenia : 164 až 165° C

Elementárna analýza pre $C_{15}H_{12}ClN_5O_3$:

vypočítané 52,11 % C, 3,50 % H, 20,26 % N

nájdene 51,37 % C, 3,42 % H, 19,36 % N

IR : 1630 cm^{-1} /N-CO-NH/, 1320 cm^{-1} , 1210 cm^{-1} /ArOH/

Farmakologické testy

1. Inhibícia agregácie krvných doštičiek

Zlúčeniny podľa vynálezu boli testované na inhibíciu tvorby zhlukov /agregáciu/ krvných doštičiek /trombocytov/, ktorá je prvou fázou tvorby krvných zrazenín /trombov/. Takáto inhibícia môže brániť tvorbu krvných zrazenín a inhibovať vývoj nových trombov po diagnostike trombu.

Metóda demonštrácie tohoto účinku je tzv. agregometrické meranie, ktoré prvýkrát popísal Born /Nature, Lond. 194, 927-929, 1962/. Použije sa citrátom stabilizovaná /0,38 % citrátu sodného, finálna koncentrácia/ krv zo žily zdravých pokusných osôb, ktoré nepoužívali lieky najmenej 8 dní. Slabé odstredenie /160 x g po 10 minút/ vedie k PRP /krvná plazma bohatá na doštičky/, ktorá sa pipetuje. PPP /plazma chudobná na doštičky/ sa získa intenzívnym miešaním a odstredením /3000 x g po 10 minút/ zvyšku krvi. Meria sa priepustnosť svetla agregometrom /CHRONOLÓG/. PRP neprepúšťa takmer žiadne svetlo, zatiaľ čo PPP prepúšťa svetlo úplne. PRP sa umiestni do agregometra pri 37° C za miešania magnetom. Prídavok pro-

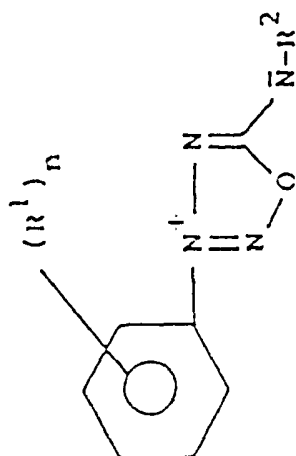
agregačnej substancie spôsobuje postupnú agregáciu PRP a súčasne zvýšenie priepustnosti svetla. Pri úplnej agregácii sa dosiahne priepustnosť svetla zodpovedajúca PPP. Ako proagregačná substancia sa použije adenosíndifosfát /ADP/, táto substancia predstavuje základný biochemický mechanizmus agregácie krvných doštičiek. Testované substancie sa inkubujú 3 minúty v PRP umiestnené v agregometri pri 37° C za magnetického miešania. Potom sa pridá vopred stanovená pozitívna agregačná dávka adenosíndifosfátu /ADP/ /2 až 4 μ M/. Skúšajú sa aspoň tri rôzne koncentrácie testovanej substancie pre demonštráciu na dávke závislej inhibície agregácie. Tzv. IC₅₀- hodnota /t.j. koncentrácia inhibujúca agregáciu z 50 % vzťahnuté na kontrolnú agregáciu/ sa vypočíta pre každú testovanú substanciu lineárnou regresnou analýzou /log koncentrácie μ M ako konštanta na súradnici a % inhibície ako premenná na poradnici/. Boli použité nasledujúce referenčné substancie : nitroglycerín /GTN/, nitroprusid sodný /NNP/ a SIN-1 /aktívny metabolit molsidominu/.

Výsledky ôsmich zlúčenín podľa vynálezu sú uvedené spolu s referenčnými substanciami v tabuľke 5.

Z tabuľky 5 je zrejmé, že zlúčeniny podľa vynálezu sú vynikajúce vzhľadom na najlepšiu referenčnú substanciu. V tomto teste nebol nitroglycerín aktívny.

Tabuľka 5

Inhibícia agregácie krvných doštičiek



	(R ¹) _n	R ²	IC ₅₀ μM
GTN			100
NWP			2.7
SIN-1			3.9
príklad č.			
7	3-lyano	H, HCl	0.10
1	2-methyl, 3-chlor	H, HCl	0.32
13	2-methyl, 4-chlor	H, HCl	0.20
18	3-trifluormethyl, 4-chlor	H, HCl	0.54
20	2-methoxy, 5-chlor	H, HCl	0.18
34	3-trifluormethyl	nikotinoyl	0.19
50	3-trifluormethyl	isonicotinoyl	0.09
38	2-methyl, 3-chlor	acetylsalicyl	0.20

2. Inhibícia inhibítora aktivátora plazminogénu /PAI/ z krvných doštičiek /fibrinolytická aktivita/

Zlúčeniny podľa vynálezu boli testované na svoju inhibíciu inhibítora aktivátora plazminogénu /PAI/. Vzniknutý trombus obsahuje agregované doštičky spojené fibrínom. Organizmus má fibrinolytický systém na udržiavanie normálnych fyziologických podmienok. Endogénny plazminogén je aktivovaný na plazmín /fibrinolyzín, t.j. proteolytický enzým rozkladajúci fibrín/ pomocou aktivátora pletivového plazminogénu /t-PA/. Doštičky obsahujú enzým PAI-1 inhibujúci aktiváciu plazminogénu na plazmín a tiež i rozklad fibrínu.

Všeobecná stimulácia fibrinolytického systému môže spôsobiť rad hemostatických vedľajších účinkov /haemorrhages/. Špecifická inhibícia PAI-1 vyvoláva zvýšenú fibrinolýzu na plochách s mnohými doštičkami, čo je exaktný prípad v trombe. Výsledkom je získaný trombolýtický účinok.

Spôsob demonštrácie inhibície PAI-1 je popísaný Lidburym a spol. /Brit. J. Pharmacol. 101, 527-530, 1990/. Ľudská PRP pripravená slabým odsredením, ako bolo uvedené vyššie, bola použitá v tomto teste, ale pracuje sa pri nízkej teplote /4° C/. Pri inkubácii PRP /1 ml v skúmavke z plastickej hmoty/ sa počas slabého trepania pri 37° C uvoľňuje PAI-1 aktivita a táto PAI-1 aktivita je meraná spektrofotometricky pomocou dvojstupňového postupu použitím komerčných kitov /Spectrolyse TM/fibrin kit od BIOPOL, Švédsko/.

PAI-1 aktivita kontrolnej PRP a PRP inkubovanej s každou zo 6 zlúčenín podľa vynálezu a nitroprusidu sodného ako referenčnej substancie /NNP/ /50 µM každej zlúčeniny po 60 min./ je zrejmá z tabuľky 6. Tabuľka 6 tiež ukazuje percento inhibície PAI-1 aktivity v porovnaní s kontrolnými inkubáciami.

Z tabuľky 6 je zrejmé, že zlúčeniny podľa vynálezu sú všetky účinnými inhibítormi uvoľnenia PAI-1 z doštičiek. Ich účinnosť je porovnateľná s účinnosťou nitroprusidu sodného /NNP/.

Tabuľka 6

Inhibícia PAI-1 aktivity

Substancia /50 μ m/	PAI-1 aktivita /U-10 ⁸ doštičiek/	% inhibície
kontrola	3,24	
nitroprusid sodný	1,99	39
príklad č.		
8	1,83	44
24	2,14	34
20	2,09	35
12	2,04	37
18	1,93	40
1/29 /báza/	1,97	39

3. Stimulácia guanylát-cyklázy z krvných doštičiek

Zlúčeniny podľa vynálezu boli testované na ich stimuláciu guanylát-cyklázy. Biologický účinok NO /oxid dusnatý/ na mnoho buniek /napríklad doštičky a polymorfne nukleárne leukocyty/ je spôsobovaný stimuláciou enzýmu, rozpustnej guanylát-cyklázy. Výsledkom je tvorba cyklického guanozínmonofosfátu /c-GMP/. Zlúčeniny podľa vynálezu sú všetky NO-donormi. Zvýšenie cyklického guanozínmonofosfátu /c-GMP/ v doštičkách vedie inter alia k zníženiu možnosti agregácie a k zníženej schopnosti adherovať na stenách krvného riečišťa.

Metóda doloženia stimulácie guanylát-cyklázy je popísaná Axelssonom a Anderssonom /European J. Pharmacol. 88, 71-79, 1983/. Ľudské doštičky sú homogenizované a odstreďované v ľadovo studenom médiu. Aktivita guanylát-cyklázy v supernatante po inkubácii s a bez testovanej substancie po 15 minútach pri 37° C sa meria technikou rádioimunoskúšky /RIA/. Princípom je, že sa v konštantnom množstve pridá guanozíntrifosfát /GTP/ a pôsobením guanylát-cyklázy sa prevedie na cyklický guanozínmo-

nofosfát /c-GMP/, ktorý sa stanoví rádioimunoskúškou.

V koncentráciách 0,01 μM , 0,1 μM , 1,0 μM a 10 μM sa testovalo jedenásť zlúčenín podľa vynálezu a referenčné substancie nitroprusid sodný /NNP/ a SIN-1. Stimulácia závislá od dávky aktivity guanylát-cyklázy je uvedená pre všetky zlúčeniny.

Tabuľka 7 ukazuje stimuláciu po 0,01 μM a 10 μM . Zlúčeniny podľa vynálezu stimulujú aktivitu guanylát-cyklázy už v najslabších koncentráciách, čo nie je prípadom nitroprusidu sodného /NNP/ a SIN-1.

Tabuľka 7

Stimulácia guanylát-cyklázy v doštičkách

Substancia	aktivita guanylát-cyklázy /pmol c-GMP/mg prot. x 15 minút/	
koncentrácia	0,01 μM	10 μM
nitroprusid sodný	0	3399
SIN-1	0	59733
príklad 2	411	37920
príklad 8	897	64192
príklad 24	2374	59716
príklad 20	2225	47298
príklad 3	2499	47529
príklad 23	383	76915
príklad 1/29 /báza/	4407	61900
príklad 54	8139	18693
príklad 38	1024	82100
príklad 13	7642	48126
príklad 63	1761	72730

4. Relaxačný vplyv na tracheu

Zlúčeniny podľa vynálezu boli testované na svoju schopnosť relaxovať pre-kontraktovanú tracheu. Kontrakcia dýchacích

ciest v kombinácii so zväčšením mukózne membrány predstavuje vitálny faktor astmatických stresov. Relaxácia alebo dilatácia stiahnutých dýchacích ciest bude zlepšovať astmatický stav.

Spôsob demonštrácie relaxácie pre-kontraktovanej trachey je popísaný Emmersonom a Mac Kayom /J. Pharmacol. 31, 798, 1979/. Použije sa izolovaná trachea morčiat. Po príprave rezov z kruhového svalstva sa orgán rozdelí na dva diely rovnakej veľkosti. Dva tracheálne rezy sa suspendujú v svojom, resp. orgánovom kúpeli a spoja sa so zariadením, zaznamenávajúcim kontrakciu a relaxáciu orgánu na rekordéri. Dva tracheálne rezy sú kontinuálne máčané v Krebsovom pufri pri 37°C , konštantne prebublávanom karbogénom /95 % O_2 a 5 % CO_2 /. Po asi 3 hodinách ekvibrácie sa orgány testujú na svoju citlivosť /kontraktilitu/ na karbamylcholinový bolus pridaný priamo do kúpeľa /0,3 μM /. Ak je kontrakcia dostačujúca, orgány sa prenesú do Krebsovho pufra obsahujúceho rovnakú koncentráciu karbamylcholínu. Orgány sa potom konštantne vystavia karbamylcholínu a pomaly sa vyvíja permanentná kontrakcia /astma/. Priamo do orgánového kúpeľa sa pridá bolus testovanej substancie. Po maxime účinku /relaxácii/ sa substancia odstráni premytím a tracheálny rez sa vráti do stavu svojej permanentnej kontrakcie. Testujú sa aspoň 3 rôzne koncentrácie testovanej substancie pre demonštráciu od dávky závislej relaxácie orgánu. Vypočíta sa EC_{50} -hodnota /t.j. koncentrácia uvoľňujúca orgán z 50 % vzhľadom na maximálnu relaxáciu/ pre každú testovanú substanciu pomocou lineárnej regresnej analýzy /log koncentrácie / μM / ako konštanty na súradnici a % relaxácie ako premenná na poradnici/. Nitroprusid sodný /NNP/ a SIN-1 boli použité ako referenčné substancie.

Výsledky ôsmich zlúčenín podľa vynálezu a dvoch referenčných substancií sú uvedené v tabuľke 8.

Z tabuľky 8 je zrejmé, že zlúčeniny podľa vynálezu sú účinnosťou rovnocenné NNP pokiaľ ide o uvoľňovanie pre-kontraktovaných rezov a sú účinnejšie ako SIN-1. Je potrebné uviesť, že zlúčeniny podľa vynálezu majú dlhodobejší účinok v porovnaní s referenčnými substanciami.

Tabuľka 8

Relaxácia trachey

Substancia	EC ₅₀ μ M
nitroprusid sodný /NNP/	2,5
SIN-1	18,3
príklad č.	
53	0,7
20	2,7
12	4,9
1/29 /báza/	0,8
54	0,6
38	3,2
13	1,1
47a	5,2

5. Inhibícia funkcie leukocytov

Zlúčeniny podľa vynálezu boli testované na svoju schopnosť zvyšovať obsah cyklického guanozínmonofosfátu /c-GMP/ na inhibíciu syntézy leukotrienu B₄ /LTB₄/ a na inhibíciu chemotaktického pohybu polymorfných nukleárnych leukocytov /PMN/. Polymorfné nukleárne leukocyty predstavujú vitálnu časť v bunečnej časti zápalového procesu. Pri chorobách, ako je astma, je mukózna membrána dýchacích ciest zväčšená ako výsledok zápalu s významnou infiltráciou najmä polymorfných nukleárnych leukocytov /PMN/. Zvlášť účinné substancie na liečbu astmy sú tie, ktoré navyše na relaxáciu svalstva v respiračných cestách majú tiež protizápalový účinok na bunečnú fázu zápalového procesu, to znamená, že inhibujú funkciu leukocytov.

Spôsob demonštrácie inhibície funkcie leukocytov je popísaný Moilanenom a spol. /Abstracts, 2. International Symposium on Endothelium Derived Vasoactive Factors, Bazilej, 1992/. Izolované ľudské PMN sa inkubujú pri 37° C 10 minút, potom sa meria obsah cyklického guanozínmonofosfátu /c-GMP/. Ďalej sa stanoví syntéza LTB₄ po stimulácii s Ca-ionoforom /A23187/ a

chemotaxia /riadený pohyb/ voči FMLP /substancie, priťahujúce polymorfné nukleárne leukocyty, PMN/.

Tri zlúčeniny podľa vynálezu a referenčná substancia SIN-1 sa testujú na svoju schopnosť stimulovať obsah cyklického guanozínmonofosfátu /c-GMP/.

Tabuľka 9 predstavuje od dávky závislé zvýšenie obsahu c-GMP v PMN. Zlúčeniny podľa vynálezu sú účinnejšie ako SIN-1.

Zlúčeniny podľa vynálezu inhibujú navyše syntézu leukotrienu B_4 v PMN a PMN chemotaxiu voči FMLP. SIN-1 bol tiež schopný inhibovať tieto funkcie leukocytov, ale len pri použití vo vyšších koncentráciách.

Popis pripojených obrázkov

Obr. 1 ilustruje inhibíciu chemotaxie pre 2 zlúčeniny podľa vynálezu

Obr. 2 ilustruje inhibíciu syntézy leukotrienu B_4 v porovnaní so zvýšením obsahu c-GMP v polymorfných nukleárnych leukocytoch /PMN/ pre jednu zlúčeninu podľa vynálezu

Je zrejmé, že paralelne môže byť zobrazený vzťah medzi zvýšením cyklického guanozínmonofosfátu /c-GMP/ a znížením syntézy LTB_4 a chemotaktickým pohybom PMN.

Tabuľka 9

Stimulácia c-GMP v PMN

Substancia	koncentrácia μM	c-GMP /fmól ^x /10 ⁶ buniek
SIN-1	0	14
	1	32
	10	220
	100	473
príklad 24	0	13
	1	391
	10	965
	100	1078
príklad 20	0	13
	1	175
	10	492
	100	866
príklad 1/29 /báza/	0	14
	1	209
	10	859
	100	1044

$$x_f = 10^{-15}$$

Testy toxicity

Boli uskutočnené dva testy na samcoch krýs a to stanovenie "maximálnej tolerovanej dávky" /MTD/ a test s použitím násobných perorálnych dávok. Ďalej bol uskutočnený LD₅₀ test intravenózne na myšiach.

1. Stanovenie maximálnej tolerovanej dávky

V MTD-teste bola 10 zvieratám podaná dávka substancie raz denne celý týždeň, počas tejto doby boli zaznamenávané

klinické a hematologické parametre. Nakoľko sa neobjavili žiadne výrazné vedľajšie účinky, bola dávka zvýšená nasledujúci týždeň až do objavenia sa vedľajších účinkov. Hematologické parametre, ktoré boli merané, boli nasledujúce : počet červených a bielych krviniek, počet krvných doštičiek, percento hemoglobínu, hematokrit a pre červené krvinky tiež priemerný objem bunky, priemerný obsah bunčného hemoglobínu a priemerná koncentrácia bunčného hemoglobínu. Ďalej bolo uskutočnené diferenciálne spočítanie bielych krviniek.

Výsledky testu sú uvedené v tabuľke 10.

Tabuľka 10

Príklad č.	dávka mg/kg	klinické pozorovanie ^x	hematologické parametre ^x	zvýšenie hmotnosti ^x
------------	-------------	-----------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------

MTD štúdia i.p.

1	10	N.R.	N.R.	N.R.
	20	CNS efekt	zvýšenie neutrofilných granulocytov s toxickou granuláciou	zníženie

MTD štúdia p.o.

1	10	N.R.	N.R.	N.R.
	20	N.R.	N.R.	N.R.
	40	N.R.	znížené RBC ¹ znížené HGB ² zvýšené WBC ³	N.R.

^x hodnotené vzhľadom ku kontrolnej skupine

N.R. = nič významné

¹ = červené krvinky

² = percento hemoglobínu

³ = biele krvinky

Zlúčenina pripravená podľa spôsobu uvedenom v príklade 1

podávaná intraperitoneálne krysám, bola tolerovaná len s malými vedľajšími účinkami až do 20 mg/kg /~ MTD/. Najvýznamnejšie vedľajšie účinky pri 20 mg/kg boli účinky na CNS, kde zvieratá niekoľko minút po podaní boli nervózne a hyperaktívne a kde bola zreteľná toxická reakcia v obraze bielych krviniek /zvýšený počet neutrofilných granulocytov a toxická granulácia v niektorých bunkách/.

Zodpovedajúca hodnota /MTD/ pri použití tej istej zlúčeniny pri perorálnom podaní bola 40 mg/kg. Po podaní tejto dávky bola zaznamenaná anémia a zvýšený obsah bielych krviniek sa prejavil po jednom týždni.

2. Perorálne podanie adsoľnej dávky

V tomto teste boli substancie podávané perorálne v dávke 20 mg/kg ako roztoky alebo suspenzie raz denne počas 5 dní skupine 5 zvierat. Klinické pozorovania boli uskutočňované každý deň a boli merané vyššie uvedené parametre na treť deň testu. Výsledky sú uvedené v tabuľke 11.

Tabuľka 11

Príklad č.	dávka mg/kg	klinické pozorovanie ^x	hematologické parametre ^x	zvýšenie hmotnosti ^x
5-dňové perorálne podanie				
21	20	N.R.	N.R.	N.R.
26	20	N.R.	N.R.	N.R.
43	20	N.R.	N.R.	N.R.
38	20	N.R.	N.R.	N.R.
50	20	N.R.	N.R.	N.R.

x hodnotené vzhľadom na kontrolnej skupine

N.R. = nič významné

V dávke 20 mg/kg zlúčeniny pripravené v príkladoch 21, 26, 43, 38 a 50 nevyvolávali žiadne vedľajšie účinky krysám po 5-dňovom podávaní.

3. LD₅₀ test

/Podľa Lichtfielda a Wilcoxon, J. Pharmacol. Exp. Therap. 96, 99 - 113, 1949/.

Intravenózna LD₅₀-hodnota bola stanovená po jednej jednotlivkej injekcii rôznych dávok zlúčeniny pripravenej podľa príkladu 4.

Výsledky sú zrejmé z tabuľky 12.

Tabuľka 12

Príklad č.	LD ₅₀ mg/kg s 95 % samci myši	LD ₅₀ mg/kg s 95 % samice myši
4	89/82-97/	81/75-88/

4. Farmakologické závery

Zlúčeniny podľa vynálezu majú farmakologické vlastnosti vhodné na liečbu trombózy a astmy.

Trombóza

Inhibícia agregácie krvných doštičiek spolu s inhibíciou PAI a stimuláciou c-GMP v doštičkách predstavuje zlúčeniny ako zaujímavé na prevenciu trombózy a pre disolúciu už zisteného trombu.

Astma

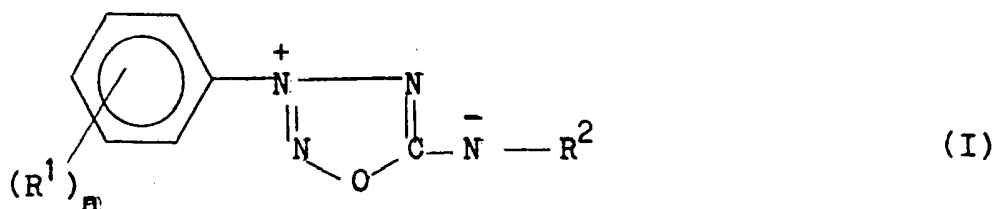
Relaxácia dýchacích ciest spolu s inhibíciou funkcie leukocytov predstavuje zlúčeniny ako zaujímavé na liečbu astmy, pričom druhá z uvedených vlastností bude inhibovať zápalové zväčšenie mukózne membrány v dýchacích cestách.

Naviac k vyššie uvedeným farmakologickým vlastnostiam zlúčenín podľa vynálezu, tieto majú tiež relaxačný účinok na bunky iných hladkých svalov, napríklad v artériách, žilách a v kavernózných pletivách. Ďalej znižujú krvný tlak krýs.

Vynález bol popísaný svojimi výhodnými uskutočneniami. Je však možné uskutočniť veľa modifikácií bez toho, aby nastalo odchýlenie sa od rozsahu vynálezu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. 3-substituované 1,2,3,4-oxatriazol-5-imínové zlúčeniny všeobecného vzorca I a ich adičné soli s kyselinami



kde R¹ je rovnaká alebo rozdielna alkylová alebo alkoxylová skupina s 1 až 3 atómami uhlíka, halogén, trifluórmetyl, nitro, kyano, fenyl alebo alkylsulfonylová skupina, n je 1 až 5 a R² je vodík alebo skupina vzorca II



kde X je -C/O/-, -C/O/O-, -C/O/NH-, -S/O/₂ alebo priama väzba, Y je alkylénová skupina s 1 až 4 atómami uhlíka alebo priama väzba a Q je alkyl, cykloalkyl, alkoxy alebo fenyl, pyridyl, furanyl, thienyl alebo pyrazinylová skupina, prípadne substituovaná Z, kde Z je alkylová alebo alkoxylová skupina s 1 až 3 atómami uhlíka, halogén, hydroxy, acyloxy, trifluórmetyl, nitro, kyano alebo alkylsulfonyl a m je 0 až 3, kde Z tiež, ak X je -C/O/-, alebo -C/O/NH-, je Y priama väzba a Q je substituovaný fenyl, môže byť štruktúrou I, kde R² má rovnaké významy uvedené pre X, Y a Q vtedy, ak R² nie je vodík, alkyl, benzoyl, trifluórmetyl alebo prípadne substituovaný fenyl, ak R¹ je metyl alebo chlór a n je 1 a R² nie je vodík alebo prípadne substituovaná fenylová skupina, ak je R¹ nitro, alkoxy, fluór alebo bróm a n je 1.

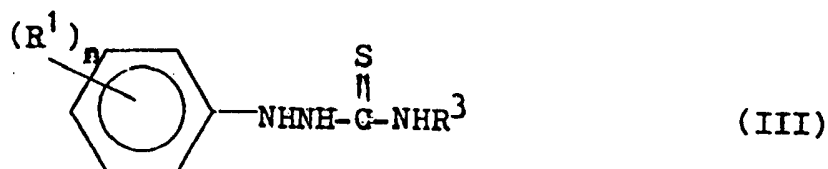
2. 3-substituovaná 1,2,3,4-oxatriazol-5-imínová zlúčenina podľa nároku 1, kde n vo všeobecnom vzorci I je 2 až 4.

3. Farmaceutický prípravok, v y z n a č u j ú c i s a

t ý m, že účinnou zložkou je zlúčenina všeobecného vzorca I podľa nároku 1 v spojení s farmaceuticky prijateľným nosičom alebo riedidlom.

4. Spôsob prípravy 3-substituovaných 1,2,3,4-oxatriazol-5-imínových zlúčenín všeobecného vzorca I podľa nároku 1 a ich adičných solí s kyselinami, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa

a/ uzatvorí kruh 1-aryltiosemikarbazidového derivátu všeobecného vzorca III

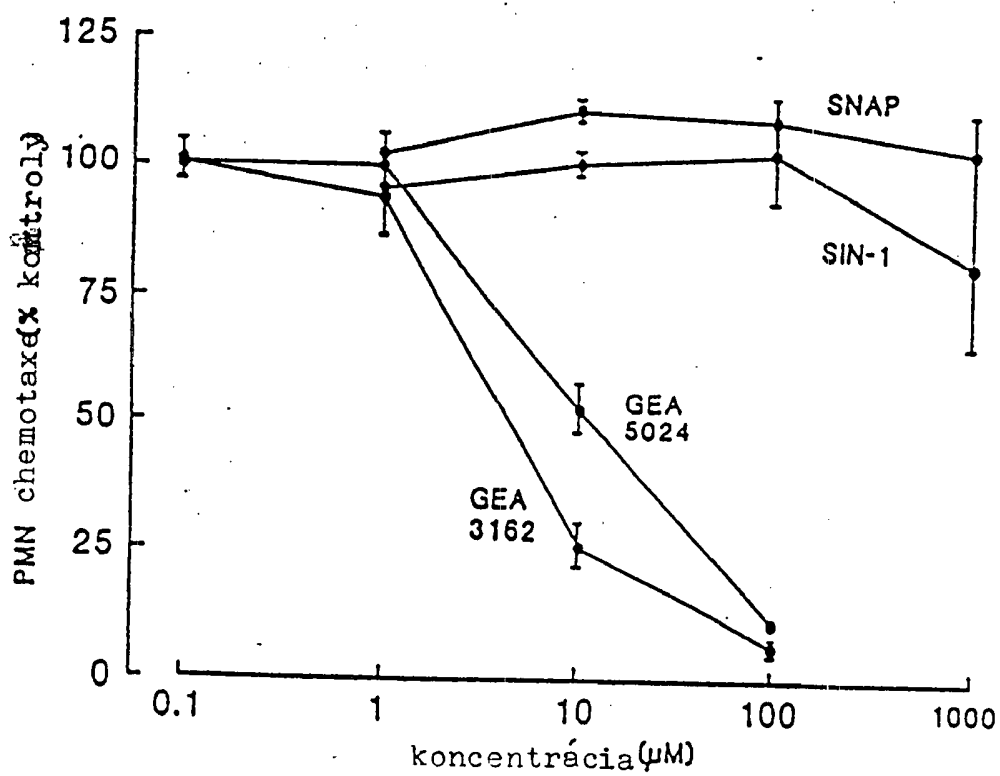


kde R^1 má uvedený význam vo všeobecnom vzorci I a R^3 je alebo H alebo skupina všeobecného vzorca IV



kde X je priama väzba a Y a $Q-/Z/_m$ majú rovnaký význam ako vo všeobecnom vzorci I, spracovaním s alkylnitritom s 1 až 6 atómami uhlíka alebo dusitanom alkalického kovu v kyslých podmienkach pri približne 0 až 10° C a potom sa výsledná soľ prípadne prevedie na voľnú zlúčeninu a ak je to žiadúce, potom sa acyluje.

Obr.1



SNAP = S-nitroso-N-acetyl-penicillamin

PV 789-93

2/2

Obr. 2

