



NORGE

[NO]

STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 133894

(51) Int. Cl.² C 07 D 213/80

(21) Patensøknad nr. 4263/71

(22) Inngitt, 18.11.71

(23) Løpedag 18.11.71

(41) Alment tilgjengelig fra 24.05.72

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 05.04.76

(30) Prioritet begjært 23.11.70, USA, nr. 92137, 92296

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte til fremstilling av nye, terapeutisk aktive nikotinsyrederivater.

(71)(73) Søker/Patenthaver F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT,
Grenzacherstrasse 124-184,
CH-4002 Basel,
Sveits.

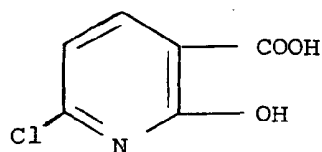
(72) Oppfinner OSCAR NEAL MILLER, Montclair, N.J.,
ALDEN GAMALIEL BEAMAN, East Princeton, Mass.,
USA.

(74) Fullmektig A/S Oslo Patentkontor Dr. ing. K. O. Berg, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Chemical Abstracts 18 1500 (1924), ibid. 45 9052 (1951),
ibid. 47 3309 (1953), ibid. 52 2016g (1958), ibid.
56 12847 i (1962).

133894

Nærværende oppfinnelse vedrører analogifremgangsmåte til fremstilling av et nytt nikotinsyrederivat med formelen



I

og salter av denne forbindelse med baser.

Disse forbindelser har hypolipemiske egenskaper.

Det er kjent at nikotinsyren er hypolipemisk aktiv og at den anvendes til senkning av serumkolesterolnivået og lipidnivået hos mennesker. Nikotinsyren viser imidlertid visse uønskede bivirkninger, f.eks. blodkarutvidelse. Slike bivirkninger er spesielt uønskede fordi hypolipemisk aktive stoffer normalt administreres under en lang tidsperiode. Forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen er med hensyn til sin hypolipemiske aktivitet vesentlig mere aktive enn nikotinsyre, og kan av den grunn administreres i doseringsmengder slik at den uønskede bivirkning unngås.

Den 4-klor-isomere forbindelsen, 4-klor-2-hydroksy-nikotinsyre, er beskrevet fremstilt av Ernst Späth og Georg Koller, Chem. Bericht 56B, side 2454-60 (1923), Chemical Abstr:

133894

vol. 18, s. 1500. Denne forbindelse utgjør kjemisk den nærmeste teknikkens stand. I det følgende beskrives derfor et sammenligningsforsøk mellom denne forbindelsen og 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre fremstilt ifølge oppfinnelsen, som viser den terapeutisk overlegne virkning av 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre.

Forsøksrapport.

Metodologi.

Synkroniserte dyr som var blitt ernært med en diet med høyt karbohydratinhold i syv dager ble foret med mel i 3 timer. 1 time etter at matkoppen var fjernet, ble dyrene injisert med 10 mg pantothenat. Ved 0-tid minus 30 min. ble den første dosen av forsøksforbindelsen injisert i.p., ved 0-tiden en annen dose av forsøksforbindelsen (i.p.) og også ved 0-tiden blandingen av radioaktive lipide precursorer, dvs. 5 μ c ^3H mevalonsyresalt, 5 mg av ikke-radioaktiv mevalonsyre, 5 mg acetat og 5 μ c ^{14}C -acetat ble administrert gjennom halevenen. Ved 0-tid pluss 30 min. ble dyrene halshugget og leverene deres tatt ut for å isolere lipidene. Dyrene var lett bedøvet av Penthrane under administreringen av inhibitorene og lipidprecursorene.

Isolering av kolesterol og fettsyrer fra rottelever.

Hele leveren blir homogenisert i en glass-teflon motordrevet homogenisator, 15 ml vann tilsettes og homogenisatet og 3 ml's alikvoter blir tatt ut for forsåpning og påfølgende ekstraksjon. Til hver av 3 ml's alikvotene tilsettes 21 ml 5N NaOH. Prøvene oppvarmes på et vannbad under tilbakeløp i 3 timer hvoretter 2,6 ml 5N H_2SO_4 tilsettes og blandes. Blandingen ekstraheres 2 ganger med 5 ml petroleter. Petroleterekstraktet kan anvendes for direkte måling av radioaktivitet ved å inndampe alikvoten av prøvene som har blitt plassert i scintillasjonteller-ampuller. Ekstraktet brukes fortrinnsvis til å separere sterolene fra fettsyrene på en ionebytterkolonne.

Ionebytterseparasjon av steroler og fettsyrer.

"Dowex" 1 x 2 (H^+ -form) suspenderes i 90% metanol og en 1 x 10 cm kolonne fremstilles. Kolonnen vaskes med 90% metanol. Petroleterekstraktene, se ovenfor, inndampes til tørrhet og resten løses

133894

i 5 ml abs. metanol. Til denne oppløsningen tilsettes 1 ml vann og om den blir uklar, oppvarmes den forsiktig og noen få dråper metanol tilsettes om nødvendig. Prøven overføres til kolonnen og karet renses med 1 ml 90% metanol fulgt av 5 ml abs. metanol. Kolonnen vaskes med 30 ml abs. metanol: etyleter (1:1). Denne fraksjonen (tilnærmet 45 ml) inneholder de nøytrale lipidene (sterolene). Fraksjonen inndampes til rundt 15 ml og ekstraheres deretter med petroleter. En alikvot av dette petroleterekstraktet fylles i en scintillasjonstellingsampulle og inndampes til tørrhet, hvorefter scintillasjonsvæsken tilsettes (4,75 g PPO og 0,30 g POPOP pr. liter toluen).

Ionebytterkolonnen tilbakevaskes ved å presse 10 ml etyleter-80% metanol-iseddik (5:4:1) fra en sprøyte opp gjennom bunnen av kolonnen. Deretter tilsettes 70 ml av samme oppløsningsmiddel til toppen av kolonnen. Effluenten fra denne kolonnen inneholder så alle fettsyrene som er atskilt fra sterolene. En alikvot (tilnærmet 1/4) plasseres i en telleampulle og inndampes til tørrhet. Scintillasjonsvæsken tilsettes og tellingen utføres i en "Packard Liquid Scintillations Spectrometer No. 3380 med en No. 514 abs. aktivitet-analysator. Både ^{14}C og ^3H er korrigert rettet på DPM.

Resultater

Tabell I viser resultatene ved bruk av 6-klor-2-hydroksynikotinsyre fremstilt ifølge oppfinnelsen sammenlignet med teknikken stand, dvs. 4-klor-2-hydroksynikotinsyre.

Forbindelse	Dose mg/kg	Kolesterol-inhibitering nM mol av ³ H-mevalonat omdannet		Fettsyre-inhibitering nM mol av ¹⁴ C-acetat omdannet		% av kontroll
		193 [±] 21	157 [±] 21	356 [±] 70	287 [±] 47	
6-klor-2-hydroksy- nikotinsyre	0,25	109 [±] 11	108 [±] 16	424 [±] 89	423 [±] 35	55
	0,5	85 [±] 17		232 [±] 59		44
	1					65
	2,5					65
4-klor-2-hydroksy- nikotinsyre	0,25	313 [±] 2	291 [±] 9	804 [±] 222		36
	0,5	283 [±] 11	233 [±] 11	692 [±] 311		123
	1	219 [±] 6		983 [±] 193		106
	2,5			1004 [±] 206		151
Kontroll	5	398 [±] 14		787 [±] 44		154
				625 [±] 24		121

133894

De foregående resultatene er statistisk signifikante og fastslår entydig 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyrens uventede overlegenhet overfor teknikkens stand.

De oppnådde data demonstrerer at:

6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre inhiberer kolesteroldannelsen med rundt 50% ved en dosering som er rundt $1/20$ av dosen som trengs for å oppnå et sammenlignbart resultat med 4-klor-2-hydroksy-nikotinsyre ifølge teknikkens stand, og at sistnevnte forbindelse ikke inhiberer fettsyresyntesen, mens derimot 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre virkelig inhiberer fettsyresyntesen.

6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre erholdes ved at man erstatter kloratomet i stilling 2 i en 2,6-dihalogen-nikotinsyre med hydroksygruppen. Denne erstatning kan utføres ved hydrolyse av 2,6-diklor-nikotinsyre med en base, f.eks. et alkalimetallhydroksyd, f.eks. natriumhydroksyd, ved tilbaketilbakepstemperaturen for reaksjonsblandingen, surgjøring av reaksjonsblandingen med en syre, som f.eks. en halogenhydrogensyre, såsom saltsyre.

Oppfinnelsen vedrører også fremstilling av salter av 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre som kan fås ved omsetning med en base. Herved kan en hvilken som helst base anvendes, som med en karboksylsyre danner et salt. De for terapeutisk administrasjon bestemte salter må være avledet av en base som inneholder en ikke-toksisk farmsøytisk akseptert kation. Eksempler på slike baser er alkalimetallhydroksyder og jordalkalimetallhydroksyder alkalimetallkarbonater og jordalkalikarbonater o.l., f.eks. natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, kalsiumhydroksyd, kalsiumkarbonat o.l., ammoniakk, primære, sekundære og tertiære aminer, f.eks. mono-, di- eller trialkylaminer, f.eks. metylamin, dimetylamin, trimetylamin o.l. og nitrogenholdige heterocykliske aminer, f.eks. piperidin o.l.

133894

Innen fagkretser mener man at kolesterol og andre lipoider spiller en rolle ved utviklingen av atherosklerose, dvs. en fettdegenerasjon av arteriens innerside og på grunn av at kolesterol og forskjellige andre lipoider blir syntetisert av forskjellige kroppsorganer, kan forbindelsen som inhiberer syntesen og hhv. eller reduserer innholdet kolesterol og andre lipoider blir syntetisert av forskjellige kroppsorganer, har forbindelsen som inhiberer syntesen og hhv. eller reduserer innholdet kolesterol og andre lipoider i serumet forhindre atherosklerose. Det ble nå overraskende funnet at bestemte nikotinsyrederivater, nemlig forbindelsen med formel I og dens salter med baser, er hypolipemisk høyaktive.

Forbindelsen med formel I og dens salter med farmsøytisk aksepterbare baser kan anvendes i form av farmsøytiske preparater for den terapeutiske og preventive behandling av atherosklerose.

For en slik anvendelse kan de nevnte forbindelser bringes i egnede doseringsformer for den medisinske administrasjonen. Disse doseringsformer kan være bestemt såvel for den orale som også for den parenterale administrasjonen.

Hyppigheten av administrasjonen av slike farmasøytiske preparater avhenger av mengden aktivstoff i disse preparater og av pasientens behov i hvert enkelt tilfelle. Vanligvis kan doseringer administreres med et aktivstoffinnhold på 0,25 mg/kg til 2,5 mg/kg pr. dag og fordelt på forskjellige enkelt-doseringer. 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre kan administreres i en dosering på 10 mg en gang pr. dag.

EKSEMPEL

Fremstilling av 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre.

En blanding av 6 g 2,6-diklor-nikotinsyre og 78 ml 2-n natriumhydroksydløsning oppvarmes to timer under tilbakelöp, avkjöles og surgjöres med 17 ml 10-n saltsyre. Blandingen kjöles 30 min. på et isbad, og det derved utfelte faste stoff avfiltreres og vaskes med vann. Dette faste stoff slemmes opp i 25 ml varm etanol, filtreres og vaskes med varm etanol. Den i etanolen

133894

uløslige andelen (smeltepunkt $296-298^{\circ}$ under spaltning) omkrystalliseres i 1500 ml etanol-vannblanding (1:2 volum), hvorved man erholder 2-klor-6-hydroksy-nikotinsyre med et smeltepunkt på $300 - 302^{\circ}\text{C}$ (spaltning). Det erholdte filtrat inndampes til tørrhet, og det utfelte faste stoffet oppslemmes i eter, filtreres, vaskes med eter og omkrystalliseres i 20 ml etanol, hvorved man erholder 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre med et smeltepunkt på $218-220^{\circ}$ (spaltning).

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive nikotinsyrederivater, nemlig av 6-klor-2-hydroksy-nikotinsyre og salter herav med baser, k a r a k t e r i s e r t v e d at man erstatter kloratomet i 2-stilling i 2,6-diklor-nikotinsyre med en hydroksygruppe, fortrinnsvis ved at man gjennomfører erstatningen at kloratomet ved hjelp av hydrolyse av 2,6-diklor-nikotinsyre med en base, og at man subsidiært overfører det oppnådde produkt i et salt med en base.