



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

207700

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
G 07 D 239/70

- (22) Přihlášeno 19 12 78
(21) (PV 4191-79)
(32) (31)(33) Právo přednosti od 19 12 77
(861732) a od 21 09 78 (944434)
Spojené státy americké
(40) Zveřejněno 15 09 80
(45) Vydáno 15 06 84

- (72) Autor vynálezu MATSUMOTO KEN, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)
(73) Majitel patentu ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby nových 2-aryl-1H-perimidinových sloučenin

1

Vynález se týká způsobu výroby nových 2-aryl-1H-perimidinových sloučenin a jejich farmaceuticky přijatelných solí.

V předchozích publikacích byly popsány 2-substituované-1H-perimidinové sloučeniny a 2-substituované-2,3-dihydro-1H-perimidinové sloučeniny, které se liší od sloučenin podle vynálezu.

Článek v Proc. Am. Assn. Cancer Res. 3, 319 (1962) referuje o kancerostatické aktivitě 2-(3,4-dichlorfenyl)-1H-benzol[de]chinazolinu, stejné sloučeniny, jako je 2-(3,4-dichlorfenyl)-1H-perimidin. Článek výslovně uvádí, že sloučenina je neúčinná při perorálním podání.

Článek v J. Het. Chem. 1, 108 (1964) je následující studie inspirovaná svrchu uvedeným článkem. V této studii byla syntetizována série 2-aryl-2,3-dihydro-1H-perimidinů. V této sérii byly:

- 2-(p-chlorfenyl)-2,3-dihydro-1H-perimidin
2-(3,4-dichlorfenyl)-2,3-dihydro-1H-perimidin
2-(p-bromfenyl)-2,3-dihydro-1H-perimidin.

Práce nic neříká o nějaké užitečnosti těchto sloučenin.

Avšak užitečnost sloučenin svrchu uvedených sérií je popsána v J. Med. Chem. 9 (4), 599 (1966). Tři zkoumané sloučeniny měly malou antineoplastickou aktivitu.

Článek v J. Org. Chem. 36, č. 11, 1 477 (1971) popisuje mezi jiným 2-substituované-1H-perimidiny a jejich p-toluensulfonátové soli včetně 2-fenyl-1H-perimidinu, 2-(p-chlorfenyl)-1H-perimidinu, a 2-(p-metylfenyl)-1H-perimidinu a jejich p-toluensulfonátové soli. Tato citace nic neříká o jejich užitečnosti. Podobně článek v Reakts. Spособnost, Org. Soedin. 6 (1) 47 až 54 (1969) (Eng.) popisuje 2-fenyl-1H-perimidin, 2-(p-tolyl)-1H-perimidin, 2-(p-bromfenyl)-1H-perimidin a 2-(m-bromfenyl)-1H-perimidin, ale neprohlašuje nic o jejich použitelnosti.

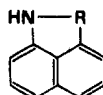
Oba následující odkazy se principiálně vztahují na výrobu 1,2-disubstituovaných perimidinů.

Sovětský patent č. 504 770 referuje o perimidinech, "které mají biologickou aktivitu a mohly by najít použití v medicíně", ale nejsou zde žádné poznámky ani odkazy, které by autentizovaly tento komentář, který se mimoto vztahuje pouze na 1,2-disubstituované sloučeniny.

Khim. Farm. Zhur., 11 (5) 87 až 93 (1977) popisuje účinnost 1,2-disubstituovaných perimidinů a 2-(3,4-dimetoxyfenyl)perimidinu na centrální nervový systém.

Sloučeniny podle vynálezu se odlišují od sloučenin v těchto publikacích tím, že jsou nesubstituovány v poloze 1 a sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu, mají další substituenty na fenylovém kruhu. Mimoto se vynález soustřeďuje na potlačení imunologické reakce u savců, což je odlišné od účinnosti na centrální nervový systém nebo od kancerostatické aktivity.

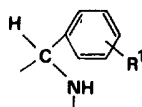
Předmětem vynálezu je způsob výroby nových 2-aryl-1H-perimidinových sloučenin obecného vzorce I



(I)

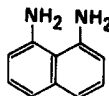
kde

R znamená skupinu obecného vzorce



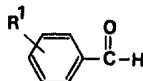
kde

R¹ znamená skupinu -CF₃, -OCF₃, -SCF₃ nebo -OC₂F₅ v poloze meta nebo para a jejich farmaceuticky přijatelných solí, vyznačený tím, že se kondenzuje 1,8-diaminonafthalen vzorce IV



(IV)

s acylovou sloučeninou obecného vzorce V



(V)

kde

R¹ má svrchu uvedený význam.

[H]C(=O)Nc1ccccc1R1R1c1ccc(cc1)N2c3ccccc3c4ccccc24

(III)

R^1 má svrchu uvedený význam.

Sloučeniny vzorce I jsou nejlépe aplikovány jako farmaceutické přípravky. Farmaceutické přípravky jsou dobře známy ve farmaceutické praxi. Při přípravě přípravků se současnými

aktivními sloučeninami vzorce I, je zvolená sloučenina smísená s nosičem, jako je laktóza, dextróza, sacharóza, sorbitol, mannitol, škroby, akáciová pryž, fosforečnan vápenatý, algináty, tragant, želatina, metylcelulóza, škrob, stearan hořečnatý nebo minerální olej. Přípravky mohou být vyrobeny jako tablety, suspenze nebo kapsle. Pro parenterální použití jsou přípravky formulovány jako injekční roztoky.

Preferovaný přípravek je takový, který v jediné dávkové formě upravené pro perorální aplikaci k získání imunosupresivního účinku imunosupresivní, netoxické množství v rozsahu od 10 do 1 000 mg účinné látky a farmaceutický nosič.

Vynález bude osvětlen následujícím příkladem.

P ř í k l a d 1

Výroba 2,3-dihydro-2-(p-trifluormetylfenyl)-1H-perimidinu

Roztok, obsahující 15,8 g (0,10 molu) 1,8-diaminonafthalenu, 17,4 g (0,10 molu) p-trifluormetylbenzaldehydu a 1 litr xylenu se zahřívá k varu pod zpětným chladičem 24 hodiny. Pak se rozpouštědlo odpaří ve vakuu, čímž se získá 37,5 g surového produktu, který se čistí na sloupci silikagelu, který se vymývá toluenem, čímž se ve výtěžku 73 % získá 22,93 g výsledného produktu o teplotě tání 119 až 122 °C. Hmotnostní spektrum m/e 314.

Analýza pro $C_{18}H_{13}N_2F_3$

vypočteno: 68,78 % C, 4,17 % H, 8,91 % N;

nalezeno: 68,69 % C, 4,40 % H, 9,11 % N.

P ř í k l a d 1a

Způsob výroby 2,3-dihydro-2-(p-trifluormetoxymetylefenyl)-1H-perimidinu

8,0 g, tj. 0,0506 molu 1,8-diaminonafthalenu a 9,62 g, tj. 0,0506 molu p-trifluormetoxymetylebenzaldehydu se uvede v reakci způsobem podle příkladu 1, čímž se ve výtěžku 34,4 % získá po překrystalování 5,76 g výsledného produktu o teplotě tání 103 až 105 °C, hmotnostní spektrum m/e 330.

P ř í k l a d 1b

Způsob výroby 2,3-dihydro-2-(p-trifluormetylthiofenyl)-1H-perimidinu

4,68 g, tj. 0,0296 molu 1,8-diaminonafthalenu a 4,98 g, tj. 0,0296 molu p-trifluormetylthiobenzaldehydu se uvede v reakci způsobem podle příkladu 1, čímž se ve výtěžku 53,2 % získá 5,45 g výsledného produktu o teplotě tání 133 až 134 °C, hmotnostní spektrum m/e 346.

Analýza pro $C_{18}H_{13}N_2SF_3$

vypočteno: 62,42 % C, 3,78 % H, 8,09 % N;

nalezeno: 62,15 % C, 4,01 % H, 8,06 % N.

Hemaglutininový test u myši při perorálním podání

Skupiny po 5 švýcarských myších samců o hmotnosti 20 g se od sebe oddělí a podá se jim nitrožilně 5x 10 červených krvinek ovce. Krvinky pro toto podání se připraví z ovčí krve

v Alseverově roztoku, pak se promyjí třikrát 0,85% chloridem sodným a znovu se uvedou v suspenzi v tomtéž roztoku. Perorálně se podá v dávce 0,1 ml po 9 dní zkoumaná látka v roztoku v polyetylenglykolu 400, přičemž účinná látka se počne podávat 3 dny před injekcí červených krvinek. Užije se několika dávek pro každou sloučeninu, přičemž každá další dávka je dvojnásobkem dávky předchozí. Kontrolní skupina myši obdrží pouze injekci červených krvinek a perorálně místo účinné látky pouze rozpouštědlo. 6 dnů po injekcích antigenu se odebere myším krev a séra z každé skupiny 5 myši se smísí. Po inaktivaci komplementu se stanoví v sérech obsah hemaglutininu standardními postupy, přičemž se užije směs ředění v chloridu sodném, který obsahuje zkoumané sérum a 0,5 % suspenze ovčích červených krvinek. Každé následující ředění má poloviční obsah uvedených látek ve srovnání s předchozím ředěním. Zkoušky se provádějí na podložkách z plastické hmoty. Na těchto podložkách se roztoky inkubují 3 hodiny při teplotě 37 °C, načež se stanoví stupeň hemaglutinace. V případě, že dojde k více než čtyřnásobnému (75%) nebo většímu snížení protilátek ve zkoumaném séru ve srovnání s kontrolním sérem, pokládá se výsledek za statisticky významný. Výsledky se vyjadřují jako minimální účinná dávka (MED), což je nejnižší dávka, která způsobí snížení obsahu protilátek na 75 % nebo vyšší.

Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce I: (MED je minimální účinná dávka, snižující tvorbu protilátek alespoň o 75 % při perorálním podání PO.)

T a b u l k a I

Sloučenina	MED		
	mg/kg	x9	PO
2,3-dihydro-2-(p-trifluormetylfenyl)-1H-perimidin		25	
2,3-dihydro-2-(p-trifluormetoxifenyl)-1H-perimidin		6,25	
2,3-dihydro-2-(p-trifluormetylthiofenyl)-1H-perimidin		12,5	

Stanovení v jednotlivých sérech

V průběhu těchto pokusů byl předchozí postup modifikován tak, že bylo v jedné skupině užito vždy 10 myši místo původních 5 myši. Myším byla odebrána krev stejně jako svrchu, avšak obsah protilátek byl stanoven v jednotlivých sérech místo ve směsi sér. Pro každou skupinu 10 myši byla vypočítána střední hodnota hemaglutininu ($\log_2$) $\pm$ S. E. a hodnota p pomocí Studentova testu t . Výsledky byly srovnávány s kontrolní skupinou. Přitom byla hledána dávka účinné látky, která statisticky významně ($p < 0,05$) snižuje titer protilátek. Účinné látky byly podávány perorálně nebo podkožně 10 dní počínaje od 3 dnů před podáním suspenze červených krvinek, a to v roztoku, který sestával z chloridu sodného s obsahem 0,125 % metylcelulózy a 0,2 % neiontového emulgátoru. Stanovení bylo prováděno 7 dní po injekci krvinek.

Reakce hostitele na štěp (GVH)

Při tomto testu byly podány parenterálně myším slezinové buňky (C57BL) myším hybridního kmene F_1 (C57BL x C3H). V tomto případě myši, kterým jsou slezinové buňky podány tyto buňky neodmítají, protože hybridní kmen rozeznává příbuzný antigen C57BL jako svůj vlastní. Takto podané buňky však zvyšují reakci tkání příjemce na antigeny, odvozené od C3H. V důsledku toho se slezina příjemce zvětší. V případě, že se podaří zabránit imunologické odpovědi, nedojde k tomuto zvětšení sleziny. Z tohoto důvodu je možno užít hmotnost sleziny jako míru GVH v důsledku potlačení imunologické reakce.

Při pokusech bylo užito modifikace původního Simonsova postupu (Ann. N. Y. Acad. Sci. 73:834, 1958). Tímto způsobem je možno získat větší množství slezinových buněk při použití homogenizátoru (Waring blandors). Při tomto způsobu získávání slezinových buněk postup probíhá zcela automaticky. Užívá se dvojího homogenizování po 6 sekundách, přičemž se užívá 25 C57BL slezin ve 23 ml roztoku chloridu sodného. Tento postup je dostatečný k uvolnění buněk z pojivové tkáně. Tato tkáň se odstraní filtrací přes několik vrstev mulu. Buněčná suspenze, připravená tímto způsobem se standardizuje v Levy-Hausserově komoře tak, aby obsahovala 6×10^6 buněk s jádrem v 1 ml. Pak se skupinám po 10 myších C57BL x C3H o hmotnosti 16 až 18 g podá tato suspenze intraperitoneálně v celkovém obsahu 1 ml. Podávání účinných látek se provádí perorálně nebo podkožně v objemu 0,2 ml, a to od 3 dnů před injekcí buněk a pak denně 13 dní. Kontrolním zvířatům se podávají pouze buňky a rozpouštědla. Sleziny se odstraní a zvaží 10 dnů po injekci buněk. Výsledky se vyjádří jako hmotnost sleziny/g tělesné hmotnosti.

Uvedené injekce působí malé zvětšení sleziny, je možno hmotnost sleziny užít ke stanovení 100% potlačení reakce GVH. Způsob výpočtu je uveden v následujícím příkladu pro myši, jimž byla podána srovnávací sloučenina, potlačující imunologickou reakci.

Ošetření kontrolní sloučeninou	mg sleziny/g tělesné hmotnosti $\pm$ SEX)	% inhibice ^{xx)}
1-(6-metoxi-2-benzothiazolyl)-3-fenyl- močovina (J. Med. Chem. 12, 1 016 až 1 018 /1969/), 12,5 mg/kg x 13 (perorálně)	6,86 $\pm$ 0,80 ^{xxx)}	74
žádné (GVH kontrola)	11,55 $\pm$ 1,01	0
žádné (syn. kontrola)	5,20 $\pm$ 0,37	100
žádné (normální kontrola)	4,16 $\pm$ 0,17	-

^{x)} Průměr ze skupin 5 myší

^{xx)} $\frac{(\text{GVH kontroly} - \text{ošetřené myši})}{(\text{GVH kontrola} - \text{syn kontrola})} \times 100 = \% \text{ inhibice}$

^{xxx)} $p < 0,01$ ve srovnání s GVH kontrolou

Protože v praxi bylo zjištěno, že syngeneické a normální kontroly se od sebe jen velmi málo liší v různých pokusech, byla pro výpočty užita celková hodnota (4,8), která byla odvozena při opakovaných výpočtech při použití čtyř od sebe odlišných syngeneických kontrolních skupin ($5,20 \pm 0,37$, $4,99 \pm 0,39$, $4,42 \pm 0,13$, $4,66 \pm 0,12$) a byla pokládána za skupinu obsahující 20 myší.

Test na artritidu při použití adjuvans u krys

2-(p-Trifluormetylfenyl)-1H-perimidinhydrochlorid byl zkoumán na svou schopnost otok zadní tlapy a poškození kosti v důsledku otoku, který byl vyvolán podáním adjuvans u krys. Aby bylo možno kvantitativně vyjádřit inhibici otoku, byly definovány dvě fáze zánětu: 1. primární a sekundární zánět v zadní tlapi, do níž byla podána injekce a 2. sekundární zánět zadní tlapy, do níž nebyla podána injekce. Tento zánět se vyvíjí obvykle 9 dní po vyvolání zánětu v tlapi, do níž byla podána injekce. Snížení druhého typu zánětu ukazuje na potlačení imunologické reakce, jak bylo popsáno v publikaci Chang, Arth. Rheum. 20, 1 135 až 1 141 (1971). Fenoprofen v dávce 30 mg/kg byl užít jako standardní protizánětlivá

sloučenina pro srovnávací vyhodnocení. (Nickander a další, Med. Proc. Annual FASEB Mtgs., duben 1971, ABS#205.)

Artritida svrchu uvedeného typu byla vyvolána u kryších samců kmene Lewis-Wistar o hmotnosti 200 až 210 g tak, že samcům byla podána jednotlivé subplantární injekce do pravé zadní tlapy, injekce obsahovala 0,1 ml 0,5% suspenze teplem usmrcených, lyofilizovaných *Mycobacterium tuberculosis* (Calbiochem. Perrigen-C) v minerálním oleji. Postup je modifikací metody, uvedené v publikaci Winter a další, Arth. Rheum. 9: 394 až 397 (1966). Jedné skupině 5 krys (TB kontroly) byla podána pouze tato injekce. Další skupina 5 krys byla ponechána bez jakéhokoli ošetření (normální kontroly). Každá ze zkoumaných látek byla uvedena v 1% suspenzi v karboxymethylcelulóze a podávána sondou skupinám po 5 kryších denně v dávce 30 mg/kg, a to od prvního dne po dobu 17 dnů po podání injekce adjuvans. Objem tlapy byl měřen při použití digitálního voltmetru a přístroje Statham pressure transducer pro přenášení tlakových hodnot. Objemy obou zadních tlapy byly měřeny ve dnech 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 a 18. Rentgenové snímky byly získány v den 18 po usmrcení zvířat. Objemy tlapy, do níž nebyla podána injekce byly měřeny ode dne 9 do dne 18 a jsou zaznamenány v následující tabulce.

T a b u l k a

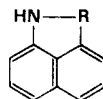
Ošetření	Objem tlapy, do níž nebyla podána injekce ode dne 9 do dne 18				
	den 9	den 11	den 14	den 16	den 18
(normální kontroly)	1,99 ± 0,063	2,13 ± 0,08	2,08 ± 0,053	2,15 ± 0,056	2,01 ± 0,95
TB kontroly	1,94 ± 0,028	2,02 ± 0,037	2,69 ± 0,106	3,26 ± 0,202	3,65 ± 0,227
fenoprofen	1,97 ± 0,023	2,11 ± 0,07	2,38 ± 0,099	2,7 ± 0,107	2,67 ± 0,128 (23% inhibice) ^{x)}

$$^x) \% \text{ inhibice} = 1 - \frac{\text{objem ošetřených zvířat} - \text{objem u normálních kontrol}}{\text{objem u TB kontrol} - \text{objem u normálních kontrol}} \times 100$$

Při zkoumání rentgenových snímků tlapy, do nichž byla nebo nebyla podána injekce ukázalo, že u zvířat, ošetřených 2-(p-trifluormetylfenyl)-1H-perimidinhydrochloridem, nedošlo k žádnému poškození kostí, toto poškození bylo však velmi zřetelné u TB kontrol.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

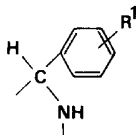
1. Způsob výroby nových 2-aryl-1H-perimidinových sloučenin obecného vzorce I



(I)

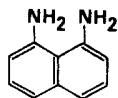
kde

R znamená skupinu obecného vzorce



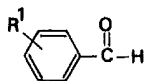
kde

R^1 znamená skupinu $-CF_3$, $-OCF_3$, $-SCF_3$ nebo $-OC_2F_5$ v poloze meta nebo para a jejich farmaceuticky přijatelné soli, vyznačený tím, že se kondenzuje 1,8-diaminonafthalen vzorce IV



(IV)

s acylovou sloučeninou obecného vzorce V



(V)

kde

R^1 má svrchu uvedený význam.

2. Způsob podle bodu 1 k výrobě 2,3-dihydro-2-(p-trifluormetylfenyl)-1H-perimidinu, vyznačený tím, že se uvede v reakci 1,8-diaminonafthalen s p-trifluormetylbenzaldehydem.