(19) HU

MAGYAR NÉPKÖZTÁRSASÁG

ORSZÁGOS TALÁLMÁNYI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11) 194049

A bejelentés napja: (22) 85. 10. 10. (21) (3942/85)

A bejelentés elsőbbsége: (33) US (32) 84. 10. 11
(31) (659 752)

A közzététel napja: (41) (42) 1986.07.28.

Megjelent: (45) 1988. III. 4.

Nemzetközi osztályjelzet: (51) NSZO.
A 61 K 31/54
A 61 K 31/41

Feltaláló(k): (72)

Lamattina John Lawrence Ledyard, Connecticut, US.

Szabadalmas: (73)

Pfizer Inc. N.Y., New York, US.

(54) ELJÁRÁS GYULLADÁSGÁTLÓ KÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57)KIVONAT

A találmány tárgya eljárás javított gyulladásgátló készítmény előállítására, melynek során

a) (I) képletű piroxikámot vagy ennek gyógyászati szempontból alkalmazható sóját és

b) 2-guanidino-4-(4-imidazolil)-tiazolt, 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt, 2-(N-benzil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt, 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt, 2-guanidino-4-[2-(hexilamino)-4-imidazolil]-tiazolt

vagy ezek gyógyászati szempontból alkalmazható sóját kombináljuk egymással, a:b=0,125–1,67 tömegarányban.

A találmány tárgya eljárás javított gyulladásgátló gyógyszerkészítmény előállítására, mely egy nem-szteroid típusú gyulladásgátlót a következő hisztamin-H_2-antagonisták valamelyikével kombinálva tartalmaz: 2-guanidino-4-(4-imidazolil)-tiazol, 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol, 2-(N-benzil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol, 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol és 2-guanidino-4-[2-(hexil-amino)-4-imidazolil]-tiazol. A nem-szteroid típusú gyulladásgátló az (1) képletű piroxikám. (A későbbiekben használt szabad nevek származási helye: az "USAN" és az "USP dictionary of drug name, 1961–1981", szerk. Griffiths és munkatársai, U. S. Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, Md., 1984.)

A nem-szteroid gyulladásgátlók többé-kevésbé általánosan jelentkező mellékhatása a gyomor és bélrendszer ingerlése, ami adott esetben fekély keletkezéséhez vezet. (A nem-szteroid gyulladásgátlók lényegében teljes összefoglalását lásd: Goldenberg, 4.447.443. számú USA-beli szabadalom.) Sok esetben a betegek nem részesülhetnek az ilyen gyulladásgátlót igénylő kezelésben, mert az ilyen ingerre érzékenyek vagy fekélyesedésre hajlamosak. A gyulladásgátlóknak a H_2-antagonistákkal történő, a találmány szerinti együttes alkalmazása lehetővé teszi a kívánt gyulladásgátlóval történő kezelést, minthogy meggátolja vagy enyhíti az említett gyomor-bélrendszeri ingert és a fekélyképződést. A H_2-antagonisták gátolják a gyomorsav-elválasztást vagy emellett még sejtvédő hatásuk is van. Ezen túlmenően, a találmányban szereplő készítmény bizonyos esetekben fokozott gyógyító hatással van a rheumatoid arthritisre.

Ugyanezzel a céllal kombináltak már más hisztamin-H_2-antagonista (gyomornedv elválasztást gátló) vegyületeket, például ranitidint, cimetidint és 1-metil-4-[[3-[3(1-piperidinil-metil)-fenoxil]-propil-amino]]-1H-1,2,4-triazol-3-metanolt indometacinnal, piroxikámmal és más gyulladásgátlókkal. Lásd például: 2.105.193 nagy-britanniai szabadalmi leírás, 2.105.588 számú nagy-britanniai szabadalmi leírás, Lovelace, 4.230.717 számú USA-beli szabadalmi leírás. Újabban az α-fluor-metil-hisztidin hisztidindekarboxiláz-gátlóról (Kollonitsch és munkatársai, 4.325.961 számú USA-beli szabadalmi leírás) leírták, hogy szinergista gyulladásgátló hatást mutat, különösen az indometacinal (Goldenberg, 4.447.443 számú USA-beli szabadalmi leírás). Ennek a készítménynek fekélyt kiváltó hatását nem említik.

A 659.750. számú USA/beli szabadalmi bejelentés – melyet Larson 1984. október 11-én jelentett be a jelen szabadalmi bejelentés kiindulási szabadalmával egyidőben – tárgya a rheumatoid arthritis 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazollal történő kezelése. A piroxikám javított gyulladásgátló hatású sói, beleértve a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazollal képzett sót, a 659.733. számú USA-beli szabadalmi bejelentés tárgyát képezik, amely szabadalmat Lombardino ugyancsak 1984. október 11-én jelentette be.

A találmányban szereplő gyulladásgátlók ismertek. Például a piroxikám előállítását és gyulladásgátlóként való alkalmazásukat a 3.591.584., 3.787.324., 3.822.258., 3.892.740. és a 4.434.164. számú USA-beli szabadalmi leírások tárgyalják.

A találmányban előforduló hisztamin-H_2 antagonisták ugyancsak ismertek (lásd a 4.435.396. és 4.374.843. számú USA-beli szabadalmi leírásokat). Az N-benzil- és N-pentil-guanidino vegyületek előállítási módját, valamint fekélyellenes és/vagy gyomor-antiszekréciós hatóanyagként való alkalmazásukat az alábbiakban részletezzük. Ugyancsak részletesen ismertetjük a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol és bizonyos sóinak javított előállítási eljárását, noha az igénypontokban ez nem szerepel.

Közelebbről, a találmány tárgya eljárás olyan javított gyulladásgátló gyógyszerkészítmény előállítására, mely egyrészt a piroxikám vagy ezek gyógyászati szempontból alkalmazható sóinak gyulladásgátló hatást kiváltó mennyiségét, másrészt az alább felsorolt vegyületek vagy azok gyógyászati szempontból alkalmazható sóinak gyomorirritációt elhárító és fekélyképződést gátló mennyiségét tartalmazza: 2-guanidino-4-(4-imidazolil)-tiazol, 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol, 2-(N-benzil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol, 2-(N-pentil-N'-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol, 2-guanidino-4-[2-(hexil-amino-4-imidazolil]-tiazol.

A piroxikám legelőnyösebb sója az etanol-amin-só.

A találmányban szereplő javított gyulladásgátló gyógyszerkészítmény hatékonyságát megfelelő állatkísérleteken igazoljuk. Az alábbiakban példákon fogjuk szemléltetni, hogy a gyulladásgátlók által kiváltott gyomorfekélyek keletkezését mennyire gátolják vagy csökkentik a találmányban szereplő, a gyomorelválasztást gátló vegyületek.

A találmányban szereplő gyógyszerkészítmény további gyógyászati értéke a rheumatoid arthritis kezelésében nyílvánul meg, amit ugyancsak állatkísérleteken szemléltetünk (lásd az alább ismertetett megfelelő példákat). Ezekben a kísérletekben az adjuváns izületi gyulladás kezelésére használt gyulladásgátló hatása határozottan megnövekszik, ha az antiszekréciós vagy antiszekréciós/citoprotektív vegyületek valamelyikével együtt alkalmazzuk.

A találmány szerinti eljárás könnyen elvégezhető. A gyulladásgátlót és a fekélyellenes szert adagolhatjuk egymástól függetlenül, mindegyiket a már említett, vagy az alábbiakban említésre kerülő irodalmi hivatkozásokból ismert adagolási rend szerint (mennyiség, gyakoriság, bevitel módja, készítmények). A 2-(N-benzil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol és a 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-adagolását az alábbiakban ismertetjük.

E két vegyület fekélyellenes hatása emlősöknél – beleértve az embert is - az antiszekréciós tulajdonságuk révén (hisztamin-H_2-antagonista) és az etanol által kiváltódó fekély keletkezésének gátlásában nyilvánul meg. Ezt a hatást patkányoknál az alábbi példákban szemléltetjük.

Az emlősök gyomorfekélyének gátlására (kialakulásának megelőzésére vagy a kialakult fekély kezelésére) a hatóanyagot a szokásos beviteli úton, szájon át vagy parenterálisan juttathatjuk be. Előnyösen a vegyületet szájon keresztül adjuk be. Ez esetben testsúly-kilogrammonként és naponként 0,1–20 mg-ot, előnyösen 0,2–2,5 mg-ot adunk be egyszeri vagy osztott adagban. Ha parenterális adagolást kell alkalmazni a teljes napi adag testsúly-kilogrammonként 0,1–1,0 mg. A kezelőorvos természetesen a kezelendő személy állapotát mérlegelve változtat a beviendő mennyiségen. A vegyületet alkalmazhatjuk önmagában vagy gyógyászati szempontból alkalmazható vivőanyagok vagy higítók kíséretében. Alkalmazhatjuk egyszeri beadással vagy osztott dózisokban. Az alkal-

mas gyógyászati vivőanyagokhoz tartoznak a közömbös higító- vagy töltelékanyagok, a steril víz és a különféle szerves oldószerek. Az N-benzil-guanidino vegyületből vagy sójából és a gyógyászati szempontból alkalmazható vivőanyagokból álló gyógyszerkészítmény könnyen beadható például tabletta, por, kapszula, pasztilla, szirup stb. alakjában. Ezek a gyógyszerkészítmények kívánt esetben tartalmazhatnak további adalékanyagokat, például ízesítőanyagot, kötőanyagot, tablettázó anyagot stb. A szájon át való adagolásnál a tabletta például különféle vivőanyagokat tartalmaz, mint amilyen a nátrium-citrát, ezen kívül alkalmazhatunk szétesést elősegítő anyagokat, például keményítőt, alginsavat, bizonyos összetett szilikátokat és kötőanyagokat, például polivinil-pirrolidont, szukrózt, zselatint és arabmézgát. A tablettázás szempontjából hasznos, ha a készítmény síkosítóanyagokat is tartalmaz, mint például magnézium-sztearát, nátrium-lauril-szulfát vagy talkumot. Hasonló típusú szilárd készítményt használunk a rugalmas és kemény zselatin kapszulák töltelékeként. előnyös anyagok tehát a laktóz, tejcukor és a nagy molekulasúlyú polietilén-glikolok. Ha az orális adagoláshoz szuszpenziót vagy elixírt használunk, a hatóanyagot különféle édesítő és ízesítő anyagokkal, színező anyagokkal és festékekkel, ha szükséges emulgeáló vagy szuszpendáló anyagokkal keverjük össze, és különféle higító közeget alkalmazunk, ami lehet víz, etanol, propilén-glikol, glicerin vagy ezek elegye. A szájon keresztül adagolt N-benzil-guanidino vegyületet tartalmazó készítményt előnyösen egységnyi dózisok formájában készítjük el, azaz a fizikailag elkülöníthető dózisegységek megfelelő mennyiségű hatóanyagot tartalmaznak a gyógyászati szempontból alkalmazható vivő vagy higítóanyagokban. Az egységnyi dózisú tabletta vagy kapszula például 5–1000 mg hatóanyagot, N-benzil-N'-guanidino- vagy N-pentil-N'-guanidino-vegyületet tartalmaz, azaz a dózisegység teljes súlyának 10–90%-a az aktív hatóanyag. Parenterális bevitelhez steril vizes közeget, például propilén-glikol, nátrium-klorid, dextróz vagy nátrium-hidrogén-karbonát oldatokban készített oldatokat vagy szuszpenziókat használunk. Ha szükséges a készítmények kellőképpen pufferelteK. A parenterális bevitelhez készült steril folyékony készítményeket a szokásos módon készítjük el.

Legelőnyösebb, ha a gyulladásgátlóknak és a hisztamin-H_2-antagonistáknak a találmány szerinti együttes alkalmazását úgy oldjuk meg, hogy az említett hatóanyagokat egyetlen, kombinált készítményben adjuk be.

A készítményt kialakíthatjuk úgy, hogy parenterális vagy – előnyösebben – orális adagolásra alkalmas legyen. A kombinált készítményben az egyes hatóanyagok aránya olyan, mint amilyen a naponkénti dózisok aránya lenne egyedi alkalmazásuk esetén, noha bizonyos esetekben a gyulladásgátló adagját csökkenteni lehet. A kombinált gyógyszerkészítmény beadható egyszeri vagy osztott dózisok formájában, ez utóbbi esetben az adagolás gyakoriságát az osztottabb dózisokban adagolt hatóanyag határozza meg. Így például a "Physicians'desk reference" (37. kiadás, 1983, 1309. old.) szerint egy felnőtt ember napi indometacin adagja orális alkalmazásnál 50–200 mg, amit 2–4 részletbe elosztva adunk be. Noha az indometacinnal együtt alkalmazott fekélyellenes gyógyszer szükséges napi mennyiségét egy adagban is beadhatnánk, ezt a hatóanyagot is az indometacin adagjának napi elosztásához igazítva adjuk be. Ebben az esetben a megfelelő egységnyi dózis 25–50 mg indometacint és 2–500 mg fekélyellenes gyógyszert tartalmaz (azon az alapon, hogy a fekélyellenes gyógyszerből naponként és testsúly-kilogrammonként 0,1–20 mg, előnyösen 0,1–2,5 mg szükségeltetik egyszeri vagy osztott adagolásban. Lásd például a 4.374.843. és 4.435.396. számú USA-beli szabadalmat, fentebb már említettük).

Ezzel szemben a hosszabb hatású piroxikám gyulladásgátlóból felnőtt embernek naponta rendszerint csak egyszer adunk be 20 mg-ot. Ha ezt egy rövidebb hatóidejű fekélyellenes szerrel együtt alkalmazzuk, a napi dózist 2–4-szeri elosztásban adjuk be, és az egységnyi dózis 5–10 mg piroxikámot és 2–500 mg fekélyellenes gyógyszert fog tartalmazni. Ha azonban a piroxikámot egy szintén hosszabb hatóidejű fekélyellenes szerrel, mint amilyen a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol vagy a 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol, kívánunk együtt használni, a napi dózist egyszeri adagban is beadhatjuk. Ez utóbbi hatóanyagok legelőnyösebb napi adagja felnőtt ember esetében 3–100 mg, amit 5–50 mg piroxikámmal kombinálva alkalmazunk, ez a piroxikám adag alacsonyabb, mint amit egyébként a rheumatoid arthritis kezelésére használunk, mert a fekélyellenes hatóanyag fokozza a hatékonyságát. A legelőnyösebb napi adag: 12–80 mg fentebb említett fekélyellenes hatóanyag és 10–20 mg piroxikám.

A kombinált hatóanyagokat használhatjuk önmagukban vagy gyógyászati szempontból alkalmazható vivő- és higítóanyagok kíséretében. Szájon keresztül történő adagolás esetében a gyógyászati szempontból alkalmas vivőanyag lehet egy közömbös higítóanyag vagy töltelékanyag, amivel tablettát, port vagy kapszulát készítünk. Ezek a készítmények tartalmaznak ízesítő-, kötő-, vivőanyagokat stb. A tabletták például különféle vivőanyagokat – például nátrium-citrát-, szétesést elősegítő anyagokat – például keményítő, alginsav és bizonyos összetett szilikátok –, kötőanyagokat – például polivinil-pirrolidon, szukróz, zselatin és arabmézga – tartalmazhatnak. Ezeken kívül tartalmazhatnak síkosítóanyagokat, mint amilyen a magnézium-sztearát, a nátrium-lauril-szulfát és a talkum. A rugalmas és kemény zselatin kapszulák tölteléke hasonló típusú szilárd alkotórészekből áll. Ezek elkészítéséhez előnyös anyag a laktóz vagy tejcukor és a nagy molekulasúlyú polietilén-glikol.

Az elmondottakat az alábbiakban példákon szemléltetjük. A példák kizárólag szemléltető célzatúak, és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

1. példa

A példában azt a vizsgálati eljárást ismertetjük, amellyel a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol és a 2-guanidino-2-(2-hexil-amino-4-imidazolil)-tiazol indometacinnal kiváltott fekély keletkezésének gátlását szemléltetjük.

A vizsgálatokhoz használt CD törzsű hím patkányokat egy héten keresztül szoktatjuk a környezetükhöz. A kezdetben 100–125 g súlyú állatok a második hétre általában 150–200 g testsúlyt érnek el. A patkányokat a vizsgálatot megelőző naptól kezdve éheztetjük, legkésőbb délután 4 órától eltávolítva ketrecükből az élelmet. Az éjszakán keresztüli éhe-

zés során testsúlyuk 15–20 grammal csökken, ezért a vizsgálati oldat kívánt térfogatát a következő napra vonatkoztatva állapítottuk meg. Ivóvíz tetszés szerint áll rendelkezésükre az éjszaka folyamán és a kísérlet ideje alatt is. A kísérleti napon testsúly-kilogrammonként 4,0 ml vizsgálati oldatot adunk be mind orális, mind parenterális adagolási módnál. Ismerve a körülbelüli testsúlyt (ezáltal a beadandó oldat térfogatát) és a gyógyszer alkalmazandó dózisát (mg/kg), a fekélyellenes hatóanyag és az indometacin szükséges mennyiségét előző napon kémcsövekbe kimérjük.

A vizsgálandó fekélyellenes hatóanyagot dihidrokloridsó alakjában oldjuk vagy szuszpendáljuk. Általában desztillált vizet használunk vivőanyagként. Az indometacint sóoldatban szuszpendáljuk, és egy kis csepp Tween 80-nal (poliszorlát 80) homogenizáljuk, hogy megakadályozzuk a részecskék összetapadását. Az indometacin nem marad szuszpendálva a sóoldatban, ezért fontos, hogy mielőtt felszívunk a fecskendőbe, a kémcső alapos vortexolásával újraszuszpendáljuk az anyagot.

Az állatok véletlenszerű kiválasztásával (rendszerint a kísérleti állatok 20%-ának lemérésével) megállapítjuk a csoport átlagos testsúlyát. Minthogy valamennyi dózist a testsúly-kilogrammonként 4 ml térfogatban visszük be, az átlagos testsúly-kilogrammot osztva 250 mg-mal, megkapjuk az egyes állatra vonatkozó térfogatot. Az állatokat kivesszük a közös ketrecből, beadjuk szájon keresztül a vizsgálati anyagot vagy a vivőanyagot, és egyedi ketrecekbe helyezzük.

A fekélyellenes hatóanyag beadási ideje az indometacinos kezeléshez viszonyítva változik az éppen alkalmazott vizsgálati protokolltól függően. Egy 7 csoportos kísérletnél, ahol csoportonként 7 állat van, a hatóanyag adagolási ideje előnyösen 45 perc. Ez lehetővé teszi, hogy az egyes állatnál az orális beadásra körülbelül egy perc jusson. Az indometacin intraperitoneális beadását a gyógyszer adagolásának befejeztével kezdjük, vagyis az említett esetben ekkor visszamegyünk az első állathoz, és megkezdjük az indometacin befecskendezését. Az indometacinos kezelésnél is körülbelül percenként kerül sorra a következő állat.

Ha a vizsgálati anyag várhatóan nem hosszú hatóidejű, kívánatos, hogy a vizsgálat ideje alatt egy második adagolást is végezzünk. Az indometacinos kezelés és az állatok leölése között általában hat és fél óra telik el, ehhez hozzáadva a 45 perces időtartamot, ami a hatóanyag beadásától elmúlt, a vizsgálat teljes ideje hét és egynegyed órának adódik. Ha a gyógyszer másodszori adagolása is szükséges, ezt a félidőnél, tehát körülbelül az első adagolást követően három és fél órával végezzük. A kontroll állatok természetesen ugyanebben az időben kapják a vivőanyagot.

A patkányokat hat és fél órával az indometacin beadását követően öljük le. Eltávolítjuk a gyomraikat, a nagygörbület mentén felnyitjuk és folyó vízzel kimossuk. A vízáram alatt tartva enyhén dörzsöljük a nyálkahártyát, hogy ezzel eltávolítsuk a nyálka egy részét és a nagy vérrögöket, de kerüljük az erőteljes dörzsölést, mert ezzel vért sajtolhatunk ki az indometacin kiváltotta vérző eróziós helyekből, és nehéz lesz meglátni az erodeált helyeket.

A gyomrot egy lapos tálcában, a nyálkahártyával felfelé, sóoldattal megnedvesített papírtörülközőkre fektetjük. Megszámoljuk a kisebesedett helyeket, vagy egy éjszakán át állni hagyjuk a gyomrot, és másnap vizsgáljuk. Ha egy éjszakán keresztül tartjuk a gyomrot, először sóoldattal nedvesítjük, és polietilén zacskókba rakva, hűtőszekrénybe helyezzük.

Az indometacin által kiváltott sebesedés rendszerint sötétbarna vagy fekete színű erózióként jelenik meg a gyomor korpuszán (a savelválasztó részen). A sötét elszíneződést az okozza, hogy az erodeált részeken a gyomorsav reagál a vérrel. A sebesedés pontszerű vagy lineáris. A sebesedés nagyságának mennyiségi kiértékelése arra vall, hogy a seb átlagos hossza 1 mm. A méretétől függetlenül, minden egyedi sebesedést egynek veszünk. Ha az állatok valamelyik csoportjánál a seb formája eltér a kontrollétól, ezt feljegyezzük. Néhány sebnek nincs meg az elkülönítő sötét elszíneződése, de alapos vizsgálattal mégis felismerhető az erózió helye. Egy csoporton belül a sebek száma általában nem nagyon változik. Ha azonban egy csoport valamelyik eredménye gyanúsan magas vagy alacsony, a szélső értéket nem vesszük figyelembe.

Lineáris regressziós analizissel számoljuk ki (a legkisebb négyzetek módszere) az ID_{50} értéket, azaz azt a dózist (mg szabad bázis/kg testsúly), ami ahhoz szükséges, hogy az indometacin indukálta sebesedések száma a kontrollhoz képest 50%-kal csökkenjen. Az I. táblázatban egy ilyen vizsgálat tipikus eredményeit foglaltuk össze.

I. táblázat

	ID_{50} p.o. (mg/kg)			
adagolás vegyület	A	B	C	D
egyszeri dózis	1,4	–	–	7,5
két dózis	1,5	10,5	4,4	2,0

Az A vegyület: 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-dihidroklorid. Minthogy a vegyület vizsgált legkisebb dózisa – 2,2 mg/kg – a sebesedések számát több, mint 50%-kal (63%) csökkentette, az ID_{50} értéket erre a vegyületre extrapolációval állapítottuk meg, feltételezve, hogy a 0,075 mg/kg dózisnak nincs hatása.

A B vegyület: 2-guanidino-4-(2-hexil-amino-4-imidazolil)-tiazolil)-tiazol-dihidroklorid.

A C vegyület: 2-(N-benzil-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-dihidroklorid.

A D vegyület: 2-guanidino-4-(4-imidazolil)-tiazol-dihidroklorid, amit monohidrobromidból készítettünk az 5. és 6. példában ismertetett eljárással.

2. példa

A példában azt az eljárást ismertetjük, mellyel a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolnak a piroxikám által kiváltott gyomorfekély-képződéssel szembeni védőhatását kívánjuk szemléltetni patkányon.

Mi a vizsgálatokhoz 140–160 g súlyú, "specifikusan kórokozóktól mentes" felnőtt hím CD törzsű (Sprague-Dawley) patkányokat használtunk, amiket a Charles River Breeding Laboratoriestől (Kingston, N.Y., USA) szereztünk be.

Az állatokat egy héten át szoktatjuk a környezetükhöz, mely idő alatt a testsúlyúk eléri a 200–225 g-ot. Az állatokat 16 órán keresztül éheztetjük, és

véletlenszerűen 8-10 állatot tartalmazó csoportokba osztjuk, melyek az átlagos testsúlyt illetően kiegyenlítettek. A gyomorfekély keletkezését úgy váltjuk ki az állatoknál, hogy egyszeri dózisban 100 mg/kg piroxikámot adunk be szájon keresztül. A piroxikámot 2 ml 0,1%-metil-cellulózt tartalmazó (pH=6,8) vízben oldva adjuk be. Azoknak az állatoknak, melyek 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt kapnak (0,3, 1,0, 3,3 vagy 10,0 milligrammot kilogrammonként, dihidrokloridsó formájában) a vegyületet 2 ml 0,1% metil-cellulózt tartalmazó vízben oldva adjuk be körülbelül ugyanabban az időben, de külön. Ezt követően hat és fél órával, az állatokat nyaki diszlokációval megöljük, és szemrevételezzük. A gyomrot sebészeti úton eltávolítjuk, a nagygörbület mentén felvágjuk, és hideg vízzel öblítjük. A sebesedések számát használjuk a kiértékeléshez. Minden csoportnál kielemezzük az adatokat miután kiszámoltuk az összes fekélyesedés átlagértékét a ± sztandard hibával.

A kapott értékeket összevetjük a kontroll állatok adataival, mely állatok csak piroxikámot kaptak. Ehhez a nem párosított adatok kétoldali Student-féle t-próbáját használjuk. A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolnak a piroxikám kiváltotta fekélyképződést gátló hatását a II. táblázatban foglaljuk össze. Az adatok bizonyítják, hogy a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol határozottan gátolja a piroxikám által kiváltható fekélyképződést. A táblázat a 0,3–10 mg/kg p.o. adott 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol dózisokkal kapott értékeket tűnteti fel. Ezekből az adatokból lineárisan regressziós analízissel kiszámolva, a korrelációs együttható (r): 0,97 és az ED_{50} érték: 0,32 mg/kg.

II. táblázat

A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol hatása a piroxikám által kiváltott gyomorfekély-képződésre

orális dózis (mg/kg)$^{+++}$	a vizsgált állat száma	állatonkénti fekély száma X ± sztandard hiba^{+}
0,0	156	7,8 (0,4)
0,3	26	4,1 (0,2)$^{++}$
1,0	156	2,6 (0,4)$^{++}$
3,3	86	1,3 (0,3)$^{++}$
10,0	56	0,8 (0,3)$^{++}$

$^{+}$ átlagérték, ± sztandard hiba. Valamennyi állat ulcerogén mennyiségű piroxikámadagot (100 mg/kg, p.o.) kapott.

$^{++}$ Szignifikánsan különbözik ($p \ll 0,05$) a csak piroxikámot kapott állatok értékeitől a nem párosított adatokra vonatkozó Student-féle t-próbával meghatározva.

$^{+++}$ Dihidrokloridsó alakjában.

3. példa

A példában azt az eljárást ismertetjük, mellyel a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolnak a piroxikám etanol-aminsója által kiváltott gyomorfekélyképződéssel szembeni védőhatását kívánjuk szemléltetni patkányokon.

Hasonlóan az előző példákhoz, a gyomorfekélyképződést 100 mg/kg egyszeri dózissal váltjuk ki, ez esetben a piroxikám etanol-aminsóját adva be az állatoknak. A vizsgálati csoportok testsúly-kilogrammonként 0,3, 1,0, illetve 3,3 mg 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt kapnak. A kapott eredményeket a III. táblázatban mutatjuk be. Az eredmények azt mutatják, hogy a 0,3 és 3,3 mg/kg dózis között a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolnak kifejezett védőhatása van a piroxikám etanol-aminsójának gyomorfekélyt kiváltó védőhatásával szemben. Az adatokból lineáris regressziós analízissel számolva, a korrelációs együttható (r): 1,00; az ED_{50} érték: 0,88 mg/kg.

III. táblázat

A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol hatása a piroxikám etanol-aminsója által kiváltott gyomorfekély-képződésre

orális dózis (mg/kg)$^{+++}$	a vizsgált állatok száma	állatonkénti fekély száma X ± sztandard hiba^{+}
0,0	40	6,9 (0,7)
0,3	40	4,2 (0,6)$^{++}$
1,0	40	3,4 (0,5)$^{++}$
3,3	40	2,4 (0,5)$^{++}$

$^{+}$ átlagérték, ± sztandard hiba. Valamennyi állat ulcerogén mennyiségű piroxikám-etanolamin sót kapott (100 mg/kg, p.o.)

$^{++}$ Szignifikánsan különbözik ($p \ll 0,05$) a csak piroxikámot kapott állatok értékeitől a nem párosított adatokra vonatkozó Student-féle t-próbával meghatározva.

$^{+++}$ dihidrokloridsó alakjában.

Az ismertetett vizsgálatot megismételtük olymódon is, hogy testsúly-kilogrammonként 120 mg piroxikám-etanolamin sóval váltottuk ki a fekélyképződést. A nyert eredményeket a 3A. táblázaton mutatjuk be. A lineáris regressziós analizissel kapott ED_{50} érték: 0,3.

3A. táblázat

A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol hatása a piroxikám etanol-aminsója által kiváltott gyomorfekély-képződésre

orális dózis (mg/kg)$^{+++}$	a vizsgált állatok száma	állatonkénti fekély X±sztandard hiba^{+}
0,00	30	9,8 (0,9)
0,33	30	4,7 (0,7)$^{++}$
1,00	30	3,1 (0,6)$^{++}$
3,33	30	1,7 (0,4)$^{++}$

$^{+}$ átlagérték, ± sztandard hiba. Valamennyi állat ulcerogén mennyiségű (120 mg/kg) piroxikám-etanolamin sót kapott.

$^{++}$ Szignifikánsan különbözik ($p \ll 0,05$) a csak piroxikámot kapott állatok értékeitől a nem párosított adatokra vonatkozó Student-féle t-próbával meghatározva.

*** dihidrokloridsó alakjában.

4. példa

A példában ismertetett eljárással azt vizsgáljuk, hogyan befolyásolja a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol a piroxikámnak az adjuváns indukálta izületi gyulladással szembeni hatékonyságát patkány esetében.

Az adjuváns indukálta izületi gyulladást 250–270 g súlyú kifejlett hím Wistar-Lewis patkányokon (Charles River Breeding Laboratories, Kingston, N.Y.) váltjuk ki 0,1 ml ásványi olajban elszuszpendált 1 mg Mycobacterium butiricum (Difco Laboratories, Lot # 0640–33) egyszeri, talp alá adott injektálásával, Waltz és munkatársai által leírt módszer szerint [Proc.Soc. Exptl. Biol. med., 136, 907–910 (1971)]. A beadandó gyógyszereket vízben oldjuk, és annyi híg nátrium-hidroxid oldatot adunk hozzá, hogy oldódásukat biztosítsuk. A kontroll állatok csak vizet kapnak. Miután az oldat kémhatását pH=7,0 értékre állítottuk be, testsúly-kilogrammonként 10 ml-t adunk be az állatokba egy tompa végű, 18-as méretű tűvel. A gyógyszerdózisokat az adjuváns beinjektálását megelőző naptól kezdve adjuk be naponként, és az izületi gyulladás indukálásától számított 16. napig folytatjuk.

Az adjuváns befecskendezésével egyidőben megmérjük a hátsó mancs térfogatát (Vi) és az adjuváns befecskendezését követő negyedik napon megmérjük az injektált mancs megduzzadásának nagyságát (Vf–Vi). Ezt tekintjük az elsődleges válasznak vagy károsodásnak. Az adjuváns befecskendezését követő 16. napon a nem-injektált, ellenkező oldali mancs megduzzadásának mértékét (Vf–Vi) tekintjük másodlagos válasznak vagy károsodásnak. Meghatározzuk az állatok súlyát a kísérlet kezdetekor, valamint az adjuváns befecskendezését követő 4. és 16. napon. Az ödéma kialakulásának százalékos gátlását az alábbi képlettel számoljuk ki:

$$\text{százalékos gátlás (\%)} = 1 - \left[\frac{Vf - Vi}{Vf_{kontroll} - Vi_{kontroll}}\right] \cdot 100$$

A kapott eredményeket a IV. és az V. táblázaton mutatjuk be. Amint az a IV. táblázat lineáris regressziós analizissel kiszámolt adataiból látható, az egymagában alkalmazott piroxikám korrelációs együtthatója (r) és ED_{50} értéke az elsődleges károsodást illetően r=1,00, illetve ED_{50} = 0,45 mg/kg. A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolnak nincs szignifikáns hatása az elsődleges károsodással kapcsolatban, és bár szignifikáns hatása van a másodlagos károsodás kialakulására, ezekből az adatokból nem lehetett megbízható ED_{50} értéket nyerni. Az V. táblázat adatai jelzik, hogy ha növeljük a 2-guanidiono-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol dózisát, a piroxikám egyre hatékonyabb lesz a másodlagos károsodásnál jelentkező duzzanat mértékének csökkentésében. Így az ED_{50} érték, amit a piroxikám egymagában való alkalmazásakor kapunk, 0,45 mg/kg-ról 0,10 mg/kg értékre csökken, ha a piroxikámot 10 mg/kg 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazollal együtt alkalmazzuk. Ez az eltolódás a piroxikám hatékonyságának ötszörös növekedését jelenti. Hasonló, de jelenleg még kevésbé megbízható megfigyeléseket tehetünk az elsődleges károsodással kapcsolatban is.

IV. táblázat

A piroxikám és a 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol ("A" vegyület) hatása az adjuváns indukálta izületi gyulladásra

piroxikám	orális dózis mg/kg "A" vegyület***	százalékos gátlás X±SE+ elsődleges károsodás	másodlagos károsodás
0,10	–	29 (4)++	26 (2)++
0,33	–	33 (8)++	43 (4)++
1,00	–	45 (7)++	64 (3)++
–	1,0	0 (6)	3 (3)
–	3,3	0 (3)	28 (4)++
–	10,0	2 (2)	27 (3)++

+ az ödéma gátlásának átlagértéke, ± sztandard hiba, 21 állatot használtunk az egyes piroxikám dózisoknál (14 állatnál szabad enolt, 7 állatnál etanol-aminsóját), az "A" vegyület két alacsonyabb dózisánál 7 patkányt, a 10 mg/kg-os dózisnál 14 patkányt használtunk.

++ Szignifikánsan különbözik ($p \leq 0,05$) a nem kezelt artritiszes patkányoktól a nem párosított adatok Student-féle t-próbájával meghatározva.

*** dihidrokloridsó formájában alkalmazva.

V. táblázat

A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol ("A" vegyület) hatása a piroxikám etanol-aminsójának az adjuváns indukálta izületi gyulladással szembeni hatékonyságára

piroxikám	orális dózis "A" vegyület	másodlagos károsodás X+(%)	r++	ED_{50}++ mg/kg	r'++
0,10	–	26			
0,33	–	43	1,00	0,45	
1,00	–	64			
0,10	1,0	27			
0,33	1,0	61	1,00	0,24	
1,00	1,0	87			
0,10	3,3	39			
0,33	3,3	64	1,00	0,17	1,00
1,00	3,3	91			
0,10	10,0	51			
0,33	10,0	72	1,00	0,10	
1,00	10,0	93			

+ 1. a IV. táblázatban megfelelő lábjegyzetet.

++ lineáris regressziós analízissel kiszámolt korrelációs együttható (r,r') és ED_{50} érték, a r a piroxikám

dózis és a duzzadás közötti összefüggést mutatja, az r' az "A" vegyület dózisa és a piroxikám terápiával elért duzzadásgátlás közötti összefüggést mutatja.

*** dihidrokloridsóként alkalmazva.

5. példa

A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol szabad bázis előállításához 360,7 g (1,19 mól) 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-monohidrobromidot (4.374.843 USA szabadalom) 7500 ml vízben kevertetünk 15 percen keresztül 19 °C hőmérsékleten. Kevertetés közben a kémhatást pH=5,8 értékről lassan pH=9,5 értékre állítjuk be 10%-os nátrium-hidroxid oldattal, ehhez 500±5 ml-re van szükség. További félórás kevertetés után a kívánt vegyületet zsugorított üvegszűrőn történő kiszűréssel kapjuk meg. A ragadós kiszűrt anyagot 2000 ml vízzel mossuk, nyomkodással tömörítjük, és végül 2000 ml hexánnal mossuk. A szűrőn lévő anyagot levegőn szárítjuk 18 órán át, és még részben nedves formában használjuk fel a következő lépéshez.

Ha a megformázáshoz szükséges, a szabad bázist csökkentett nyomáson súlyállandóságig szárítjuk, majd figyelembe vesszük a visszamaradó vizet.

6. példa

A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-dihidroklorid előállításához az 5. példa szerint előállított részlegesen nedves szabad bázisból indulunk ki, feltételezve, hogy elméletileg 265,3 g vízmentes bázisnak megfelelő szabad bázist tartalmaz. Az említett anyagot 1030 ml kloroform és 4125 ml izopropanol elegyében forraljuk visszafolyató hűtő alatt. A forró oldathoz 62 g aktív szenet adunk. 30 perces refluxálás után az oldatot kovaföldön szűrjük át, amit azután 2750 g forró izopropanollal mosunk. A szűrletet és a mosófolyadékot egyesítjük, és 60 °C hőmérsékleten 2750 ml további izopropanolt adunk hozzá. Vékony sugárban 345 ml tömény sósavat keverünk hozzá. A nyert szuszpenziót csökkentett nyomáson 2750 ml térfogatra pároljuk, ezt a térfogatot megtartva 5500 ml izopropanol fokozatos hozzáadásával elűzzük az oldószerelegyet. A szuszpenziót 0–5 °C hőmérsékletre hűtjük, és ezen a hőmérsékleten kevertetjük 1,5 órán keresztül. A kívánt terméket szűréssel kinyerjük, 700 ml hideg izopropanollal mossuk és csökkentett nyomáson, szobahőmérsékleten szárítjuk.

307,2 g (87%) terméket kapunk.

$UV_{\lambda max}$ (0,01$_n$ HCl/CH_3OH) : 229 és 260 nm

$E^{1\%}_{1\,cm}$ = 661, illetve 569),

λ_{max} (0,01$_n$ NaOH/CH_3OH) 248 és 274 nm ($E^{1\%}_{1\,cm}$: 681, illetve 475).

Neutralizációs ekvivalens (1:1, etanol:víz 0,5 NaOH-val)

számított: 295,2, mért: 299,9.

Elemanalizis a $C_8H_{10}N_6S$. 2HCl képlet alapján:

számított: C: 32,55, H: 4,10, N: 28,47, S: 10,86, Cl^-: 24,02%,

mért: C: 32,30, H: 4,06, N: 29,29, S: 11,05, Cl^-: 24,05%

Előállíthatjuk a dihidrokloridot úgy is, hogy 10,0 g (0,045 mól, a 20% víztartalmat figyelembe véve) szabad bázist 100 ml forró jégecetben oldunk, mely mennyiség éppen elegendő ahhoz, hogy a refluxáló hőmérséklet közelében az anyag oldatban maradjon. A forró oldatot további 10 ml forró ecetsavval higítjuk, és 7,5 ml (0,090 mól) tömény sósavat adunk hozzá. A kívánt terméket, ami a sósav hozzáadása után szinte azonnal elkezd kikristályosodni, szűréssel kinyerjük, miután az oldatot szobahőmérsékletűre hűtjük. 40 °C hőmérsékleten, csökkentett nyomáson szárítva 12,63 g (95%) kívánt terméket kapunk, mely azonos az előzőekben ismertetett, izopropanolból kristályosított anyaggal.

További lehetőség a dihidroklorid-só előállítására, hogy 1,0 g (0,0045 mól) szabad bázist 2 ml tömény sósavban oldunk, a kristályosodás csaknem azonnal megkezdődik. A keveréket 5 ml acetonnal higítjuk, 5 percen keresztül kevertetjük. A kivált anyagot kiszűrve és acetonnal mosva 1,15 g (86,6%) kívánt terméket kapunk, ami azonos az első módszer szerint, fent ismertetett anyaggal.

Elemanalizis a $C_8H_{10}N_6S.2HCl$ alapján:

számított: C: 32,55, H: 4,10, N: 28,47%,

mért: C: 32,16, H: 4,40, N: 28,09%.

7. példa

A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-dihidrobromidot az alábbi három módszer szerint állíthatjuk elő:

A) 4,00 g (0,0322 mól) 2-metil-4-acetil-imidazolt (4.374.843 USA-beli szabadalom) 40 ml 48%-os hidrogén-bromidban (0,351 mól) oldjuk, a hőmérsékletet 33 °C-ra emelve. Az oldatot 50 °C hőmérsékletre melegítjük. 5 ml 48%-os HBr-ban 1,65 ml brómot (5,15 g, 0,0322 mól) adunk hozzá cseppenként 17 perc alatt, 50 °C hőmérsékleten kevertetjük, lehűtjük és krémszínű iszapig pároljuk. Ezt az anyagot kétszer 20 ml vízben oldjuk és ismét sűrű iszapig pároljuk. Az így kapott 2-metil-4-(bróm-acetil)-imidazol köztitermékhez közvetlenül hozzáadunk 29,2 ml etanolt, majd 3,81 g N-amino-tioureát (0,0322 mól) és a keveréket visszafolyató hűtő alatt forraljuk. A kapott oldatot 2 órán keresztül forraljuk visszafolyató hűtő alatt, mely idő közben a kívánt termék kristályos alakban kiválik. A keveréket féltérfogatra pároljuk, szobahőmérsékletűre hűtjük, a terméket szűréssel kinyerjük, kevés etalollal mossuk és 35 °C hőmérsékleten, csökkentett nyomáson szárítjuk. 10,12 g kívánt terméket kapunk (a két kémiai lépés végén ez 79%-os kinyerés). Az anyag vékonyréteg-kromatográfiásan egységes, R_f=0,75 (futtatórendszer: etanol/tömény NH_4OH, 19:1). Op.: 300 °C (bomlik).

Elemanalizis a $C_8H_{10}N_6S.2HBr.0,5\ H_2O$ képlet alapján:

számított: C: 24,44, H: 3,33, N: 21,38%,

mért: C: 24,20, H: 3,18, N: 21,43%.

B) 4,00 (0,0322 mól) 2-metil-4-acetil-imidazolt brómozunk az A) módszernél leírtak szerint, de a 48%-os HBr helyett 3,67 ml (0,0322 mól) 48%-os HBr-ot és 4 ml ecetsavat alkalmazunk, és az 1,65 ml brómot 4 ml ecetsavban adjuk az oldathoz a 48%-os HBr helyett. A másfél órás melegítés végén 3,81 g N-amidino-tioureátot adunk hozzá anélkül, hogy a hűtést, bepárlást, oldószercserét elvégeznénk. A reakció exoterm (67–77 °C) és a nyert oldatot 80 °C-ra melegítjük egy órán keresztül, mialatt megindul a kívánt termék gyors kikristályosodása. A terméket az A) eljárásnál leírtak szerint nyerjük ki, 9,34 g anyaghoz jutva (a két kémiai lépés után 73%-os kinyerés),

mely azonos az A) eljárásnál kapott termékkel.

C) 16,9 ml 48%-os hidrogén-bromidhoz 7,36 g (0.059 mól) 2-metil-4-acetil-imidazolt adunk, átlátszó sárga oldatot nyerve. 3,3 ml 48%-os HBr-ban 3,0 ml (0.059 mól) brómot adunk cseppenként az oldathoz, mialatt a reakcióelegyet 45 °C hőmérsékletre melegítjük. Az adagolás és a melegítés alatt átmeneti kicsapódás figyelhető meg. Miután a reakciókeveréket 18 órán át kevertettük 49 °C hőmérsékleten, 30 °C-ra hűtjük, 22 ml vízmentes etanollal higítjuk és 7,0 g N-amidino-tioureátot adunk hozzá. A keletkezett sűrű szuszpenzió majdnem kitisztul, majd szilárd anyag válik ki, amit spatulával összetörünk. A kapott keveréket 2 órán át kevertetjük 55°C hőmérsékleten, majd 10 °C-ra hűtjük, a terméket kiszűrjük, 2x5 ml vízmentes etanollal mossuk. 20,3 g kívánt terméket kapunk (86%), ami azonos az A) módszernél nyert termékkel.

8. példa

A 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol szabad bázis előállításához 13,4 g 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt 66,9 ml vízben kevertetünk, és a kémhatást pH=10,0 értékre állítjuk be olymódon, hogy a hőmérsékletet 22–24 °C-on tartva, 2 óra alatt 22,6 ml 3n nátrium-hidroxid oldatot adunk a reakciókeverékhez. A terméket szivatással kiszűrjük, a kiszűrt anyagot gumitömbbel összenyomjuk, 28 ml acetonban ismét felvesszük 2 órára, újra kiszűrjük, 12 ml acetonnal mossuk és 40 °C hőmérsékleten csökkentett nyomáson szárítjuk. 8,66 g kívánt terméket nyerünk kristályos formában, ami 15% vizet tartalmaz.

A vízmentes szabad bázist a vizes kiszűrt anyagból készítjük, amit az előzőek szerint állítunk elő anélkül, hogy az acetonos felszuszpendálást elvégeznénk. 4,04 g nedves kiszűrt anyagot (ami 1,60 g szabad bázist tartalmaz) 80 ml refluxálódó acetonban oldunk. Az oldathoz 0,16 g aktív szenet adunk, forrón szűrjük, a szüretet 15 ml-re pároljuk, 1 órán keresztül kevertetjük szobahőmérsékleten, szűrjük, a kiszűrt anyagot acetonnal mossuk, 40 °C hőmérsékleten, csökkentett nyomáson szárítjuk. 1,57 g terméket nyerünk.

9. példa

A 2-(N-benzil-N′-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-dihidroklorid előállításához 13,08 g (46,05 mmól) 2-bróm-1-(2-metil-imidazol-4-il)-etanon-hidrobromidot 150 ml acetonban oldunk és 10,53 g (50,66 mmól) 1-(N-benzil-guanil)-tiourea 50 ml acetonban készült oldatát adjuk hozzá. A reakciókeveréket visszafolyató hűtő alatt forraljuk hat órán át, és szobahőmérsékleten hagyjuk állni 16 órán keresztül, majd további egy órás refluxálás következik, végül a reakciókeveréket lehűtjük és a nyers terméket összegyűjtjük. A termék ekkor dihidrobromidsó alakjában van. Ezt 300 ml vízben oldjuk, és 20,59 g (166 mmól) nátrium-karbonát-monohidrát 200 ml vízben készült oldatát adjuk hozzá. 15 perces állás után a szilárd anyagot kiszűrjük, és vízzel mossuk. A nedves anyagot 400 ml acetonban oldjuk, a nem oldódó részt szűréssel eltávolítjuk, és a szűrlethez 8 ml 37%-os (térf.), tömény sósavat adunk. A megsavanyított reakciókeveréket másfél órán át kevertetjük, szűrjük és a kiszűrt anyagot szárítjuk. A kapott halványsárga szilárd anyagot 50 ml metanolban oldjuk, aktív szénnel kezeljük és kovaföldön átszűrjük. A szűrletet izopropil-éterrel higítjuk, a szilárd csapadékot szűréssel összegyűjtjük, és megszárítva 14,36 g kívánt terméket nyerünk (81%). Op.: 306–307 °C.
m/e: 312.

Elemanalizis a $C_{15}H_{16}N_6S.2HCl$ képlet alapján:
számított: C: 46,75, H: 4,71, N: 21,81, Cl: 18,40%,
mért: C: 46,48, H: 4,82, N: 21,94, Cl: 18,04%.

Hasonló módon állítjuk elő a dihidrobromidsót is, azzal a különbséggel, hogy a sósav helyett 48%-os hidrogén-bromidot használunk.

10. példa

A 4-(2-metil-4-imidazolil)-2-(N-pentil-N′-guanidino)-tiazol-dihidroklorid előállításához 21,12 g (0,112 mól) N-pentil-guanil)-tioureát és 27,65 g (0,097 mól) 4-bróm-acetil-2-metil-imidazol-hidrobromidot forralunk 400 ml acetonban visszafolyató hűtő alatt. A keletkezett szilárd anyagot összegyűjtjük, acetonnal mossuk és szárítjuk, 40,63 g 4-(2-metil-4-imidazolil)-2-(N-pentil-N′-guanidino)-tiazol-dihidrobromidot nyerve halványsárga anyagként.

81,14 g (0,179 mól) dihidrobromidsót 1500 ml vízben oldunk és 88,6 g (0,714 mól) nátrium-karbonát-monohidrát 800 ml vízben készült oldatát adjuk lassan hozzá. Ezt követően a reakciókeveréket 30 percen át kevertetjük, majd szűrjük. A kiszűrt anyagot vízzel alaposan kimossuk és 48 órán keresztül csökkentett nyomáson szárítjuk. Az anyagot 2 liter acetonban oldjuk, a nem oldódó lebegő részeket kiszűrjük, a szűrlethez 34 ml (0,408 mól) tömény sósavat adunk és 1 liter acetonnal higítjuk. A nyert csapadékot összegyűjtjük, mossuk és szárítjuk, 62,44 g kívánt termékhez jutva (93,2%), szennyes fehér szilárd anyag formájában. Op.: 299–301 °C.

Elemanalizis a $C_{13}H_{20}N_6S.2HCl.0,5\ H_2O$ képlet alapján:
számított: C: 47,71, H: 6,19, N: 22,45, Cl^-: 19,41%,
mért: C: 41,75, H: 6,21, N: 22,42, Cl^-: 19,03%.

11. példa

Az előző két példa termékeinek hisztamin-H_2 antagonista aktivitását az alábbi eljárás szerint határozzuk meg:

A tengeri malacokat fejük lecsapásával gyorsan megöljük, a szívüket kivesszük és a jobb artériát kipreparáljuk. Az artériát izometrikusan felfüggesztjük 10 ml, oxigénnel telített (95% O_2; 5% CO_2) Krebs-Henseleit pufferben (pH=7,4), melynek a hőmérsékletét 32°±2°C hőmérsékleten tartjuk. A preparátumot egy órán át így hagyjuk, hogy stabilizálódjon, mialatt a szövet fürdőjét néhányszor kicseréljük. Az artéria összehúzódásait egy erőátviteli berendezésen keresztül kardio-tachométeren és Grass poligráf kiírószerkezeten rögzítjük. Miután felvesszük a hisztamin dózis-válasz görbéjét, az artériák fürdőit néhányszori átöblítéssel kicseréljük friss pufferre, és az artériát újra az alapütemre ekvilibráljuk. Miután visszaállt az alapritmus, a kívánt végkoncentrációnak megfelelő mennyiségű vizsgálandó vegyületet adjuk hozzá a fürdőhöz, és most már az antagonista jelenlétében ismét felvesszük a hisztamin dózis-válasz görbéjét. Az eredményeket a dózis-hányadosban fejezzük ki, mely azonos azon hisztamin koncentrációk hányadosával, mely koncentrációk az anta-

gonista jelenlétében, illetve távollétében mért maximális stimuláció félértékének eléréséhez szükségesek. Ugyancsak meghatározzuk a H_2-receptor antagonista látszólagos disszociális állandóját, a pA_2-t.

Az előző két példa termékének (dihidrobromidsóként) pA_2 értéke legalább 7,2.

12. példa

A 9. és 10. példa termékének fekélyellenes hatását etanol indukálta fekélyképződésen vizsgáljuk patkányoknál az alábbi eljárás szerint:

Hím patkányokat egy éjszakán át éheztetünk. Szájon keresztül testsúly-kilogrammonként 30 vagy 3 mg gyógyszert, illetve vizet adunk be nekik, majd 15 perccel ezt követően 1 ml vízmentes etanolt adunk be az állatoknak ugyancsak szájon át. Egy órával az etanol beadása után az állatokat (csoportonként nyolcat) leöljük, és megvizsgáljuk a gyomrukat a kisebesedések szempontjából. A leölés után felnyitjuk a hasüreget, és egy hemosztatot helyezünk el a gyomorszájnál. Gyomorszondán át 6 ml 4%-os formaldehid oldatot fecskendezünk a gyomorba és egy másik hemosztáttal lezárjuk a nyelőcsövet. A gyomrot eltávolítjuk, a nagygörbület mentén felnyitjuk és megvizsgáljuk a fekélyesedést.

Az etanollal kiváltott fekélyesedés minősítésére az alábbi pontozási rendszert használjuk:

pontszám	meghatározás
1.	normális kinézésű gyomor
2.	tűhegynyi sebesedések
3.	fekélyesedések, 2 vagy kevesebb; tűhegynyi fekélyesedések lehetnek jelen
4.	fekélyesedések, 2-nél több; tűhegynyi fekélyesedések lehetnek jelen
5.	fekélyesedések bevérzéssel

Az egyes csoportok fekélyesedési jelzőszámát az alábbiak szerint számítjuk ki:
Fekélyesedési index= a csoport összpontszáma szorozva a csoportban megfigyelt fekélyek össz-számával szorozva a csoport azon hányadával, melyben bármilyen fekélyesedési esemény történt.

A fekélyesedés gátlási százalékát a következőképpen számoljuk ki:

$$\text{gátlási százalék (\%)} = 100 \times \frac{\text{fekélyesedési index}_{\text{kontroll}} - \text{fekélyesedési index}_{\text{kezelt}}}{\text{fekélyesedési index}_{\text{kontroll}}}$$

A 9. és 10 példa termékéből (dihidrobromidsó) testsúly-kilogrammonként 30 mg-ot szájon át beadva, legalább 77%-os gátlást okoz az etanollal kiváltott fekélyképződés esetében. Testsúly-kilogrammonként 3 mg-os orális adagolás esetén a fekélyesedés gátlása legalább 40%-os.

13. példa

A példában azt vizsgáljuk, milyen védőhatással rendelkezik a 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol a piroxikám etanol-aminsójával kiváltott fekélyképződésével szemben patkányoknál.

Miként a 2. és 3. példákban, a gyomorfekély képződését 120 mg piroxikám-etanol-aminsó egyszeri adagolásával váltjuk ki. A vizsgálati csoportok állatai testsúly-kilogrammonként 0,03; 0,10, illetve 0,33 mg 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-dihidrokloridot kapnak. A kapott eredményeket a VI. táblázatban foglaljuk össze. Az eredmények azt mutatják, hogy a próbavegyület szignifikánsan csökkentette a piroxikám etanol-aminsójának fekélyképző hatását, és a 0,03–0,33 mg/kg tartományban dózisfüggő reakciót kapunk. Az adatokból lineáris regressziós analízissel számolt ED_{50} érték: 0,1 mg/kg.

VI. táblázat

A 2-(N-pentil-N'-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol hatása a piroxikám etanol-aminsójával kiváltott gyomorfekélyképződésre

orális dózis (mg/kg)+++	vizsgált állat száma	gyomorfekély/állat $\bar{X} \pm SE^+$
0,00	30	9,8 (0,9)
0,03	30	6,6 (1,0)
0,10	30	3,4 (1,0)++
0,33	29	2,4 (0,9)++

+ átlagérték ± sztandard hiba (SE); valamennyi állat ulcerogén mennyiségű (100 mg/kg; p.o.) piroxikám-etanol-aminsót kapott.

++ szignifikánsan különböznek ($p<0,05$) azoktól a patkányoktól, amelyek csak piroxikám-etanol-aminsót kaptak, amint azt a nem párosított adatokra vonatkozó Student-féle t-próbával meghatároztuk.

+++ dehidrokloridsó állapotban.

14. példa

20 mg piroxikámot és 20 mg 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt tartalmazó kapszula töltete:

piroxikám (őrölt)	20,0	súlyrész
2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-dihidroklorid (őrölt)	26,6	súlyrész+
kálcium-karbonát	45,0	súlyrész
polietilén-glikol (átlagos molekulasúly 4000)	158,4	súlyrész

+azonos 20 súlyrész szabad bázissal.

A keveréket alaposan összeőröljük, hogy homogén port kapjunk. A rugalmas zselatin kapszulát, mely mindegyik hatóanyagból 20 mg-ot tartalmaz úgy készítjük, hogy 250 mg keveréket mérünk a kapszulába.

A kemény zselatin kapszulák töltéséhez az inert komponenseket olyan állapotra hozzuk, hogy betölthessük őket a szabvány méretű kapszulába. A kapszula az egyes hatóanyagokból 20–20 mg-ot tartalmaz.

15. példa

20 mg piroxikámot és 50 mg 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt tartalmazó kapszula töltete:

9

Piroxikám etanol-aminsója (őrölt)	23,7	súlyrész*
2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol (őrölt)	50,0	súlyrész
kukoricakeményítő	623,3	súlyrész
magnézium-sztearát	3,0	súlyrész

*azonos 20 súlyrész szabad enollal.

A keveréket alaposan megőröljük, homogén port nyerve. 700 mg keveréket töltünk a 0 méretű kemény zselatin kapszulába, így azok a kívánt mennyiségű hatóanyagokat tartalmazzák.

16. példa

25 mg indometacint és 15 mg 2-guanidino-4-metil-4-imidazolil)-tiazolt tartalmazó kapszula töltete:

indometacin (őrölt)	25	súlyrész
2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol (őrölt)	15	súlyrész
kálcium-karbonát	200	súlyrész
polietilén-glikol (átlagos molekulasúly: 4000)	600	súlyrész

A keveréket alaposan megőröljük, hogy homogén port nyerjünk. A megfelelő méretű kapszulába 840 mg keveréket töltünk, így az a kívánt mennyiségű hatóanyagot fogja tartalmazni.

17. példa

10 mg piroxikámot és 50 mg 2-guanidino-4-(2-hexil-amino-4-imidazolil)-tiazolt tartalmazó kapszula töltete:

piroxikám (őrölt)	10,0	súlyrész
2-guanidino-4-(2-hexil-amino-4-imidazolil)-tiazol-dihidroklorid-monohidrát (őrölt)	64,5	súlyrész*
kukoricakeményítő	622,5	súlyrész
magnézium sztearát	3,0	súlyrész

*azonos 50 súlyrész szabad bázissal.

A keveréket alaposan megőröljük, homogén port nyerve, amiből 700 mg-ot mérünk a 0 méretű kemény zselatin kapszulába, ami így a kívánt mennyiségű hatóanyagot fogja tartalmazni.

18. példa

20 mg piroxikámot és 70 mag 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt tartalmazó tabletta kiindulási keveréke:

piroxikám (őrölt)	20	súlyrész
2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol (őrölt)	70	súlyrész
laktóz	188	súlyrész
hidroxi-propil-(metil-cellulóz)	3	súlyrész
nátrium-keményítő-glikolát	15	súlyrész
magnézium-sztearát	4	súlyrész

A keveréket alaposan megőrölve, homogén port nyerünk. 300 mg súlynak megfelelő térfogatú port tablettává sajtolunk, mely a kívánt mennyiségű hatóanyagokat fogja tartalmazni.

19. példa

25 mg indometacint és 25 mg 2-guanidino-4-(2-hexil-amino-4-imidazolil)-tiazolt tartalmazó tabletta kiindulási keveréke:

indometacin (őrölt)	25	súlyrész
2-guanidino-4-(2-hexil-amino-4-imidazolil)-tiazol-dihodroklorid-monohidrát	32,25	súlyrész*
laktóz	217,5	súlyrész
nátrium-keményítő-glükolát	16,0	súlyrész
magnézium-sztearát	5,0	súlyrész

*megfelel 20 súlyrész szabad bázisnak.

A keveréket alaposan megőrölve, homogén port kapunk, melyből 250 mg/ot mérünk a kemény zselatin kapszulába, mely így a kívánt mennyiségű hatóanyagokat fogja tartalmazni.

21. példa

20 mg piroxikámot és 20 mg 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt tartalmazó kapszula töltete:

piroxikám (őrölt)	20	súlyrész
2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil(-tiazol-dihidroklorid (őrölt)	25,0	súlyrész
kukoricakeményítő	602	súlyrész
magnézium-sztearát	3	súlyrész

*megfelel 20 súlyrész szabad bázisnak.

A keveréket alaposan megőrölve, homogén port kapunk, melyből 650 mg-ot mérünk a megfelelő méretű kemény zselatin kapszulába, mely így a kívánt mennyiségű hatóanyagokat fogja tartalmazni.

22. példa

10 mg piroxikámot és 20 mg 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt tartalmazó tabletta kiindulási keveréke

piroxikám	10	súlyrész
2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazol-dihidroklorid	25	súlyrész*
laktóz	193	súlyrész
hidroxi-propil-(metil-cellulóz)	3	súlyrész
nátrium-keményítő-glikolát	15	súlyrész
magnézium-sztearát	4	súlyrész

*megfelel 20 súlyrész szabad bázisnak.

A keveréket alaposan megőrölve, homogén port kapunk. 250 mg súlynak megfelelő térfogatú port tablettává sajtolunk, mely az egyes hatóanyagokból a kívánt mennyiséget fogja tartalmazni.

23. példa

Az N-pentil-N'-ciano-guanidin előállításához 17,43 g (0,20 mól) pentil-amint 175 ml 2-propanolban oldunk és 17 ml (0,204 mól) tömény sósavval megsavanyítjuk. Az oldathoz 23,15 g (0,26 mól) nátrium-dicián-amidot adunk. A reakciókeveréket 20 órán át forraljuk visszafolyató hűtő alatt, majd hagyjuk lehűlni, és celiten átszűrjük. A szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk, a bepárlási maradékot kloroformban oldjuk. Az oldatot vízzel mossuk, és magnézium-szulfáttal szárítjuk. Szűrjük és csökkentett nyomáson bepároljuk, 20,93 g szennyes-fehér anyagot nyerve (67,9%).
Tömegspektrum: M^+ = 154.

24. példa

Az (N-pentil-guanil)-tiourea előállításához 30,0 g (0,195 mól) N-pentil-N'-ciano-guanidint és 3 ml dietil-amint oldunk 550 ml metanolban. Az oldatot –40 °C hőmérsékletűre hűtjük, kénhidrogén-gázzal telítjük és rozsdamentes acél bombába átvíve, 85 °C hőmérsékleten melegítjük 40 órán át. A reakciókeverékből nitrogéngázzal elűzzük a feleslegben maradt kénhidrogént, és az oldatot csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot "flash"-kromatografáljuk (140 mm-es oszlop; kloroformban 5% metanol). A tiszta terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és bepároljuk, 22,01 g fehér szilárd anyagot nyerve (59,9%). Ennek egy részté kloroformból átkristályosítjuk, a nyert anyag op.-ja: 98–100 °C.
Tömegspektrum: M^+ = 188.

25. példa

Az N-benzil-N'-ciano-guanidint a 23. példában leírt eljárás szerint állítjuk elő benzil-aminból kiindulva.
Tömegspektrum: M^+ = 175.

26. példa

6,73 g (38,6 mmól) 1-benzil-3-ciano-guanidin 100 ml metanolban készült oldatához 2 ml dietil-amint adunk, a reakcióelegyet 0 °C hőmérsékletre hűtjük, és kénhidrogéngázzal telítjük. A hideg oldatot rozsdamentes acél bombába visszük, amit lezárva 80 °C hőmérsékleten tartunk 48 órán keresztül. A reakciókeverékből a kénhidrogén felesleget nitrogéngázzal kiűzzük, és csökkentett nyomáson bepárlunk. Az olajos bepárlási maradékot "flash"-kromatografáljuk szilikagélen, eluensként kloroform/metanol 20:1 elegyet használva. 3,06 g terméket nyerünk halványsárga olajként.
Tömegspektrum (m/e): 209 (M^+).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás javított gyulladásgátló készítmény előállítására azzal jellemezve, hogy
a) (I) képletű piroxikámot vagy ennek gyógyászati szempontból alkalmazható sóját és
b) 2-guanidino-4-(4-imidazoll) -tiazolt, 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt, 2-(N-benzil-N'-guanidino)4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt, 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt, 2-guanidino-4-[2-(hexilamino)-4-imidazolil]-tiazolt vagy ezek gyógyászati szempontból alkalmazható sóját kombináljuk egymással, a:b=0,125–1,67 tömegarányban.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (I) képletű piroxikámot és 2-guanidino-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt kombinálunk egymással.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy (I) képletű piroxikámot és 2-guanidino-4-[2-(hexilamino)-4-imidazolil]-tiazolt kombinálunk egymással.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy (I) képletű piroxikámot és 2-(N-benzil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt kombinálunk egymással.

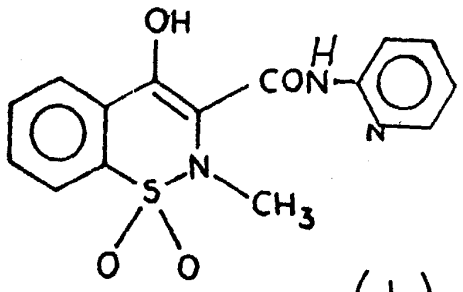
5. Az 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy (I) képletű piroxikámot és 2-(N-pentil-N'-guanidino)-4-(2-metil-4-imidazolil)-tiazolt kombinálunk egymással.

1 db ábra

Országos Találmányi Hivatal
F.k.: Himer Zoltán

KÓDEX

194.049
Nemzetközi osztályjelzet: A 61 K 31/54;
A 61 K 31/41



(I)