

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143701 B

- (21) Ansøgning nr. 1403/77 (51) Int.Cl.³ C 07 D 403/06
(22) Indleveringsdag 30. mar. 1977
(24) Løbedag 30. mar. 1977
(41) Alm. tilgængelig 1. okt. 1977
(44) Fremlagt 28. sep. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 31. mar. 1976, 672123, US 23. feb. 1977, 771118, US

(71) Ansøger ISTITUTO CHEMIOTERAPICO ITALIANO S.P.A., Milano, IT.
(72) Opfinder Aldo Garzia, IT: William Ferrari, IT: Andrea Bot-
tazzi, IT.
(74) Fuldmægtig Internationalt Patent-Bureau.

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af substituerede quinoxaliner.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte substituerede quinoxaliner med den i kravet angivne almene formel I, hvori R betegner et hydrogenatom eller en alkylgruppe med 1 til 5 carbonatomer. De omhandlede quinoxaliner er nyttige til bekæmpelse af kolera.

Kolera er en stærkt smitsom sygdom, der fremkaldes af en vibrio-organisme. Selvom smitten kan spredes ved kontakt mellem personer, er den mest almindelige smittekilde forurenede vandforsyninger, idet forureningsædvanligvis stammer fra spildevand, der indeholder organismen. Kolera bekæmpes almindeligvis ved administrering af egnede medikamenter til den eller de personer, som lider af sygdommen. Der er imidlertid mange fordele ved at behandle

udsatte personer profylaktisk og behandle det forureneede vand for at forhindre eller i høj grad formindske sygdommens forekomst.

Opfindelsen bygger på den erkendelse, at substituerede quinoxaliner (i det følgende betegnet som "C-forbindelser") med den i kravet anførte almene formel I, hvori R betegner et hydrogenatom eller en alkylgruppe med 1-5 carbonatomer, f.eks. en ethyl- eller propylgruppe, er nyttige til bekæmpelse af kolerafremkaldende organismer. De er især nyttige til profylaktisk administrering før udviklingen af symptomerne på kolera.

De omhandlede C-forbindelser indbefatter, men er ikke begrænset til

CO-1: 2-[2-(2-amino-4-pyrimidinyl)ethenyl]-quinoxalin-1,4-dioxid

CO-2: 2-[2-(2-amino-6-methyl-4-pyrimidinyl)ethenyl]-quinoxalin-1,4-dioxid.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man i et molforhold på i det væsentlige 1:1 omsætter quinoxalindi-N-oxid-2-carboxyaldehyd eller en lavere alkyl-acetal heraf og en forbindelse med den i kravet anførte almene formel II, hvori R har den ovennævnte betydning, i nærværelse af en stærk syre som katalysator.

Omsætningen udføres fordelagtigt i et passende opløsningsmiddel, f.eks. en lavere alkansyre, såsom myresyre eller eddikesyre. Omsætningen foretages ved reaktionstemperaturer, der er tilstrækkelige til at få reaktionen til at forløbe, og disse temperaturer kan ligge i området fra omgivelsernes temperatur, f.eks. 0°C, til forhøjede temperaturer f.eks. 80°C eller mere, og ligger f.eks. fortrinsvis fra ca. 25 til 50°C eller mere. Når reaktionen er endt, f.eks. efter ca. 10 til 24 timers forløb, udvindes produktet fordelagtigt ved at krystallisere det af vand.

Til udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen egnede katalysatorer er almindeligt kendt som stærke syrer, og en vilkårlig kendt stærk syre kan anvendes. Egnede stærke syrer indbefatter, men er ikke begrænset til saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovlsyre, salpetersyre, arylsulfonsyrer, f.eks. toluensulfonsyre, eller trichloreddikesyre. Syrerne anvendes almindeligvis i et mængdeforhold på ca. 0,5 til 2 mol syre pr. mol quinoxalin-udgangsforbindelse.

Det som udgangsmateriale til fremstilling af de omhandlede forbindelser anvendte quinoxalindi-N-oxid-2-carboxyaldehyd og dets acetal er kendte forbindelser. Acetalerne kan fremstilles

efter den fremgangsmåde, der er angivet af Haddadin et al., britisk patentskrift nr. 1.305.128, eksempel XIII. Aldehydet er beskrevet i USA-patentskrift nr. 3.371.090.

De som udgangsmaterialer anvendte pyrimidinforbindelser er ligeledes kendte. De fås i handelen, og den sædvanlige kommercielle kvalitet er egnet. De skal fortrinsvis være af god kvalitet, fri for skadeligt materiale.

De omhandlede C-forbindelser er nyttige til bekæmpelse af kolerafremkaldende organismer, f.eks. vibrio-organismer. Forbindelserne har en lav toxicitetsgrad og er egnet til anvendelse ved oral administrering til profylaktisk bekæmpelse af kolera. De er fordelagtige derved, at de ikke blot bekæmper kolerafremkaldende organismer, men selektivt kan bekæmpe de kolerafremkaldende organismer uden i skadelig retning at påvirke den ønskede balance af organismer i et milieu, f.eks. det menneskelige biologiske system.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

Til en reaktionsbeholder sættes 15 ml 99%'s myresyre, 1,15 g 96%'s svovlsyre, 1,09 g (0,01 mol) 2-amino-4-methylpyrimidin og 2,36 g (0,01 mol) quinoxalin-di-N-oxid-2-carboxyaldehyd-dimethyl-acetal. Blandingen opvarmedes til 45 til 50°C og holdtes ved denne temperatur i 10 timer. Den afkøledes derpå og fortyndedes med 35 ml koldt vand, og pH-værdien indstilledes på ca. 5 med natriumhydrogen-carbonat. Der dannedes et gult, krystallinsk bundfald. Det frafiltre-redes og vaskedes med vand. Der opnåedes 1,8 g, 64% udbytte, af 2-[2-(2-amino-4-pyrimidinyl)-ethenyl]-quinoxalin-1,4-dioxid, smp. 237-239°C under sønderdeling.

Produktet, der for nemheds skyld betegnes CO-1, afprøvedes mod fem stammer af vibrio cholerae ved koncentrationer på 10, 30 og 100 mikrogram pr. ml. Resultaterne er anført i tabel 1.

Der udførtes også prøver for at se, om forbindelsen var effektiv mod vibrio cholerae El Tor Ogawa 6 i nærværelse af kloakvand. Kloakvandsprøver opnåedes fra kloaksystemet i byen Modena i Italien. De centrifugeredes til fraskillelse af faste stoffer, og den overliggende væske anvendtes til prøverne. Resultaterne er anført i tabel 2. Ved 10 µg/ml af CO-1 var der ingen vækst af 3 af organismerne efter 48 timers forløb og kun grænsevækst af de øvrige to ved 100 µg/ml.

Forbindelse CO-1 administreres til mennesker, der er udsat for kolera under epidemiske betingelser, i doser på fra 0,3 til 5 g pr. person pr. dag i 3-5 dage. Ingen af de behandlede personer bliver smittet, men talrige personer, med hvem de er i daglig kontakt, bliver derimod smittet. Det fastslås, at CO-1 er effektiv ved oral administrering som et profylaktisk middel til forhindring af kolera. CO-1 er også fordelagtig derved, at den selektivt bekæmper kolera, f.eks. hæmmer væksten af kolerafremkaldende mikroorganismer, uden i skadelig retning at påvirke organismene i det menneskelige biologiske system.

Eksempel 2

Til en reaktionsbeholder sættes en opløsning af 1,15 g 96%'s svovlsyre i 25 ml eddikesyre, 1,23 g (0,01 mol) 2-amino-4,6-dimethylpyrimidin og 1,9 g (0,01 mol) 2-formyl-quinoxalin-di-N-oxid. Blandingen opvarmedes til 40°C i 16 timer, afkøledes derpå, fortyndedes med vand og indstillede på pH 5 med natriumhydrogencarbonatopløsning. Det dannede gule, krystallinske bundfald frafiltreredes og vaskedes til opnåelse af 2,1 g, 71%'s udbytte, af 2-[2-(2-amino-6-methyl-4-pyrimidinyl)-ethenyl]-quinoxalin-1,4-dioxid, der for nemheds skyld betegnes som CO-2. Det smelter ved 240°C under sønderdeling.

Produktet afprøvedes mod de 5 stammer af *Vibrio cholerae* som beskrevet i eksempel 1. Resultaterne er anført i tabel 1. Der var ingen vækst efter 48 timers forløb af tre af organismene ved 10 µg/ml af CO-2 og kun grænsevækst af de øvrige to ved 100 µg/ml.

Forbindelsen CO-2 afprøves for toxicitet på samme måde som beskrevet for CO-1 i eksempel 1. Der opnås tilsvarende resultater, som viser, at forbindelsen er egnet til profylakse.

Forbindelse CO-2 administreres til mennesker, der er udsat for kolera under epidemiske betingelser, i doser på fra 0,3 til 5 g pr. dag i 3-5 dage. Ingen af de behandlede personer bliver smittet, men talrige personer, med hvem de er i daglig kontakt, bliver derimod smittet. Det fastslås, at CO-2 er effektiv ved oral administrering som et profylaktisk middel til forhindring af kolera.

Forbindelser, der indeholder henholdsvis 6-ethyl-, 6-propyl-, 6-butyl- og 6-pentyl-substituenten i stedet for 6-methyl-substituenten kan ligeledes anvendes som profylaktisk middel.

Tabel I
Virkning på forskellige stammer af vibrio cholerae

Forbindelse	Koncentration $\mu\text{g/ml}$	Klassisk Inaba 35	El Tor Ogawa 41	El Tor Ogawa 6	El Tor Ogawa 8	El Tor Inaba 4
CO-1	100	-	-	+	-	+-
	30	-	-	-	-	++
	10	-	-	++	-	++
CO-2	100	-	-	+	-	+-
	30	-	-	-	-	++
	10	-	-	++	-	++

- : Ingen vækst efter 48 timer ved 37°C

+- : Netop iagttagelig vækst

+ : Tydelig vækst, men i ringere grad end ved ubehandlede kontrolforsøg

++ : Samme grad af vækst som ved ubehandlede kontrolforsøg

Tabel 2

Prøve	Koncentration af CO-1	Virkning efter		
		24 timer	48 timer	5 dage
Kontrol + Vibrioner	-	+++	+++	+++
Kloakvand	-	---	---	---
Kloakvand + Vibrioner	-	+++	+++	+++
Kloakvand + Vibrioner	5 γ /ml	---	---	---
Kloakvand + Vibrioner	10 γ /ml	---	---	---
Kloakvand + Vibrioner	20 γ /ml	---	---	---
Kloakvand + Vibrioner	30 γ /ml	---	---	---

+++ : kraftig bakterievækst

--- : ingen bakterievækst

Forbindelsen afprøvedes for akut toxicitet ved forskellige administreringsmåder på fire dyrearter, nemlig mus, rotter, marsvin og kaniner. Forbindelsen viste sig at have en lav toxicitetsgrad. Prøveresultaterne er anført i nedenstående tabeller 3, 4, 5 og 6.

Tabel 3

Akut toxicitet af CO-1 hos hummus

Dosis mg/kg	Døde/behandlede dyr efter			
	1 dag	2 dage	4 dage	7 dage
Endoperitoneal administrering				
2000	6/6			6/6
1000		6/6		6/6
500				6/12
250				0/18
Oesophageal administrering				
0(x)				0/6
4000			1/12	1/12
2000				0/12
1000				0/12

(x) Ved gastrisk sondeindgivning og kun af bæreren.

Tabel 4
Akut toxicitet af CO-1 hos rotter

a. Første forsøg									
Køn	Administreringsvej	mg/kg	Døde/behandlede inden for 21 dage	Legemsvægt i g Start	Legemsvægt i g Afslutning	(m-SE) (*)	Statistisk Signifikans (°)		
M	Oesophageal	4000	0/4	234,5 \pm 13,8	288,7 \pm 13,8		t > 0,05		
M	Oesophageal	0(x)	1/4	233,7 \pm 3,7	331,0 \pm 0,5				
F	Oesophageal	4000	0/4	201,2 \pm 4,2	238,2 \pm 12,1		t > 0,05		
F	Oesophageal	0(x)	1/4	189,2 \pm 3,9	230,0 \pm 10,5				
M	Endoperitoneal	500	1/4	234,0 \pm 6,2	314,3 \pm 10,3		t > 0,05		
M	Endoperitoneal	0(x)	0/4	230,0 \pm 5,7	324,0 \pm 8,7				
F	Endoperitoneal	500	2/4	206,2 \pm 8,7	286,0 \pm 272,0		t > 0,05		
F	Endoperitoneal	0(x)	0/4	207,5 \pm 4,3	253,5 \pm 7,7				
(x) Kun bæreren blev administreret ad samme vej									
(*) m \pm SE=middelværdi \pm standardafvigelse									
(°) Student's t-prøve									
b. Andet forsøg									
Køn	Administreringsvej	mg/kg	Døde/behandlede inden for 7 dage	Legemsvægt i g Start	Legemsvægt i g Afslutning	(m+SE)			
M	Oesophageal	4000	0/4	222,5 \pm 6,2	231,7 \pm 15,7				
F	Oesophageal	4000	0/4	252,0 \pm 16,6	253,5 \pm 12,1				
M	Intraperitoneal	500	2/4	226,2 \pm 6,8	225,0 \pm 21,2				
F	Intraperitoneal	500	0/4	232,5 \pm 5,9	218,2 \pm 7,0				
C. Kumulative data uden hensyn til dyrets køn									
Administreringsvej		mg/kg	Døde/behandlede inden for 7 dage						
Oesophageal		0(x)	0/8						
Oesophageal		4000	0/16						
Intraperitoneal		0(x)	0/8						
Intraperitoneal		500	4/16						
(x) Kun bæreren blev administreret.									

Tabel 5
Akut toxicitet af CO-1 hos marsvin ved
oesophageal administrering

Dosis mg/kg	Døde/behandlede inden for 21 dage
500	0/4
1000	1/4
2000	5/6
4000	6/6
0(x)	

(x) Kun bæreren blev administreret.

Tabel 6
Akut toxicitet af CO-1 hos kaniner ved
oesophageal administrering

Dosis mg/kg	Døde/behandlede inden for 7 dage	Legemsvægt i g (m _± SE)	
		Start	Afslutning
2000	0/2 *	2250-2150	2180-2140
1000	0/4	2037 [±] 104,3	1922,5 [±] 71,5
0(x)	0/4	2135 [±] 75	2262 [±] 215
500	0/2	2000-2100	1650-1550

(x) Kun bæreren blev administreret

* Der var to døde ud af syv behandlede dyr inden for 4 dage.

I betragtning af de gunstige data for akut toxicitet blev forbindelsen administreret oralt i sub-akutte, men forholdsvis store doser til mus og rotter i 15 dage. Der opsamledes data vedrørende virkningerne på dødelighedstallet, vægten, lever og nyrer. Disse data er anført i nedenstående tabeller 7 og 8.

Tabel 7

Subakut toxicitet af CO-1 hos mus

Daglig dosis: 500 mg CO-1 ved gastrisk sondeindgivning i 15 dage.

Oral behandling	Døde/behandlede	% Legemsvægtændring (m±SE)	Vægtforhold mellem frisk organ og legeme Lever	Nyrer
Bærer	0/10	20,4±4,2	5,2±0,2	1,4±0,1
CO-1, 500 mg/kg/dag	0/10	-8,1±3,9	5,9±0,3	1,5±0,1

a. Dødelighed og legemsvægt
Daglig dosis: 1 g/kg/dag i 15 dage

Oral behandling	Døde/behandlede	% Legemsvægtændring
Bærer (H ₂ O)	0/12	24,54±0,64
CO-1 i H ₂ O, 1 g/kg/dag	2/12	18,5± 0,75
Bærer (traganthgummi) (x)	0/12	25,04±1,18
CO-1 i traganthgummi	3/12	16,27±1,31

b. SGOT og SGPT (24 timer efter sidste dosis)

Oral behandling	SGOT	Enheder/ml	SGPT
Bærer:			
Vand	116		4
Traganthgummi	119		6
CO-1 i vand	124		9
CO-1 i traganthgummi	132		10

Tabel 8

Subakut toxicitet af CO-1 hos hunrotter

Daglig dosis: 2 g/kg/dag af CO-1 ved gastrisk sondeindgivning
i 21 dage

Oral behandling	Døde/ behandlede	Legemsvægt i g Start	(m+SE) Afslutning
Bærer	2/6 (x)	200,0 \pm 4,1	233,2 \pm 5,1
CO-1, 2 g/kg/dag	1/6 (x)	204,1 \pm 2,0	210,6 \pm 9,6

(x) Død forårsaget ved en fejltagelse ved oesophagus incannalutation.
Denne diagnose blev bekræftet ved undersøgelsen efter dødens
indtræden.

Daglig dosis: 2 g/kg/dag af CO-1 ved gastrisk sondeindgivning
i 21 dage

Oral behandling	Gennemsnitlig procentisk vægt af friske organer (m+SE)		
	Lunge	Lever	Nyrer
Bærer (3 dyr)	0,85 \pm 0,06	3,45 \pm 0,07	0,95 \pm 0,04
CO-1 (5 dyr)	1,07 \pm 0,09 NS	4,54 \pm 0,10 HS(x)	1,04 \pm 0,03 NS

(x) Død forårsaget ved en fejltagelse ved oesophagus incannalutation.
Denne diagnose blev bekræftet ved undersøgelsen efter dødens
indtræden.

I betragtning af den gunstige subakutte toxicitet undersøgtes
den kroniske toxicitet hos hunmus. Resultaterne er anført i neden-
stående tabel 9.

I betragtning af de gunstige resultater med hensyn til
kronisk toxicitet udførtes der en teratogenetisk undersøgelse med
hanlige og hunlige mus og rotter. Antallet af levendefødte unger
var sammenligneligt med det for kontroldyrene opnåede. Der
observeredes ingen misdannelser i nogen af grupperne. Dataene
er anført i nedenstående tabel 10.

Tabel 9

Kronisk toxicitet hos hummus

Daglig behandling ved gastrisk sondeindgivning i
18 uger (4,5 måneder)

a. Dødelighed og legemsvægt

Oral behandling	Døde/ behandlede	Legemsvægt i g (m±SE)	
		Start	Afslutning
Bærer	3/10	28,2±1	33,0±1,1
CO-1,500 mg/kg/dag	2/10	30,4±0,9	30,0±0,7
CO-1,250 mg/kg/dag	0/10	27,3±0,5	26,7±0,7

b. Urinekskretion. Urinmængde udskilt af 6 dyr på 6 timer

Oral behandling	Urinmængde (ml)
Kontrol	6
CO-1,500 mg/kg/dag	7
CO-1,250 mg/kg/dag	6,5

c. Blodglucose. Middelværdier for 6 dyr. Blodprøver blev taget 24 timer efter sidste dosis

Oral behandling	Blodglucose
Kontrol	1,14
CO-1, 500 mg/kg/dag	1,06
CO-1, 250 mg/kg/dag	1,10

d. SGPT og SGOT. Middelværdier for 6 dyr. Blodprøver blev taget 24 timer efter sidste dosis

Oral behandling	Enheder/ml	
	SGOT	SGPT
Kontrol	125	5
CO-1, 500 mg/kg/dag	159	6
CO-1, 250 mg/kg/dag	118	5

e. Frisk vægt af organer

Oral behandling	Vægtforhold mellem frisk organ og legeme (m±SE, 4 dyr)			
	Nyrer	Hjerte	Lever	Lunger
Kontrol	0,938±0,044	0,481±0,055	4,57±0,15	0,674±0,044
CO-1,500 mg/kg/dag	1,07±0,04	0,47 ±0,02	4,66±0,91	1,011±0,110
CO-1,250 mg/kg/dag	0,87±0,08	0,60±0,08	4,57±0,25	0,731±0,035

Tabel 10

Teratogenetisk undersøgelse

a. Dyreart: Mus. Han- og hunnus anbragt sammen i 10 dage.
 Oral behandling fra 3. dag til 13. dag.

Oral behandling	Drægtige/ behandlede dyr	Antal levende fostre pr. nedkomst (m+SE)	Legemsvægt af fostre i g (m+SE)	Antal fostre med misdannel- ser
CO-1, 250 mg/kg/dag	3/10 (x)	10,3+0,6	1,42+0,05	0
Kontrol	9/10	9,0+0,9	1,46+0,07	0

(x) På basis af stor erfaring antages det, at dette resultat kan skyldes tilfældigheder.
 Undersøgelsen bør gentages for at fastslå, om CO-1 faktisk forhindrer drægtighed.

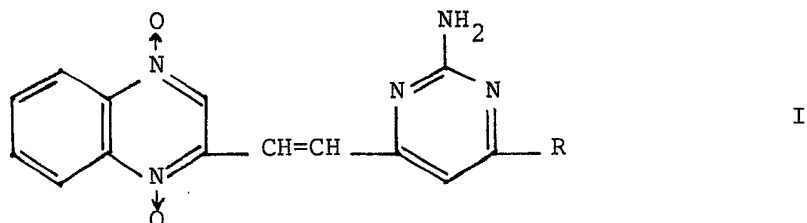
12

b. Dyreart: Rotter. Samme forsøgsbetingelser som med musene.

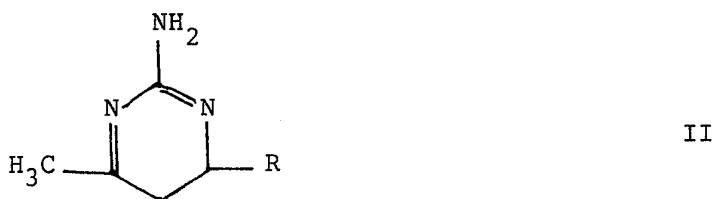
Oral behandling	Drægtige/ behandlede dyr	Antal levende fostre pr. nedkomst (m+SE)	Legemsvægt af fostre i g (m+SE)	Antal fostre med misdannel- ser
CO-1, 250 mg/kg/dag	7/10	10,8+0,86	7,08+0,19	0
Kontrol	6/10	11,3+1,12	6,82+0,40	0

P A T E N T K R A V

Analogifremgangsmåde til fremstilling af substituerede quin-oxaliner med den almene formel



hvor i R betegner et hydrogenatom eller en alkylgruppe med 1-5 carbonatomer, k e n d e t e g n e t ved, at man i et molforhold på i det væsentlige 1:1 omsætter quinoxalin-di-N-oxid-2-carboxy-aldehyd eller en lavere alkyl-acetal heraf og en forbindelse med formelen



hvor i R har den ovennævnte betydning, i nærværelse af en stærk syre som katalysator.

Fremdragne publikationer:
