

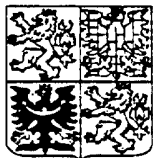
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

281 903

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1081-94**

(22) Přihlášeno: **22. 10. 92**

(30) Právo přednosti:
06. 11. 91 US 91/788565

(40) Zveřejněno: **19. 10. 94**
(Věstník č. 10/94)

(47) Uděleno: **23. 01. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **12. 03. 97**
(Věstník č. 3/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US92/09018**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 93/09119**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 D 471/04

A 61 K 31/44

// (C 07 D 471/04,

C 07 D 235:00, C 07 D 221:00)

(73) Majitel patentu:

Minnesota Mining and Manufacturing
Company, Saint Paul, MN, US;

(72) Původce vynálezu:

Gerster John F., Saint Paul, MN, US;
Weeks Charles E., Saint Paul, MN, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel JUDr. advokát, Národní 32,
Praha 1, 11000;

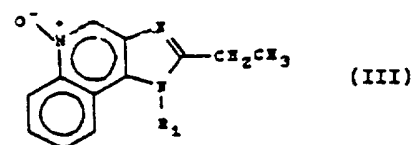
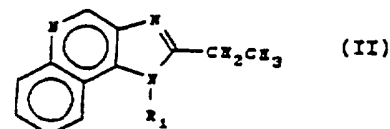
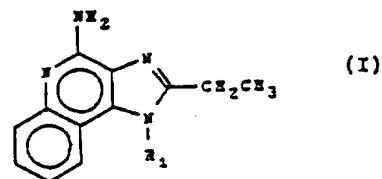
(54) Název vynálezu:

**2-Ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-
-aminy jako takové a pro léčbu,
protivirové farmaceutické přípravky na
jejich bázi a meziproducty pro jejich
výrobu**

(57) Anotace:

Předmětem řešení jsou 2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]-chinolín-4-aminy obecného vzorce I, kde R_1 představuje 2-methylpropylskupinu nebo 2-hydroxy-2-methylpropylskupinu a jejich farmaceuticky vhodné adiční soli s kyselinami. Dále jsou předmětem řešení protivirové farmaceutické přípravky, které obsahují sloučeninu obecného vzorce I v množství účinném pro inhibici a/nebo zabránění postupu virové choroby a farmaceuticky vhodný nosič. Předmětem řešení jsou i 2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinoliny a jejich 5-N-oxidy, jakožto meziproducty pro výrobu sloučenin obecného vzorce I, jejichž struktura odpovídá obecným vzorcům II a III. Sloučeniny obecného vzorce I vykazují protivirovou účinnost.

Vzorce pro anotaci (I, II, III)



2-Ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-aminy jako takové a pro léčbu, protivirové farmaceutické přípravky na jejich bázi a meziprodukty pro jejich výrobu

Oblast techniky

- 5 Vynález se týká 1H-imidazo[4,5-c]chinolinových sloučenin. Zejména se vynález týká 1H-imidazo[4,5-c]-chinolin-4-aminů, meziproduktů pro jejich přípravu, farmaceutických přípravků na bázi těchto sloučenin a farmakologických způsobů jejich použití. Vynález se také týká způsobu indukce biosyntézy faktoru nekrózy nádorů.

10 Dosavadní stav techniky

- První spolehlivá zpráva o 1H-imidazo[4,5-c]-chinolinovém kruhovém systému, Backman et al., J. Org. Chem., 15, 1278 až 1284 (1950), popisuje syntézu 1-(6-methoxy-8-chinolinyl)-2-methyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolinu a jeho možné použití jako antimalarického činidla. Později byly oznámeny syntézy různé substituovaných 1H-imidazo[4,5-c]chinolinů. Tak například Jain et al., 15 J. Med. Chem. 11, str. 87 až 92 (1968), syntetizovali 1-[2-(4-piperidyl)-ethyl]-1H-imidazo[4,5-c]chinolin, jakožto potenciální antikonvulsivní a kardiovaskulární činidlo. Také Baranov et al., Chem. Abs., 85, 94362 (1976), oznámili syntézu několik 2-oxoimidazo[4,5-c]chinolinů a Berenyi et al., J. Heterocyclic Chem. 18, 1537 až 1540 (1981) rovněž oznámili syntézu určitých 2-oxoimidazo[4,5-c]chinolinů.

- 20 Určité protivirově účinné 1H-imidazo[4,5-c]-chinolin-4-aminy jsou popsány v US patentu č. 4 689 338 (Gerster). Tyto sloučeniny jsou substituovány v poloze 1 alkylskupinou, hydroxyalkylskupinou, acyloxyalkylskupinou, benzylskupinou, fenylethylskupinou nebo substituovanou fenylethylskupinou a v poloze 2 vodíkem, alkylskupinou, benzylskupinou nebo substituovanou benzylskupinou, fenylethylskupinou nebo fenylskupinou. Je dále známo, že tyto sloučeniny 25 indukují biosyntézu interferonu. Jiné protivirové 1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-aminy, které jsou substituovány v poloze 1 alkenylovými substituenty, jsou popsány v US patentu č. 4 929 624 (Gerster).

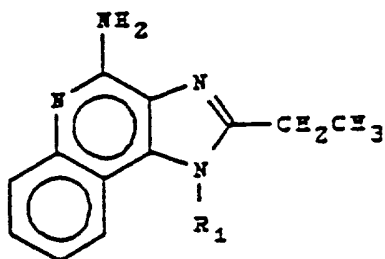
- V US patentu č. 4 698 348 (Gerster) jsou popsány 1H-imidazo[4,5-c]chinoliny, které jsou účinnými bronchodilatanty, jako jsou 4-substituované-1H-imidazo[4,5-c]chinoliny, v nichž je 4-substituentem mj. vodík, chlor, alkylaminoskupina nebo dialkylaminoskupina a 2-substituentem 30 mj. hydroxyalkylskupina, aminoalkylskupina nebo alkanamidoalkylskupina. Tento patent rovněž uvádí 3-amino- a 3-nitrochinolinové meziprodukty substituované v poloze 4 hydroxyalkylaminoskupinou nebo cyklohexylmethylaminoskupinou a 1H-imidazo[4,5-c]chinolin-N-oxidové meziprodukty, substituované v poloze 2 mj. hydroxyalkylskupinou, aminoalkylskupinou nebo 35 alkanamidoalkylskupinou.

Faktor nekrózy nádorů (TNF) je endogenní glykoprotein, který má schopnost selektivně ničit nádorové buňky. Z toho důvodu je na TNF, jakožto terapeutické činidlo vhodné pro léčbu rakoviny, upřen značný zájem.

- 40 Biosyntézu faktoru nekrózy nádorů vyvolávají imunomodulátory, jako je interleukin-2 a katabolické enzymy, jako jsou například látky zveřejněné v Evropské patentové přihlášce publikované pod č. 0 421 023A (Ransberger et al.).

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou 2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-aminy obecného vzorce I

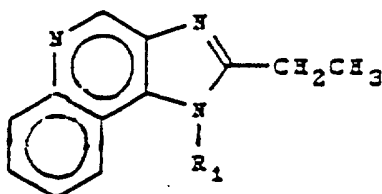


(I)

kde

R₁ představuje 2-methylpropylskupinu nebo 2-hydroxy- 2-methylpropylskupinu.

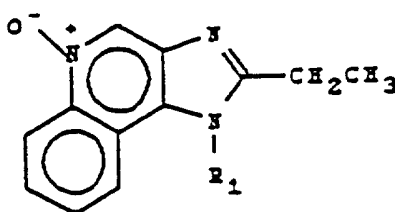
Předmětem vynálezu jsou také meziprodukty pro výrobu výše uvedených sloučenin, obecného vzorce II



(II)

kde R₁ má výše uvedený význam.

Předmětem vynálezu jsou dále také meziprodukty pro výrobu výše uvedených sloučenin, obecného vzorce III



(III)

kde R₁ má výše uvedený význam.

Sloučeniny podle vynálezu je možno vyrábět způsoby, které jsou uvedeny v příkladech provedení.

Sloučeniny obecného vzorce I je možno používat ve formě volné báze nebo ve formě farmaceuticky vhodné adiční soli s kyselinou, jako je hydrochlorid, dihydrogensulfát, trihydrogenfosfát, hydrogennitrát, methansulfonát nebo s jinou farmaceuticky vhodnou kyselinou. Farmaceuticky vhodné adiční soli s kyselinami sloučenin obecného vzorce I je možno připravovat reakcí těchto sloučenin s ekvimolárním množstvím poměrně silné kyseliny, přednostně anorganické kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, kyselina sírová nebo kyselina fosforečná nebo organické kyseliny, jako je kyselina methansulfonová, v polárním rozpouštědle. Izolace soli se usnadní přidávkou rozpouštědla, jako je například diethylether, v němž je sůl nerozpustná.

Sloučenin obecného vzorce I je možno používat pro dosažení žádoucího farmakologického účinku tak, že se podávají pacientovi v podobě vhodných farmaceutických přípravků. Vhodné farmaceutické přípravky obsahují z farmaceutického hlediska přijatelné nosiče a terapeuticky účinné množství sloučeniny obecného vzorce I. Množství nebo koncentrace sloučeniny obecného vzorce I, které představuje terapeuticky účinné množství, bude přirozeně záviset na konkrétně požadovaném farmakologickém účinku, způsobu podávání a konkrétním přípravku, kterého se používá. Vhodné terapeuticky účinné množství může určit odborník v tomto oboru.

Farmaceutické přípravky podle vynálezu zahrnují přípravky přizpůsobené pro orální, parenterální (subkutánní, intramuskulární, intraperitoneální a intravenosní), bukalní, rektální nebo transdermální podávání nebo pro inhalační podávání.

Farmaceutické přípravky pro orální podávání mohou mít podobu tablet, kapslí, suspenzí, roztoků nebo emulzí. Tablety mohou obsahovat farmaceuticky vhodné excipienty, jako jsou ředidla, pojiva, lubrikanty, disintegrační činidla, ochucovadla, barviva apod. Kapalně přípravky je možno vyrábět obvyklými způsoby za použití farmaceuticky vhodných excipientů, jako jsou suspenzní činidla, emulgátory, vehikula, konzervační činidla, barvicí přísady, sladidla apod. Přípravky pro orální podávání mohou být zpracovány na takovou formu, že se s nimi dosahuje regulování uvolňování účinné sloučeniny. Přitom se používá vhodných, z farmaceutického hlediska přijatelných polymerů.

Farmaceutické přípravky pro parenterální podávání mohou mít podobu roztoků, suspenzí nebo emulzí ve vodných nebo olejových vehikulech a mohou obsahovat farmaceuticky vhodné excipienty, jako jsou pufrý, látky upravující tonicitu, suspenzní činidla, emulgátory apod.

Farmaceutické přípravky pro bukalní podávání mohou mít podobu tablet nebo pastilek. Alternativně je možno účinnou sloučeninu zapracovat do transmukosálního dávkovacího prostředku. Transmukosální dávkovací prostředek může obsahovat podkladovou vrstvu a matici obsahující účinnou přísadu, bukalní lepidlo a popřípadě látku zvyšující penetraci.

Farmaceutické přípravky pro rektální podávání mohou mít podobu čípků, které se vyrábějí smísením účinné sloučeniny s obvyklými základovými hmotami pro čípky.

Farmaceutické přípravky pro transdermální podávání mohou mít podobu krémů nebo lotionů obsahujících farmaceuticky vhodné excipienty, jako jsou masťové základy, oleje, konzervační činidla, emulgátory, látky zvyšující penetraci, apod. Alternativně lze účinnou sloučeninu zapracovat do transdermálního dávkovacího prostředku. Transdermální dávkovací prostředek může mít podobu obvazu zahrnujícího podkladovou vrstvu, zásobník účinné sloučeniny, popřípadě s jinými excipienty, případnou membránu pro regulaci rychlosti uvolňování účinné sloučeniny a prostředek pro upevnění dávkovacího prostředku na kůži. Alternativně může transdermální dávkovací prostředek zahrnovat podkladovou vrstvu s adhesivní maticí obsahující účinnou sloučeninu a popřípadě jeden nebo více excipientů.

Farmaceutické přípravky pro inhalační podávání mohou mít podobu roztoků, suspenzí nebo prášků, které je možno pacientovi dodávat prostřednictvím tlakového aerosolového zásobníku nebo rozprašovače.

Sloučeniny obecného vzorce I vykazují protivirovou účinnost u savců. Proto jich lze používat pro potlačování virových infekcí. Tak například, sloučeniny obecného vzorce I je možno používat jako činidla pro potlačování infekcí, které jsou u savců vyvolány virem Herpes simplex typu II. Sloučeniny obecného vzorce I mohou také sloužit pro léčbu herpetických infekcí za použití orálního, topického nebo intraperitoneálního podávání.

Sloučeniny obecného vzorce I byly podrobeny zkoušení a zjistilo se, že indukují biosyntézu interferonu v humánních buňkách. Použité zkušební metody a dosažené výsledky jsou uvedeny dále. Tyto výsledky ukazují, že by sloučeniny podle vynálezu mohly být užitečné i při léčbě jiných chorob, jako je rheumatoidní artritida, bradavice, ekzémy, Hepatitis B., psoriasis,

sclerosis multiplex, esenciální thrombocythaemie, rakovina, jako je bazaliom nebo jiné neoplastické choroby.

Zkušebními metodami, které jsou uvedeny dále, bylo potvrzeno, že sloučeniny obecného vzorce I indukují biosyntézu faktoru nekrózy nádorů (TNF) v humánních buňkách. Kromě toho, sloučeniny obecného vzorce I indukují tuto biosyntézu TNF při podávání v nižších dávkách než strukturně příbuzné sloučeniny známé z dosavadního stavu techniky. Sloučeniny obecného vzorce I jsou tedy potenciálně užitečné jako terapeutická činidla pro léčbu rakoviny, která lze například podávat lokálně (například topicky, rektálně nebo vaginálně) nebo ve formě aerosolů.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech, v nichž jsou uvedeny použité látky, jejich množství, stejně tak jako podmínky a další podrobnosti. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

15 Příklad 1

2-Ethyl-1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]chinolin

16,55 g (0,077 mol) N⁴-(2-methylpropyl)-3,4-chinolindiaminu (viz US patent č. 4 689 338, příklad 16) se suspenduje v 100 ml kyseliny propionové a směs se asi 20 hodin zahřívá na 120 °C. Potom se reakční směs ochladí na teplotu místnosti, nalije do 300 ml vody, směs se zalizuje koncentrovaným hydroxidem amonným, ochladí v ledové lázni a extrahuje diethyletherem. Objem etherového extraktu se zredukuje za sníženého tlaku. Výsledná sraženina se oddělí, promyje etherem a vysuší. Získá se 11 g krystalické pevné látky o teplotě tání 72 až 73,5 °C.

Analýza pro C₁₆H₁₉N₃

25 vypočteno: C 75,8, H 7,6, N 16,6

nalezeno: C 75,6, H 7,7, N 16,5 %.

Příklad 2

2-Ethyl-1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-5-N-oxid

30 9,92 ml peroxooctové kyseliny se přidá k roztoku 10,65 g (0,042 mol) 2-ethyl-1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]chinolinu v 100 ml ethylacetátu. Směs se asi 2 hodiny vaří pod zpětným chladičem a potom se ochladí na teplotu místnosti. Sraženina se oddělí, promyje ethylacetátem a vysuší. Získají se 4 g žluté pevné látky o teplotě tání 177 až 180 °C. Této látky se použije bez čištění v dalším stupni.

35

Příklad 3

2-Ethyl-1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo-[4,5-c]chinolin-4-amin

3,7 g (0,014 mol) 2-ethyl-1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo-[4,5-c]chinolin-5-N-oxidu se suspenduje v 35 ml methylenchloridu, suspenze se ochladí v ledové lázni a potom se k ní přidá 45 ml vychlazeného hydroxidu amonného. Vzniklá dvoufázová směs se intenzivně míchá za chlazení ledem a zároveň se k ní pomalu přidává roztok 2,87 g (0,015 mol) tosylchloridu ve 30 ml methylenchloridu. Potom se nechá reakční směs za míchání pomalu ohřát na teplotu místnosti. Methylenchlorid se odpaří a tak se získá oranžová pevná látka, která se oddělí, promyje vodou a usuší na vzduchu. Tato pevná látka se překrystaluje z methylenchloridu

obsahujícího stopové množství methanolu. Získá se 2,7 g bílé pevné látky o teplotě tání 233 až 234 °C.

Analýza pro $C_{16}H_{20}N_4$ vypočteno: C 71,6, H 7,5, N 20,9

nalezeno: C 71,3, H 7,3, N 20,6 %.

5

Příklad 4

α,α -Dimethyl-2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-1-ethanol

Směs obsahující 15,4 g (0,067 mol) 1-[(3-amino-4-chinolinyl)amino]-2-methyl-2-propanolu (viz US patent č. 4 689 338, příklad 189) a 14,5 ml (0,07 mol) triethylorthopropionátu se po dobu asi 10 2 hodiny zahřívá na asi 165 °C. Vzniklá pevná látka se suspenduje ve směsi ethylacetátu a etheru, oddělí a vysuší. Tak se získá 15,2 g pevné látky. Této látky se použije v dalším stupni bez předběžného čištění.

Příklad 5

15 2-Ethyl-1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]-chinolin-5-N-oxid

Způsobem, který je obecně popsán v příkladu 2, se 15,2 g α,α -dimethyl-2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-1-ethanolu oxiduje, za vzniku 15,2 g surového N-oxidu. Vzorek získané látky se rozpustí ve vodě a potom vysráží přidávkem hydroxidu sodného. Sraženina se oddělí a vysuší. Získaná pevná látka má teplotu tání 245 až 250 °C.

20 Analýza pro $C_{16}H_{19}N_3O_2 \cdot 0,5H_2O$ vypočteno: C 65,3, H 6,8, N 14,3

nalezeno: C 65,2, H 6,4, N 14,0 %.

Příklad 6

4-Amino- α,α -dimethyl-2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-1-ethanol

25 Způsobem, který je obecně popsán v příkladu 3, se 14,3 g (0,05 mol) 2-ethyl-1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]-chinolin-5-N-oxidu aminuje, za vzniku 8,2 g surového produktu. Tato látka se překrystaluje z 60 ml ethanolu a tak se získá 6,4 g pevné látky o teplotě tání 222 až 225 °C.

Analýza pro $C_{16}H_{20}N_4O$ vypočteno: C 67,6, H 7,1, N 19,7

30 nalezeno: C 67,6, H 7,1, N 19,7 %.

Srovnávací příklad C1

4-Amino- α,α ,2-trimethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-1-ethanol

Směs obsahující 1,5 g (0,0056 mol) 1-[(3-amino-2-chlor-4-chinolinyl)amino]-2-methyl-2-propanolu (viz US patent č. 4 988 815, příklad 13), 1,4 g (0,0085 mol) triethylorthoacetátu a 4 ml xylenové směsi se 6 hodin zahřívá na 135 až 140 °C. Roztok se odpaří a tak se získá 35 béžový olej obsahující 4-chlor- α,α ,2-trimethyl-1H-imidazo[4,5-c]-chinolin-1-ethanol, kterého se bez dalšího čištění použije na následující reakci.

K této surové látce se přidá 15 ml 15% methanolického amoniaku a směs se v ocelovém autoklávu (typu bomby) zahřívá 7 hodin na asi 150 °C. Reakční směs se z části odpaří a potom 40

zředí malým množstvím vody. Výsledná sraženina se oddělí, postupně promyje methanolem, vodou a potom znovu methanolem a vysuší. Získá se 900 mg surového produktu. Tento surový produkt se překrystaluje ze směsi methanolu a methylenchloridu a tak se získá 500 mg bezbarvých krystalů o teplotě tání 290 až 293 °C.

- 5 Analýza pro $C_{15}H_{18}N_4O$ vypočteno: C 66,6, H 6,7, N 20,7
nalezeno: C 66,6, H 6,7, N 20,6 %.

Srovnávací příklad C2

2-Methyl-1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-amin

- 10 Tato sloučenina se připraví známými způsoby, viz například US patent č. 4 689 338, příklad 113.

Srovnávací příklad C3

1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-amin

- 15 Tato sloučenina se připraví známými způsoby, viz například US patent č. 4 689 338, příklad 99 nebo US patent č. 4 988 815, příklad 10.

Srovnávací příklad C4

4-Amino- α,α -dimethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-1-ethanol

- 20 Tato sloučenina se připraví známými způsoby, viz například US patent č. 4 689 338, příklad 189.

2-Ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-aminy podle tohoto vynálezu a srovnávací sloučeniny byly zkoušeny dále uvedenými metodami.

- 25 Indukce tvorby faktoru nekrózy nádorů (α) v humánních buňkách

Tato zkušební metoda představuje stanovení indukce faktoru nekrózy nádorů (α) v humánních mononukleárních buňkách, přítomných v kultuře. Měření aktivity je založeno na stanovení humánního faktoru nekrózy nádorů (α), který je vyloučen do kultivačního media. Stanovení humánního faktoru nekrózy nádorů (α) se provádí radioimunoesejem.

30

Krvinkový přípravek pro kultivaci

Venipunkturou se odebere vzorek úplné krve do EDTA upravených trubek "(K₃) vacutainer". Periferní krevní mononukleární buňky (PBM) se získají v separačních trubkách LeucoPREP^(R) Brand Cell Separation Tubes (výrobek firmy Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA) a kultivují se v médiu RPMI 1640 (výrobek firmy GIBCO, Grand Island, NY, USA), doplněném 25mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina) a L-glutaminem s přísadou 1% penicilin-streptomycinového roztoku a 10 % autologního séra (inaktivovaného teplem 30 minut při 56. Do 96°C) jamek s plochým dnem desek pro tkáňové kultury MicroTest^(R) III

- 40 (výrobek firmy Falcon Plastics, Oxnard, CA, USA) se přidá vždy 200 μ l PBM v médiu.

Výroba přípravků na bázi sloučenin podle vynálezu

Zkoušené sloučeniny se rozpustí ve vodě, ethanolu nebo dimethylsulfoxidu a vzniklé roztoky se zředí destilovanou vodou, 0,01N roztokem hydroxidu sodného nebo 0,01N roztokem kyseliny chlorovodíkové (volba rozpouštědla závisí na chemických vlastnostech zkoušené sloučeniny).

- 5 Konečná koncentrace ethanolu nebo dimethylsulfoxidu, pokud se ho používá, přednostně nepřekračuje 1 %. Sloučeniny se nejprve zkoušejí v koncentračním rozmezí od asi 0,5 do asi 5 µg/ml. Sloučeniny, které vykazují indukci při koncentraci 0,5 µg/ml se potom znovu zkoušejí v koncentračním rozmezí 0,01 až 0,5 µg/ml.

10 Inkubace

- Roztok zkoušené sloučeniny se přidá k předem určenému objemu (objem je nižší nebo rovný 50 µl), umístěnému v jamkách obsahujících 200 µl PBM v médiu. Do kontrolních jamek (tj. jamek, které neobsahují žádnou zkoušenou sloučeninu) se přidá rozpouštědlo a/nebo médium. Tyto látky se také přidávají podle potřeby do zkušebních jamek, za účelem nastavení koncového
15 objemu v každé jamce na 250 µl. Desky se zakryjí plastovými víčky a obsah jednotlivých jamek se promíchá jemným vířením. Inkubace probíhá 18 hodin při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého.

Separace

- 20 Po inkubaci se desky zakryjí fólií PARAFILM^(R) a odstředí se 15 minut při frekvenci otáčení 1000 min⁻¹ a 4 °C v odstředivce Damon IEC Model CRU-5000. Ze 4 až 8 jamek se odstraní médium (asi 175 µl), spojí se a umístí ve 2ml sterilních lahvičkách pro zmrazování. Vzorky se uchovávají až do provádění analýzy při - 70 °C.

25 Analýza faktoru nekrózy nádorů (α) a početní zpracování výsledků

- Faktor nekrózy nádorů (α) se stanovuje za použití enzymového imunoeseje za použití soupravy dodávané firmou Biosource International, California, USA. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách pg/ml na základě standardní křivky, sestavené pro každé stanovení. Liposacharid, známá látka indukující faktor nekrózy nádorů (α), je zahrnuta v každém stanovení a používá se
30 ho pro srovnání odpovědi u každé kultury a při každém stanovení. Liposacharid se zkouší při této metodě při koncentraci v rozmezí od 0,01 do 5 µg/ml a obvykle poskytuje odpověď 1000 až 3000 pg/ml.

Výsledky

- 35 Sloučeniny podle vynálezu a srovnávací sloučeniny se zkoušejí paralelně ve dvou separátních stanoveních. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1 a 2. Krev použitá ke zkoušení sumarizovanému v tabulce 1 pochází od jiného dárce než krev použitá ke zkoušení sumarizovanému v tabulce 2.

Tabulka 1

Indukce tvorby faktoru nekrózy nádorů (α) v humánních buňkách

TNF(α)[pg/ml]				
Sloučenina z příkladu	Koncentrace dávky (μg/ml)			Rozpuštědlo
	0,5	1,0	5,0	
3	1109	1519	1274	DMSO
6	950	1938	3740	DMSO
C1	438	653	2186	DMSO
C2	617	849	1203	DMSO
C3	235	302	380	voda
C4	671	295	607	voda
LPS	2580	2681	2648	voda
kontrolní	90			

5

Tabulka 2

Indukce tvorby faktoru nekrózy nádorů (α) v humánních buňkách

TNF(α)[pg/ml]					
Sloučenina z příkladu	Koncentrace dávky (μ g/ml)				Rozpuštědlo
	0, 01	0, 05	0, 1	0, 5	
3	19	126	408	1742	DMSO
6	26	94	262	1554	DMSO
C1	17	48	43	613	DMSO
C2	35	44	46	1076	DMSO
C3	15	51	39	53	voda
C4	25	32	37	39	voda
LPS	1620	1840	1812	1799	voda
kontrolní	42				

10

Výsledky uvedené v tabulkách 1 a 2 ukazují, že sloučeniny z příkladů 3 a 6 indukují biosyntézu TNF v humánních buňkách při podání v nižší dávkové koncentraci než strukturně podobné sloučeniny známé z dosavadního stavu techniky.

Indukce biosyntézy interferonu (α) v humánních buňkách

Pro stanovení indukce tvorby interferonu (α) sloučeninami podle tohoto vynálezu se používá in vitro systému humánních krvinek. Účinnost sloučenin se měří na základě měření množství interferonu vyloučeného do kultivačního média. Množství interferonu se určuje biologickým stanovením (bioesej).

Krvinkový přípravek pro kultivaci

Úplná krev se odebere venipunkturou do zkumavek EDTA vacutainer. Periferní krevní mononukleární buňky (PBM) se získají pomocí separačních trubic pro buňky LeucoPREP^(R) Brand Cell Separation Tubes (od firmy Becton Dickinson) a kultivují se v médiu RPMI 1640 (od firmy GIBCO, Grand Island, NY, USA) s obsahem 25mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina] a L-glutaminu (přidává se 1% penicilin-streptomycinový roztok), k němuž se přidá 10 % autologního séra (tepelně inaktivovaného 30 minut při 56 °C). Do 96 jamek s plochým dnem kultivačních desek pro kultivaci tkání MicroTest^(R)III se přidá vždy 200 μ l dávka PBM v médiu.

Výroba přípravků na bázi sloučenin podle vynálezu

Sloučeniny se rozpustí ve vodě, ethanolu nebo dimethylsulfoxidu a potom se zředí destilovanou vodou, 0,01N hydroxidem sodným nebo 0,01N kyselinou chloro- vodíkovou. (Volba rozpouštědla bude záviset na chemických vlastnostech zkoušené sloučeniny. Sloučeniny se nejprve zkoušejí v koncentračním rozmezí od asi 0,1 do asi 5 μ g/ml. Sloučeniny, které vykazují indukci při koncentraci 0,5 μ g/ml se potom znovu zkoušejí v koncentračním rozmezí 0,01 až 0,5 μ g/ml.

Inkubace

Roztok zkoušené sloučeniny se přidá (v objemu nižším nebo rovném 50 μ l) do jamek obsahujících 200 μ l PBM v médiu. Do kontrolních jamek (tj. do jamek, do kterých se nepřidává zkoušená sloučenina) se přidá rozpouštědlo a/nebo médium podle potřeby, aby se výsledný objem v každé jamce upravil na 250 μ l. Desky se zakryjí plastovými víčky, promíchají se jemně vířením a potom se inkubují po dobu 24 hodin při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého.

Separace

Po inkubaci se desky zakryjí fólií PARAFILM^(R) a odstředí se 15 minut při frekvenci otáčení 1000⁻¹ min⁻¹ 4 °C v odstředivce Damon IEC Model CRU-5000. Ze 4 až 8 jamek se odstraní médium (asi 175 μ l), spojí se a umístí ve 2ml sterilních lahvičkách pro zmrazování. Vzorky se uchovávají až do provádění analýzy při - 70 °C.

Analýza na interferon/výpočet

Interferon se stanovuje biologickým stanovením za použití buněk z humánního plicního karcinomu A549, které byly vyprovokovány pomocí viru encephalomyocarditis. Podrobnosti tohoto biologického stanovení jsou uvedeny v G. L. Brennan a L. H. Kronenberg, "Automated Bioassay of Interferons in Micro-test Plates", Biotechniques, červen/červenec; 78, 1983. Tento postup lze v krátkosti popsat takto. Zředěné interferonové vzorky a buňky A549 se inkubují 12 až 24 hodin při 37 °C. Inkubované buňky se infikují inokulem viru encephalomyocarditis.

Infikované buňky se inkubují další období při 37 °C a potom se kvantitativně vyhodnotí virový cytopathický účinek. Virový cytopathický účinek se kvantifikuje obarvením vzorku a následným spektrofotometrickým měřením absorbance. Výsledky jsou vyjádřeny v hodnotách referenční jednotky interferonu (α) na mililitr a jsou vztaženy na hodnotu získanou pro standard NIH HU IF-L. Interferon se identifikuje v podstatě jako všechny interferon (α) zkoušením pomocí šachovnicových neutralizačních stanovení proti králíčímu anti-humánnímu interferonu (α) a kozímu anti-humánnímu interferonu (α) za použití monovrstev buněk A549, provokovaných virem encephalomyocarditis.

10 Výsledky

Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 3, v níž chybějící údaj znamená, že sloučenina nebyla zkoušena v této konkrétní dávkové koncentraci. Výsledky označené značkou "<" před určitým číslem znamenají, že interferon nebyl detegovatelný v množstvích vyšších, než je nižší hladina citlivosti tohoto stanovení.

15

Tabulka 3

Indukce tvorby interferonu (α) v humánních buňkách

Sloučenina z příkladu	Referenční jednotky/ml					
	Koncentrace dávky (μ g/ml)					
	0, 01	0, 05	0, 1	0, 5	1, 0	5, 0
3	37	1200	190	1100	1000	640
6	4,3	67	110	150	150	110
C1	4,2*	406*	619*	493*	557*	557*
C2	< 1,8	140	250	750	750	750
C3			10,5*	340*	550*	296*
C4			< 6,4	< 6,4	1200	1200

* Průměrná hodnota získaná ze třech separátních stanovení.

20 Výsledky uvedené v tabulce 3 ukazují, že sloučeniny z příkladů 3 a 6 indukují biosyntézu interferonu v humánních buňkách.

Protivirová účinnost u morčat

25 Dále uvedené zkušební metody demonstrují schopnost sloučenin podle vynálezu snižovat počet a závažnost lézí, které se vyvinou u morčat infikovaných virem Herpes simplex typu II a indukovat biosyntézu interferonu o morčat.

30 Samice morčete Hartley o hmotnosti 200 až 250 g se anestetizují methoxyfluranem (tato látka je dostupná na trhu pod obchodním označením METAFANE^(R), výrobek firmy Pitman - Moore, Inc. Washington Crossing, NJ) a poté se jejich vaginální oblast otře chomáčkem suché vaty. Potom se morčata intravaginálně infikují chomáčkem vaty napuštěným virem Herpes simplex typu II, kmene 333 ($1 \times 1 \times 10^5$ plakotvorných jednotek na ml). Morčata se rozdělí do skupin po 7 zvířatech, přičemž na každou léčbu se používá jedné skupiny a jedna skupina slouží jako

kontrolní (lěčba samotným nosičem). Sloučeniny podle vynálezu se zpracují na vodné přípravky obsahující 5 % smáčedla Tween 80 (polyoxyethylen- sorbitanmonooleát, výrobek firmy Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI). Morčatům se podává léčivo orálně jednou denně po dobu 4 následujících dnů, počínaje 24 hodin od infekce.

- 5 Protivirová účinnost se vyhodnocuje porovnáním vývoje lézí u morčat, která jsou léčena jednak sloučeninou a jednak pouze nosičem. Vnější léze se klasifikují 4, 7, 8 a 9 dnů po infekci za použití následující klasifikační stupnice:

0 - žádné léze 3 - několik velkých puchýřků

1 - zčervenání a otok 4 - velké vředy s nekrózou

- 10 2 - několik malých puchýřků 5 - paralýza

3 - několik velkých puchýřků

4 - velké vředy s nekrózou

5 - paralýza

- 15 Pro výpočet procentuální inhibice lézí se používá maximální hodnoty zjištěné u každého morčete. Procentuální inhibice lézí se vypočítá podle následujícího vzorce:

součet maximálních hodnot léze u ošetřené skupiny x 100

100 - $\frac{\text{---}}{\text{---}}$

součet maximálních hodnot léze u kontrolní skupiny x 100

20

Tabulka 4

Protivirová účinnost u morčete

Sloučenina z příkladu	Dávka (mg/kg)	Inhibice lézí (%)
3	03	56
3	0,1	13
3	0,03	37
6	1	100
6	0,5	100
6	0,3	93
6	0,1	0
C1	0,5	100
C1	0,1	50
C2	2	100
C3	3	96
C3	2	56*
C3	1	14
C4	1	100

* Průměrná hodnota ze tří separátních stanovení.

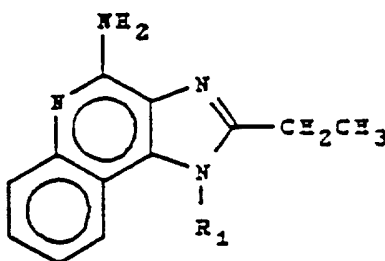
Výsledky uvedené v tabulce 4 ukazují, že sloučeniny z příkladů 3 a 6 inhibují počet lézí u morčat, které jsou způsobeny virem Herpes simplex typu II.

5

PATENTOVÉ NÁROKY

- 10 1. 2-Ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-aminy obecného vzorce I

15



(I)

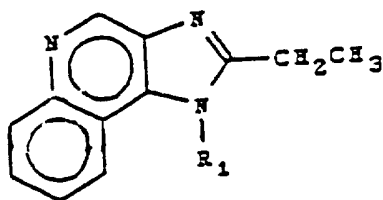
kde

R₁ představuje 2-methylpropylskupinu nebo 2-hydroxy-2-methylpropylskupinu

- 20 a jejich farmaceuticky vhodné adiční soli s kyselinami.

2. Protivirový farmaceutický přípravek, **vyznačující se tím**, že obsahuje 2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-amin podle nároku 1 v množství účinném pro inhibici a/nebo zabránění postupu virové choroby a farmaceuticky vhodný nosič.
- 25 3. 2-Ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-aminy podle nároku 1 pro léčbu savců infikovaných virem.
4. 2-Ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-aminy podle nároku 1 pro léčbu savců infikovaných virem Herpes simplex typu II.
5. 2-Ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinoliny, jakožto meziproducty pro výrobu 2-ethyl-1H-imidazo-
- 30 [4,5-c]chinolin-4-aminů podle nároku 1, obecného vzorce II

35



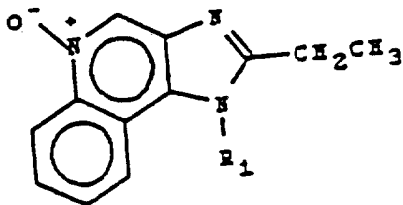
(II)

kde

R₁ představuje 2-methylpropylskupinu nebo 2-hydroxy-2-methylpropylskupinu.

6. 2-Ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-5-N-oxidy, jakožto meziprodukty pro výrobu 2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]chinolin-4-aminů podle nároku 1, obecného vzorce III

5



(III)

10

kde

R₁ představuje 2-methylpropylskupinu nebo 2-hydroxy-2-methylpropylskupinu.

15

Konec dokumentu

20