



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

200249

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 239/91

(22) Přihlášeno 13 10 71
(21) (PV 7752-75)
(32)(31)(33) Právo přednosti
od 13 10 70 (P 20 50 092.9)
Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 31 12 79

(45) Vydáno 15 06 83

(72) (73)

Autor vynálezu
a současně
majitel patentu

KUNZEL HANS-EGON, WOLF GERHARD DIETER, DORMAGEN, BIERLING ROBERT,
WUPPERTAL, PETERSEN SIEGFRIED, LEVERKUSEN, NISCHK GÜNTHER, DORMAGEN
a STEINHOFF DIETER, BOCHUM (NSR)

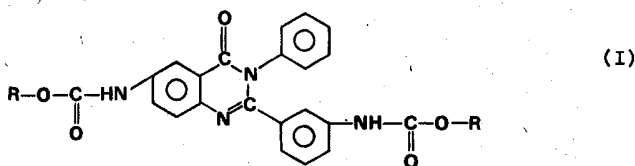
(54) Způsob výroby nových chinazolondiurethanů

1

Předložený vynález se týká nových chinazolondiurethanů, způsobu jejich výroby a jejich použití jako cytostatik.

Je již známo, že četné chinazonové deriváty mají hypnotické, uklidňující vlastnosti nebo způsobují svalovou relaxaci [viz Angew. Chemie 74 (1962), 855-861]. Naproti tomu nebyly známy žádné deriváty z třídy těchto látek, které by byly účinné proti malignímu bujení.

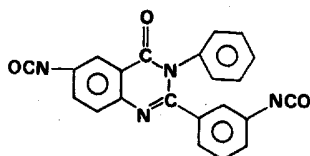
Nyní se zjistilo, že nové chinazolondiurethany obecného vzorce I



kde

R představuje alkylskupinu s 1 až 2 atomy uhlíku,

které mají velmi silné cytostatické vlastnosti, se mohou podle vynálezu získat tak, že se 6-isokyanato-2-(3-isokyanatofenyl)-3-fenyl-4-(3H)-chinazon vzorce II



(II)

nechá reagovat s alkoholem obecného vzorce III



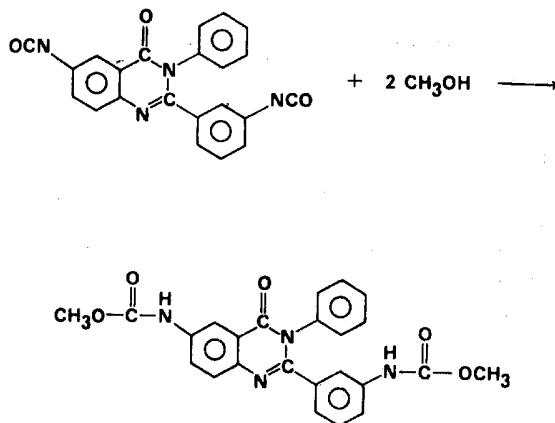
(III)

kde

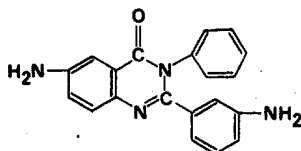
R má shora uvedený význam,

popřípadě v přítomnosti inertních rozpouštědel.

Když se jako výchozích látek použije 6-isokyanato-2-(3-isokyanatofenyl)-3-fenyl-4-(3H)-chinazolonu a methanolu, lze reakční průběh znázornit následujícím reakčním schématem:



Diisokyanatoderivát obecného vzorce II, použitý podle vynálezu, lze vyrobit o sobě známým způsobem z diaminu vzorce IV



(IV)

například fosgenací hydrochloridů v chlorbenzenu při 80 až 120 °C.

Diamin vzorce IV se může získat o sobě známým způsobem katalytickou hydrogenací odpovídající dinitrosloženiny. Tato dinitrosloženina se může vyrobit dříve popsáním způsobem (zveřejněné přihlášky vynálezu NSR DOS 1 809 174 a DOS 1 809 175) reakcí odpovídající nitroanthranilové kyseliny a odpovídajícího N-substituovaného nitrobenzimidchloridu v polárním rozpouštědle, jako například acetonu, v přítomnosti alifatického terciárního aminu, jako například triethylaminu, při teplotě v rozmezí od 0 do 50 °C nebo tak, že se odpovídající nitroanthranilová kyselina nechá reagovat s nitrobenzoylchloridem za vzniku odpovídajícího benzoxazinonu a tento meziprodukt se nechá reagovat s odpovídajícím primárním aminem. V obou případech vznikají nejprve zčásti meziprodukty, které se mohou thermicky v organic-

kém rozpouštědla, například glycerinu, při teplotě nad 100 °C nebo pomocí dehydratačních činidel, například P_2O_5 v N-methylpyrrolidonu, cyklizovat na odpovídající dinitrosloučeniny.

Alkoholy obecného vzorce III, použité jako výchozí látky, jsou známe.

Jako rozpouštědla se používá přednostně přebytku hydroxysloučeniny obecného vzorce III, reakce se však může provádět v přítomnosti inertních ředidel, jako například dioxanu, aromatických uhlovodíků, dimethylformamidu, dimethylacetamidu nebo N-methylpyrrolidonu.

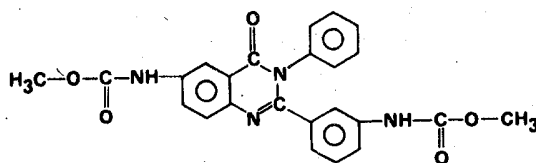
Při reakci sloučenin vzorce II a III může teplota ležet v širokém rozmezí. Obecně se pracuje při teplotě v rozmezí přibližně od 10 do asi 120 °C, přednostně pak v rozmezí od 25 do 80 °C.

Při provádění způsobu podle vynálezu se hydroxysloučeniny obecného vzorce III, pokud tato sloučenina neslouží jako rozpouštědlo, používá přednostně v množství 1 až 10 molů, s výhodou v množství 2,2 až 6 molů na mol sloučeniny obecného vzorce II.

Když se se sloučeninami vzorce II nechávají reagovat volné hydroxysloučeniny obecného vzorce III, doporučuje se přidat malé množství zásaditého katalyzátoru, například triethylaminu, pyridinu, triethylendiaminu nebo dimethylcyklohexylaminu. Tohoto katalyzátoru se používá v množství 0,1 až asi 5 % hmotnostních, vztaženo na celkové množství celé reakční směsi.

V následujícím příkladu se hmotnostní díly mají k objemovým dílům jako kilogramy k litrům nebo gramy k mililitrům.

P ř í k l a d



Z 2-(3'-isokyanatofenyl)-3-fenyl-6-isokyanato-4-(3H)-chinazolonu a methanolu.

38 hmotnostních dílů 2-(3'-isokyanatofenyl)-3-fenyl-6-isokyanato-4-(3H)-chinazolonu a 2 objemové díly triethylaminu se spolu s 200 objemovými díly methanolu 30 minut zahřívá k varu. Pak se reakční směs vmíchá do vody a produkt se překrystaluje z ethanolu.

Výtěžek 2-/3'-(methoxykarbonylamino)fenyl-/3-fenyl-6-methoxykarbonylamino-4-(3H)-chinazolonu: 36 hmotnostních dílů (81 % teorie). Teplota tání 243 až 245 °C.

Analýza:

vypočteno: 64,86 % C; 4,54 % H; 18,0 % O; 12,61 % N;

nalezeno: 64,7 % C; 4,7 % H; 18,2 % O; 12,8 % N;

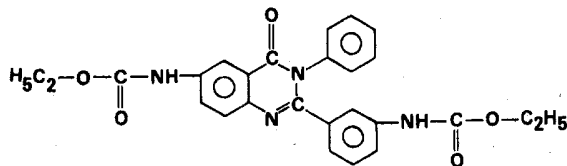
2-(3'-Isokyanatofenyl)-3-fenyl-6-isokyanato-4-(3H)-chinazolon se získá z 2-(3'-amino-fenyl)-3-fenyl-6-amino-4-(3H)-chinazolonu takto:

164 hmotnostních dílů 2-(3'-aminofenyl)-3-fenyl-6-amino-4-(3H)-chinazolonu se suspenduje v 1 000 objemových dílech bezvodého chlorbenzenu. Do suspenze se tak dlouho uvádí suchý chlorovodík, až se absorbuje alespoň takové množství chlorovodíku, které postačuje na tvorbu dihydrochloridu. Pak se při 80 až 100 °C uvádí tak dlouho fosgen, až vznikne čirý

roztok. Reakční směs se pak při 100 °C ještě půl hodiny dále míchá, profoukne se dusíkem a čirý roztok se za vakua zahustí.

Bílým produktem, který se takto získá, je podle infračerveného spektra čistý 2-(3'-isokyanatofenyl)-3-fenyl-6-isokyanato-4-(3H)-chinazolon. Teplota tání: 153 až 155 °C.

Analogickým způsobem se získá sloučenina vzorce



Teplota tání: 204 až 206 °C, výtěžek: 86 %.

Jak již bylo uvedeno, mají nové sloučeniny dobrou cytostatickou účinnost, což umožňuje jejich použití v lékařství, zejména při potlačování lymfatické leukémie. Nové sloučeniny proto představují obohacení současné techniky.

Dobrá účinnost sloučenin podle vynálezu byla vyzkoušena na modelu transplantované lymfatické leukémie L 1 210 u myši (tabulka 1), přičemž pokusy byly prováděny následujícím způsobem:

Myším o hmotnosti 18 až 22 g (kmen B 6 D 2 F 1) bylo intraperitoneálně podáno 2×10^5 buněk leukémie L 1 210 v 0,2 ml ascitické kapaliny.

S léčením se počalo 24 hodin po transplantaci buněk leukémie a byla podána 4 x intraperitoneální dávka vždy každý následující den.

Doba pokusu byla 2 až 3 týdny.

Pro vyhodnocení výsledků pokusu byl stanoven "index přežití" takto:

Považuje-li se doba přežití 50 kontrolní skupiny za 100 %, může se podle vzorce

$$\text{index přežití} = \frac{\text{doba přežití 50 ošetřené skupiny} \times 100}{\text{doba přežití 50 kontrolní skupiny}}$$

zjistit hodnota, která slouží jako míra změny doby přežití u ošetřených zvířat.

Posouzení:

Hodnoty < 100 % ukazují na zkrácenou dobu přežití ošetřené skupiny zvířat, tj. na toxické účinky preparátu.

Hodnoty > 100 % ukazují na prodloužení doby přežití 50 a podle výšky indexu je možno porovnat potlačování růstu nádoru.

Tabulka 1

Sloučenina obecného vzor- ce I	Leukémie L 1 210 Optimální dávka mg/kg tělesné hmot- nosti při 4 dávkách intraperitoneálně	Index přežití
R = CH ₃	100	1 047
R = C ₂ H ₅	350	913

Deriváty chinoxalinu s cytostatickým účinkem jsou již známy [patenty US č. 3 455 920, 3 463 778, I. Med. Chem. sv. 10 (1967), str. 334 až 336]. Sloučeniny podle vynálezu přináší oproti těmto známým sloučeninám pokrok v tom, že při přibližně stejném cytostatickém účinku mají výrazně nižší cytotoxicitu. To je jasně zřejmé ze srovnávacího zkoušení cytostatického a cytotoxického účinku těchto dvou látek:

Látka I 2-/3'-methoxykarbonylamino)fenyl/-6-methoxykarbonylamino-4-(3H)-chinazolon (látka podle vynálezu);

Látka II 2,3-dihydro-6-nitro-2-fenyl-4-(1H)-chinazolinon (látka známá z příkladu 1 pat. spisu US č. 3 455 920).

Zkoušení se provádí jednak in vivo na Walkerově karcinomu 256 (zkouška 1) a jednak in vitro na suspenzních kulturách myších fibroblastů kmene L (Earle), (zkouška 2).

Zkušební podmínky

Z k o u š k a 1

Krysám Wistar o hmotnosti 140 až 160 g se do stehna pravé zadní nohy naočkuje intramuskulárně suspenze nádoru Walkerova karcinomu 256. Léčení látkami I a II se provádí po-
čínaje 24 hodinami po transplantaci nádoru 5x p. o. Zvířata se usmrtí 10. den po transplan-
taci nádoru a registruje se hmotnost nádoru, změna tělesné hmotnosti a přijímání potravy.
Účinnost látky I a II se vyjádří hodnotou indexu hmotnosti nádoru (TG indexu), který se
vypočte podle vzorce

$$\text{TG index} = \frac{\text{průměrná hmotnost nádoru léčených skupin zvířat}}{\text{průměrná hmotnost nádoru kontrolní skupiny zvířat.}}$$

Jestliže se považuje průměrná hmotnost nádoru u kontrolní skupiny za rovnou 1, mají TG indexy hodnoty desetinných čísel v rozmezí od 0,0 do 1,0.

Slovní označení účinnosti při různém TG indexu je podle běžné mezinárodní praxe toto:

žádaná účinnost	1,0 až 0,8
nízká účinnost	0,7 až 0,6
výrazná účinnost	0,5 až 0,4
dobrá účinnost	0,3 až 0,2
velmi dobrá účinnost	0,1 až 0,0

Z k o u š k a 2

Suspenní kultury L-buněk o počátečním počtu buněk 2×10^5 buněk/ml se ošetří látkou I a II v koncentraci 1 000, 100, 10, 1 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Vyhodnocení zkoušky se provádí tak, že se po 24 hodinách zkoušky vypočte index počtu buněk podle vzorce

$$\text{index počtu buněk} = \frac{\text{průměrný počet živých buněk v ošetřených kulturách}}{\text{průměrný počet v kontrolních kulturách.}}$$

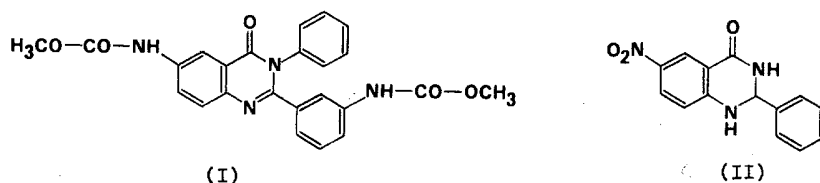
Výsledky

Z k o u š k a 1

Zkouška in vivo na Walkerově karcinomu 256. Byly určeny indexy hmotnosti nádoru, změny tělesné hmotnosti a přijímání potravy po podání dávek se stejným účinkem (ekvivalentních dávek).

Látka II se ukázala být podstatně toxičtější než látka I. To je zřejmé z vyšších procentických ztrát na zvířatech, velkého snížení tělesné hmotnosti a konečně z podstatně sníženého přijímání potravy po podání látky II. Pro větší přehlednost jsou odpovídající hodnoty pro látky I a II uvedeny ve srovnávací tabulce II.

T a b u l k a 2



Denní dávka mg/kg 5x p. o.	50	100	75	150
Therapeutický účinek	0,6	0,3	0,6	0,3
Ztráty na zvířatech (%)	0	12,5	0	37,5
Změna tělesné hmotnosti (g)	+27	+9	-1	-16
Denní příjem potravy vztahený na 1 zvíře (g)	17,0	12,7	11,7	6

Z k o u š k a 2

Zkouška in vitro na L-buňkách

Byly určovány indexy počtu buněk po podání stejných koncentrací látek I a II.

Index počtu buněk po podání látky I má po 24 hodinách zkoušky tyto hodnoty:

Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Index počtu buněk
0,01	0,9
0,1	0,8
1,0	0,9
10	0,7
100	0,7
1 000	0,4

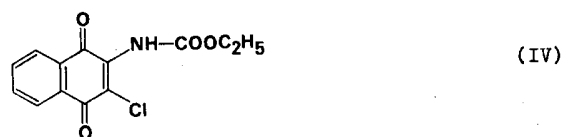
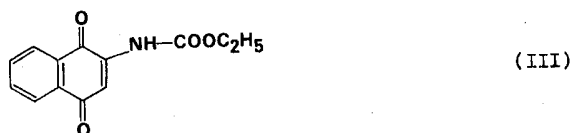
Odpovídající hodnoty pro látku II jsou tyto:

Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Index počtu buněk
0,01	1,2
0,1	1,2
1,0	1,1
10	0,8
100	0,5
1 000	0,3

Z toho je zřejmé, že látka II má výrazně silnější cytotoxický účinek proti L-buňkám než látka I. Tím se vysvětluje vyšší toxicita látky II zjištěná in vivo.

Z pokusů in vitro rovněž vyplývá, že látka I má mechanismus účinku spočívající ve specifickém zadržování mitosy v metafázi, zatímco látka II působí na buňky jen prostřednictvím svého nespecifického cytotoxického účinku. Na základě specifického mechanismu účinku lze látku I používat k synchronizaci buněčného cyklu populací nádorových buněk. To u látky II není možné, takže i z toho je zřejmý pokrok, který přináší látka I oproti látce II.

Jsou též známy urethanové deriváty s antileukemickým účinkem (patent DE 1 102 721). Sloučeniny podle vynálezu, zejména látka I, jsou však lepší než nejúčinnější sloučeniny z citovaného spisu, tj. než sloučeniny III a IV,



a to jak pokud se týče jejich antileukemického účinku při orální aplikaci, tak pokud se týče typu jejich mechanismu účinku.

Přednost látky I oproti jiným látkám podobné struktury lze prokázat na dvou kritériích, a to jednak na kritériu lepšího antileukemického účinku po perorální aplikaci a jednak na

kritériu mechanismu účinku. Lze totiž prokázat, že mechanismus účinku spočívající v blokování mitosy srovnávací látky nemají.

Důkaz předností látky I byl proveden pomocí následujících srovnávacích zkoušek za použití sloučenin III a IV.

Srovnávací zkoušení účinku těchto tří sloučenin bylo prováděno in vivo na leukémií myši P 388, což je mezinárodně používaný běžný zkušební nádor. Výsledky zkoušek jsou uvedeny v tabulce 3. Jako parametr účinku sloužilo v těchto zkouškách procentuální prodloužení doby přežití skupin leukémických myší ošetřovaných jednotlivými preparáty oproti odpovídajícím kontrolním skupinám. Uvedené hodnoty v procentech jsou shrnuty v tabulce.

Z dat uvedených v tabulce 3 vyplývá, že pomocí látky I se dosáhne ve srovnání se srovnávacími sloučeninami III a IV výraznějšího prodloužení doby přežití leukémických myší, přičemž toto prodloužení je podstatně významnější při perorální aplikaci, než při intraperitoneální aplikaci.

Kromě těchto zkoušek in vivo byl zkoušen mechanismus účinku těchto tří látek na buněčných kulturách Sarkomu MCS 4, popřípadě Sarkomu 180 in vitro. Výsledky jsou obsaženy v tabulce 4.

Z údajů uvedených v této tabulce je zřejmé, že z tří zkoušených sloučenin má pouze látka I účinek spočívající v blokování mitosy. Tento účinek je prokazatelný ještě i při nízkých koncentracích preparátu 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Obě naftochinonové sloučeniny III a IV jsou cytostaticky účinné jen prostřednictvím svého cytotoxického účinku (účinku spočívajícího ve smrtelném poškození buněk) a nehodí se proto pro řízené ovlivňování kinetiky nádorových buněk. S ohledem na klinickou použitelnost splňuje z těchto tří zkoušených sloučenin pouze látka I předpoklady pro řízené ovlivňování kinetiky nádorových buněk.

T a b u l k a 3

Porovnání účinnosti látky I ve srovnání se sloučeninami III a IV při potlačování leukémie P 388 u myší in vivo.

Parametr: Procentuální prodloužení doby přežití (PPDP) leukémických myší oproti kontrolním skupinám.

Tabelované hodnoty: Optimální účinnost v celém rozmezí dávky použitým při zkoušce.

Rozmezí dávky mg/kg	Způsob podávání	Optimální PPDP (%) I	Optimální PPDP (%) III	Optimální PPDP (%) IV
50 až 500	p.o.	104	96	78
2,5 až 250	i.p.	26	7	15
2,5 až 250	i.p.	30	30	22
1 až 500	p.o.	104	59	59

Tabulka 4

Zkoušení mechanismu účinnosti (M) látek I, III a IV na buněčných kulturách Sarkomu MCS4 (1) a Sarkomu 180 (2)

Koncentrace preparátu v živném prostředí ($\mu\text{g/ml}$): 1 1 000 až 1
2 10 až 0,01

Preparát	Mechanismus účinku na buňky (1)	Sarkom MCS 4 ED_{50} WM ($\mu\text{g/ml}$)	Mechanismus účinku na buňky (2)	Sarkom 180 ED_{50} WM ($\mu\text{g/ml}$)
I	blokování mitosy	nezjistitelné	blokování mitosy	0,05
III	smrtelné poškození	5	smrtelné poškození	5
IV	smrtelné poškození	5	smrtelné poškození	5

Nové sloučeniny se přednostně podávají orálně, popřípadě též intraperitoneálně.

Nových sloučenin se může používat buď jako takových nebo v kombinaci s netoxickými inertními farmaceuticky vhodnými nosiči. Jako dávkovací formy pro podávání účinných látek v kombinaci s různými inertními nosiči přicházejí v úvahu tablety, dražé, kapsle, granuláty, vodné suspenze a emulze, nevodné emulze a suspenze, sirupy apod. Mezi tyto nosiče náleží pevná zředovadla nebo plnidla, vodné prostředí i různá netoxická organická zředovadla apod. Do tablet a jiných dávkovacích forem se pochopitelně mohou přidávat sladidla a podobné přísady. Therapeuticky účinná sloučenina má být ve shora uvedených formách přítomna v koncentraci přibližně od 0,1 do 99, přednostně od 0,5 do 90 % hmotnostních, vztaheno na celkovou směs.

Lékové formy se vyrábějí o sobě známým způsobem, například míšením účinných látek se zředovadly a/nebo nosiči, popřípadě za použití emulgátorů a/nebo dispergátorů.

Mezi nosiče, popřípadě pomocné prostředky náleží například tyto látky:

Voda, netoxická organická rozpouštědla, nebo zředovadla, jako parafiny (například ropné frakce), rostlinné oleje (například podzemnicový a sezamový olej), alkoholy (například ethylalkohol, glycerin), glykoly (například propylenglykol, polyethylenglykol); pevné nosiče, jako například přírodní nerostné moučky (například vysoce disperzní kyselina křemičitá, křemičitany), cukr (například surový, mléčný a hroznový cukr), emulgátory, jako neionogenní a aniontové emulgátory (například polyoxyethylované estery mastných kyselin, polyoxyethylované ethery mastných alkoholů, alkylsulfonáty a arylsulfonáty), dispergační prostředky (například lignin, methylcelulóza, škroby a polyvinylpyrrolidon), kluzné prostředky (například stearan hořečnatý, mastek, kyselina stearová a natriumlaurylsulfát).

Tablety mohou pochopitelně obsahovat, jak již bylo uvedeno, kromě uvedených nosičů též přísady, jako citran sodný, uhličitán vápenatý a střední fosforečnan vápenatý, spolu s různými dalšími příměsemi, jako škroby, přednostně bramborovým škrobem, želatinou apod. Při lisování tablet se mohou přidávat též kluzné látky, jako stearan hořečnatý, natriumlaurylsulfát a mastek. V případě suspenzí a emulzí se mohou účinné látky mísit nejen se shora uvedenými pomocnými látkami, ale též s různými látkami zlepšujícími chuť a barvivy.

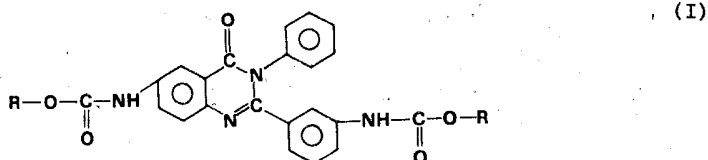
Účinné látky mohou být obsaženy v kapslích, tabletách, pastilkách, dražé, ampulích atd., rovněž v jednotkových množstvích, přičemž každá dávkovací jednotka je vytvořena tak, že obsahuje jednu jednotkovou dávku aktivní složky.

Nové sloučeniny mohou být přítomny v přípravech rovněž ve formě směsí s jinými známými účinnými látkami.

Obecně se jako výhodné ukázalo pro dosažení dobrých výsledků podávání účinných látek v množství asi 50 až asi 300 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Přesto může být popřípadě nutné uvedené množství snížit, a to v závislosti na druhu a na tělesné hmotnosti ošetřovaného objektu, jeho individuálním snášení léčiva, typu lékové formy a podávání léčiva, jakož i na čase, popřípadě na časovém intervalu, ve kterém se podávání provádí. Tak může být v některých případech dostatečné i menší množství než shora uvedené nejmenší množství, zatímco v jiných případech se musí překročit horní hranice tohoto rozmezí. V případě podávání větších množství se někdy doporučuje rozdělit celkovou denní dávku do více jednotlivých dávek.

PŘEDMĚT VYNALEZU

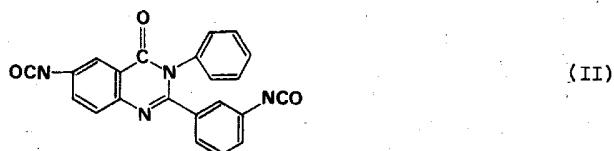
1. Způsob výroby nových chinazolondiurethanů obecného vzorce I



kde

R představuje alkylskupinu s 1 nebo 2 atomy uhlíku,

vyznačený tím, že se 6-isokyanato-2-(3-isokyanatofenyl)-3-fenyl-4-(3H)-chinazolon vzorce II



nechá reagovat s alkoholem obecného vzorce III



kde

R má shora uvedený význam,

popřípadě v přítomnosti inertních rozpouštědel.