



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

256395

(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 D 401/06

(22) Přihlášeno 19 12 85
(21) PV 9547-85
(32) (31) (33) Právo přednosti od 21 12 84
(P 34 46 713.0) Německá spolková republika

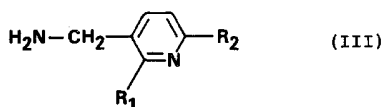
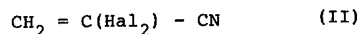
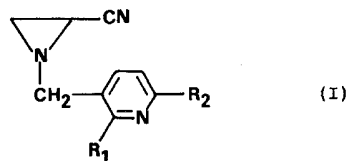
(40) Zveřejněno 13 08 87

(45) Vydáno 15 02 89

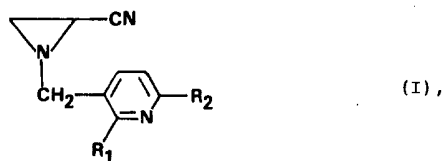
(72) Autor vynálezu BOSIES ELMAR dr., ENDELE RICHARD dr., PAHLKE WULF dr., MANNHEIM (NSR)
(73) Majitel patentu BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM (NSR)

(54) Způsob přípravy derivátů N-substituované aziridin-2- karboxylové kyseliny

Sloučeniny obecného vzorce I, kde R_1 znamená C_{1-2} alkoxykupinu, R_2 znamená hydroxymethylový, karboxylový, C_{1-2} alkoxykarbonylový nebo formylový zbytek, a jejich farmakologicky nezávadné soli, se připraví reakcí sloučeniny obecného vzorce II, kde Hal_2 znamená chlor nebo brom, s aminem obecného vzorce III, a potom případným převedením na farmakologicky nezávadné soli. Sloučeniny projevují imunosupresivní účinek, mohou se proto použít jako imuno-modulátory.



Předmětem vynálezu je způsob přípravy derivátů N-substituované aziridin-2-karboxylové kyseliny obecného vzorce I



kde

R_1 znamená alkoxy skupinu s 1 až 2 atomy uhlíku,

R_2 znamená hydroxymethylový, karboxylový, alkoxykarbonylový s 1 až 2 atomy uhlíku nebo formylový zbytek, a jejich farmakologicky nezávadných solí.

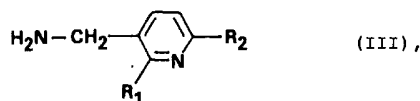
Předmětem vynálezu jsou dále stereoisomerní sloučeniny, které vznikají například na základě asymetrického atomu uhlíku, přičemž štěpení stereoisomerních forem se provádí podle známých způsobů, a dále jejich použití jako imunomodulátory.

Pod alkoxy skupinou s 1 až 2 atomy uhlíku se rozumí s výhodou methoxy- a ethoxy skupina. Jako alkoxykarbonylové zbytky s 1 až 2 atomy uhlíku se rozumí obzvláště methoxykarbonylový a ethoxykarbonylový zbytek.

Způsob přípravy sloučenin vzorce I se vyznačuje tím, že se nechá reagovat sloučenina obecného vzorce II



kde Hal_2 znamená chlor nebo brom,
s aminem obecného vzorce III



kde R_1 a R_2 mají výše uvedený význam, a potom se získané sloučeniny obecného vzorce I přemění na sloučeniny, kde R_2 značí hydroxymethyl a formyl, tím způsobem, že se sloučeniny, kde R_2 značí karboxyl, nechají reagovat s redukčním činidlem jako například borohydridem sodným a případně se převedou sloučeniny obecného vzorce I na farmakologicky nezávadné soli.

Způsob přípravy aziridinových derivátů obecného vzorce I je známý z literatury (viz např. Gundermann et al., Chem. Ber. 105, 312 (1972) a Wagner-Jauregg Helv. Chim. Acta 44, 1 237 (1961)). S výhodou se použijí inertní rozpouštědla, jako například ether, dioxan, benzen, toluen, atd., mohou se však také použít nízké alkoholy jako methanol, ethanol, atd. Reakční teplota je v rozmezí 0 až 80 °C, s výhodou se pracuje při teplotě místnosti. Reakční doba je v rozmezí 3 hodin až 10 dnů.

Další přeměna sloučeniny obecného vzorce I na jinou sloučeninu obecného vzorce I se může provádět přeměnou substituentu R_2 .

Sloučeniny obecného vzorce I, kde R_2 znamená hydroxymethylovou skupinu, se mohou připravit redukcí příslušné sloučeniny, kde R_2 je karboxyl, formyl nebo alkoxykarbonyl.

Sloučeniny obecného vzorce I, kde R_2 je karboxyl, se mohou připravit oxidací sloučenin obecného vzorce I, kde R_2 je hydroxymethyl nebo formyl, nebo zmýdelněním sloučenin obecného vzorce I, kde R_2 je alkoxykarbonyl.

Sloučeniny obecného vzorce I, kde R_2 znamená alkoxykarbonyl nebo formyl, se mohou proto také použít jako meziprodukty pro přípravu sloučenin obecného vzorce I, kde R_2 znamená hydroxymethylovou nebo karboxylovou skupinu.

Přeměna sloučenin obecného vzorce I s alkoxykarbonylovou nebo kyanovou skupinou na karboxylovou sloučeninu se zpravidla provádí zmýdlením podle způsobu popsaného v literatuře.

Přeměna alkoxykarbonylové, formylové nebo karboxylové skupiny na hydroxymethylovou skupinu se s výhodou provádí hydroboritany, přičemž se karboxylová skupina případně předem může aktivovat, například reakcí na směsný anhydrid. Může se například použít hydroboritan lithný, směs hydroboritan sodný/chlorid lithný, hydroboritan sodný v polyethylenglykolu, směs hydroboritan sodný/chlorid hlinitý nebo směs boran/tetrahydrofuran. Jako rozpouštědlo se především použijí nízké alkoholy jako methanol nebo ethanol, tetrahydrofuran, diethylenglykoldimethylether nebo polyethylenglykol. Redukce se provádí v teplotním rozmezí 0 až 60 °C, s výhodou 20 až 30 °C.

Oxidace hydroxymethylové nebo formylové skupiny na karboxylovou skupinu se může provádět pomocí dostupných oxidačních činidel jako například manganistanu draselného, tetrabutylamonium-manganistanu, bis(tetrabutylamonium) dvojchromanu, peroxidu niklu nebo pyridiniumdvojchromanu. Jako rozpouštědlo se použije podle oxidačního činidla voda, halogenované uhlovodíky, ether nebo dimethylformamid, přičemž se reakce provádí při teplotě v rozmezí 20 až 100 °C.

Pro přípravu farmaceutických přípravků s imunomodulačním účinkem se smíchají sloučeniny obecného vzorce I známým způsobem s vhodným farmaceutickým nosičem a vytvarují se například jako tablety nebo dražé nebo se suspendují nebo rozpustí za přídavku příslušných pomocných látek ve vodě nebo oleji jako například olivovém oleji, a naplní se do tvrdých kapslí.

Protože je účinná látka v kyselém prostředí labilní, opatří se přípravek povlakem rozpustným teprve v alkalickém prostředí tenkého střeva nebo se přimíchá příslušný nosič, jako například vyšší mastná kyselina nebo karboxymethylcelulóza. Jako mastný nosič se může například uvést škrob, laktoza, mannit, methylcelulóza, talek, vysoko disperzní kyselina křemičitá, výše molekulární mastné kyseliny (jako kyselina stearová), želatina, agar-agar, fosforečnan vápenatý, stearan hořečnatý, živočišné a rostlinné tuky a mastné vysokomolekulární polymery (jako polyethylenglykoly), přípravky vhodné pro orální aplikaci mohou případně obsahovat chutné látky a sladidla.

Jako injekční prostředí se například použije voda, která obsahuje přísady obvyklé u injekčních roztoků, jako stabilizátory, činidla usnadňující rozpouštění nebo slabě alkalický pufr. Takovou přísadou je například dimethylsulfoxid, dimethylformamid, N-methylpyrrolidon, fosforečnanový nebo uhličitanový pufr, ethanol, komplexotvorná látka (jako kyselina ethylendiamin-tetraoctová a její netoxické soli), vysoko molekulární polymery (jako kapalný polyethylen-oxid) k regulaci viskozity.

K léčení onemocnění, která jsou spojena s oslabením imunosystému, se použijí farmakologicky účinné sloučeniny obecného vzorce I v jednotlivé dávce 1 až 600, s výhodou 50 až 500 mg, přičemž se tyto jednotlivé dávky mohou podávat podle potřeby jednou nebo vícekrát za den.

Následující příklady ukazují některé z četných variant způsobu, které se mohou použít k syntéze sloučenin podle vynálezu, aniž by byl omezen rozsah vynálezu.

Struktura všech látek popsaných v následujících příkladech byla potvrzena mikrospalovací analýzou, nukleárně magnetickým rezonančním spektrem a hmotovým spektrem.

P ř í k l a d 1

5-[(2-kyano-1-aziridiny)methyl]-6-methoxy-pyridin-2-karboxylová kyselina (sodná sůl)

2,33 g (44 mmol) akrylnitrilu se zředí 1 ml diethyletheru a za míchání a osvitlu se přikape 7,05 g (44 mmol) bromu. Příležitostným ochlazením se dosáhne, že vnitřní teplota nepřestoupí 40 °C. Míchá se dále 5 minut, zředí se 60 ml methanolu a přikape se roztok 6,55 g (44 mmol) triethanolaminu v 60 ml methanolu. Po další hodině se přikape současně roztok 6,55 g (44 mmol) triethanolaminu v 60 ml methanolu a roztok 8 g (44 mmol) 5-aminomethyl-6-methoxy-pyridin-2-karboxylové kyseliny (t.t. 269 až 270 °C roz.), v jednom litru methanolu a 200 ml vody. Roztok se nechá stát 24 hodiny, zahustí se na rotačním odpařováku, vodný roztok se upraví 2 N kyselinou solnou na pH 4,5 a nepřetržitě se extrahuje 2 dny methylenchloridem. Methylenchloridová fáze se suší a zahustí. Získá se 4,8 g oleje, který se rozpustí v 50 ml ethanolu. Za chlazení se přidá roztok 440 mg sodíku v 15 ml ethanolu.

Vyloučí se sodná sůl 5-[(2-kyano-1-aziridinyl)methyl]-6-methoxy-pyridin-2-karboxylové kyseliny, po přidavku 100 ml isopropanolu se odsaje, suší se a promyje se diethyletherem. Získá se 3,7 g (33 % teorie) žádané sloučeniny o t.t.: 230 až 232 °C.

Z methylenchloridového extraktu se může po oddestilování methylenchloridu a rozpuštění olejovitého zbytku v trošce isopropanolu izolovat diethyletherem 5-[(2-kyano-1-aziridinyl)methyl]-6-methoxy-pyridin-2-karboxylová kyselina o t.t. 96 až 97 °C.

5-aminomethyl-6-methoxy-pyridin-2-karboxylová kyselina použitá jako výchozí látka se získá následujícím způsobem:

3-kyano-2-methoxy-6-methylpyridin se oxiduje manganistanem draselným ve vodném roztoku na 5-kyano-6-methoxypyridin-2-karboxylovou kyselinu (t.t.: 235 až 237 °C). Následující hydrogenací na palladiu na uhlí ve směsi isopropanol/voda/kyselina solná se získá žádaná sloučenina.

Analogickým způsobem se získá reakcí 2-bromakrylnitrilu vzniklého bromací akrylnitrilu a odštěpením bromovodíku s methylesterem 5-aminomethyl-6-methoxy-pyridin-2-karboxylové kyseliny (t.t. HCl-soli: 224 až 226 °C) methylester 5-[(2-kyano-1-aziridinyl)methyl]-6-methoxy-pyridin-2-karboxylové kyseliny; t.t. (z isopropanolu): 156 až 158 °C; výtěžek: 57 %.

Methylester 5-aminomethyl-6-methoxy-pyridin-2-karboxylové kyseliny použitý jako výchozí látka se připraví následujícím způsobem:

5-kyano-6-methoxy-pyridin-2-karboxylová kyselina (jak uvedeno výše) se nechá reagovat v methanolu pomocí trimethylchlorsilanu na methylester 5-kyano-6-methoxy-pyridin-2-karboxylové kyseliny (t.t.: 124 až 125 °C). Následující hydrogenací v methanolu na palladiu na uhlí za přítomnosti kyseliny solné se získá žádaná aminomethylová sloučenina (t.t. HCl-soli: 224 až 226 °C. Hydrogenační roztok se upraví přidavkem několika kapek triethanolaminu na pH 7 a přímo se použije pro následující reakci.

P ř í k l a d 2

1-[(6-hydroxymethyl-2-methoxy-3-pyridinyl)methyl]-2-aziridin-karbonitril

247 mg (1 mmol) methylesteru 5-[(2-kyano-1-aziridinyl)methyl]-6-methoxy-pyridin-2-karboxylové kyseliny (viz příklad 1) se rozpustí v 10 ml absolutního tetrahydrofuranu a k roztoku se přidá 74 mg (2 mmol) hydroboritanu sodného a 84 mg (2 mmol) chloridu lithného. Po dvanáctihodinovém míchání při teplotě místnosti se přidá ještě jednou stejné množství hydroboritanu sodného a chloridu lithného a po dalších 12 hodinách se přidá 5 ml vody. Zahustí se, zbytek se dá do ethanolu, filtruje se, filtrát se zahustí, zbytek se dá do acetonu, filtruje se a zahustí se. Zbytek se čistí na silikagelovém sloupci (rozpuštědlo: aceton/toluen i.v. 1/3; Rf-hodnota cca 0,3). Získá se 120 mg (55 % teorie) žádané látky o t.t.: 68 až 70 °C.

P ř í k l a d 3

5-[(2-kyano-1-aziridinyl)methyl]-6-ethoxy-pyridin-2-karboxylová kyselina

Analogickým způsobem, jak je popsáno v příkladu 1, se získá reakcí 2-bromakrylnitrilu vzniklého bromací akrylnitrilu a odštěpením bromovodíku s 5-aminomethyl-6-ethoxy-pyridin-2-karboxylovou kyselinou (t.t.; 226 až 228 °C) 5-[(2-kyano-1-aziridinyl)methyl]-6-ethoxy-pyridin-2-karboxylová kyselina (t.t.; 108 až 111 °C) v 35% výtěžku.

5-aminomethyl-6-ethoxy-pyridin-2-karboxylová kyselina použitá jako výchozí látka se připraví následujícím způsobem:

2-chlor-6-methyl-pyridin-2-karbonitril se nechá reagovat s ethylátem sodným v ethanolu na 2-ethoxy-6-methylpyridin-3-karbonitril (t.t.: 90 až 92 °C) a potom se oxiduje manganistanem draselným na 5-kyano-6-ethoxy-pyridin-2-karboxylovou kyselinu (t.t.: 185 až 190 °C). Katalytickou hydrogenací na palladiu na uhlí se potom získá 5-aminomethyl-6-ethoxy-pyridin-2-karboxylová kyselina.

P ř í k l a d 4

5-[(2-kyano-1-aziridinyl)methyl]-6-methoxy-pyridin-2-karboxaldehyd

2,4 g 1-[(6-hydroxymethyl-2-methoxy-3-pyridinyl)methyl]-2-aziridin-karbonitrilu popsaného v příkladu 2 se rozpustí v 80 ml methylenchloridu a přidá se 6 g aktivovaného burelu. Míchá se 24 hodiny při teplotě místnosti, přidá se ještě jednou stejné množství aktivovaného burelu a nechá se opět 24 hodiny míchat při teplotě místnosti. Potom se odsaje, filtrát se zahustí a zbytek se čistí na silikagelovém sloupci (rozpuštědlo: dioxan/ligroin i.v. 1/3). Frakce se žádanou sloučeninou se zahustí a zbytek se překrystaluje z toluenu.

Výtěžek: 1,4 g (59 % teorie), t.t. 104 až 105 °C.

Imunosupresivní účinek sloučenin podle vynálezu byl zkoušen v následujících testech.

Vliv ciamexonu na místní reakce Graft-versus-Host (GvH) a Host-versus-Graft (HvG) u myší

1) Ciamexon působí jako imunosupresivní farmaceutická látka, jak bylo ukázáno na základě zkušebního modelu (viz dále, tabulka 1), ve kterém byl srovnáván účinek ciamexonu s již známým účinkem cyclosporinu.

Místní GvH- reakce se indukují injekcí 5×10^6 parentálních (Balb/c) slezinných buněk do zadní tlapy (C57Bl/6x Balb/c) F_1 - u hybridních myší. Stejný počet F_1 slezinných buněk se podá injekcí do kontrolní tlapy kontralaterální strany. Pro HvG reakce se podá injekcí 5×10^6 buněk (Balb/c x C 57Bl/6) F_1 - hybridních myší do tlapy parentálních myší (Balb/c). Stejný počet Balb/c slezinných buněk se podá injekcí do kontralaterální tlapy (kontrola). Měření GvH nebo HvG reakcí se provádí pomocí testu podkolenních lymfatických uzlin. Po 5 dnech (GvH) nebo 3 dnech (HvG) po injekci buněk se odstraní a zváží podkolenní uzliny. Hmotnostní přírůstek uzlin zkoušené části oproti kontrolní straně slouží jako míra reakce GvH/HvG. Zvážatům se podá orálně ciamexon nebo cyclosporin v denní dávce 0,1 až 100 mg/kg. Doba léčení se počítá ode dne injekce buněk (den 0 - doba 0) až ke dni + 4 (GvH) nebo + 2 (HvG).

T a b u l k a 1

Látka	Dávka mg/kg	Δ Hmotnost lymfatických uzlin (mg x 10 ⁻¹)			
		GvH		HvG	
		$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$
Kontrola	PBS	45,2	8,3	35,5	10,3
Ciamexon	0,1	36,3	6,1	35,5	4,8
	1,0	25,7	10,5	21,5	4,8
	10,0	11,3 ⁺	4,1	12,7 ⁺	3,1
	100,0	3,5 ⁺	1,9	7,5 ⁺	3,7
Kontrola	olivový olej	36,3	8,5	43,3	9,4
Cyclosporin	0,1	35,7	10,8	36,2	6,0
	1,0	17,7 ⁺	4,2	26,7 ⁺	11,4
	10,0	8,5 ⁺	3,8	10,7 ⁺	5,7
	100,0	2,3 ⁺	1,6	2,5 ⁺	1,9

+ p ≤ 0,05 (pokusný t-test)

Příklad srovnávacího pokusu ukazuje, že ciamexon a také cyclosporin zřetelně potlačují jak reakci GvH tak také analogicky prováděnou reakci HvG.

2) 2-kyan-1-[(2-methoxy-6-karboxypyridin-3-yl)-methyl]aziridin (příklad 1) a 2-kyan-1-[(2-methoxy-6-hydroxymethylpyridin-3-yl)methyl]-aziridin (příklad 2) byly zkoušeny za stejných experimentálních podmínek vzhledem k jejich imunosupresivnímu účinku ve srovnání s ciamexonem. Denní dávka byla v rozmezí 0,01 až 10 mg/kg.

T a b u l k a 2

Místní reakce Graft-versus-Host

Látka	Dávka mg/kg	Hmotnost lymfatických uzlin (mg x 10 ⁻¹)					
		syngen		allogen		Δ	
		$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$
Kontrola		9,9	0,3	42,6	1,9	32,7	1,8
Ciamexon	0,01	10,9	0,8	38,9	3,5	28,0	3,3
	0,1	9,0	0,7	26,4 ^a	2,3	17,4 ⁺	2,1
	1,0	9,9	0,4	23,6	1,0	13,7 ⁺	1,2
	10,0	9,9	0,3	14,1	0,6	4,2 ⁺	0,6
2-kyan-1- -[(2-methoxy- -6-karboxypy- ridin-3-yl)- methyl]-azi- ridin	0,01	9,5	0,7	27,2	1,1	17,7 ⁺	1,3
	0,1	9,2	0,4	22,2	1,1	13,0 ⁺	1,1
	1,0	10,2	0,6	24,2	1,3	14,0 ⁺	1,2
	10,0	10,2	0,5	21,6	0,9	11,4 ⁺	0,6

pokračování tabulky 2

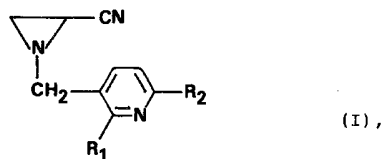
Látka	Dávka mg/kg	Hmotnost lymfatických uzlin (mg x 10 ⁻¹)					
		syngen		allogen		Δ	
		$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
2-kyan-1-	0,01	10,7	0,6	29,1	1,3	18,1 ⁺	1,2
-[(2-methoxy-	0,1	9,6	0,5	21,9	1,1	12,2 ⁺	0,9
-6-hydroxyme-	1,0	10,5	0,5	21,5	1,0	11,0 ⁺	0,8
thylpyridin-	10,0	11,0	0,4	20,9	1,0	9,9 ⁺	0,9
-3-yl)methyl]-							
aziridin							

+ $p \leq 0,05$ pokusný t-test

Srovnání (tabulka 2) ukazuje, že 2-kyan-1-[(2-methoxy-6-karboxypyridin-3-yl)-methyl]-aziridin a 2-kyan-1-[(2-methoxy-6-hydroxy-methylpyridin-3-yl)-methyl]-aziridin mají 10násobně vyšší účinek než ciamexon.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy derivátů N-substituované aziridin-2-karboxylové kyseliny obecného vzorce I



kde

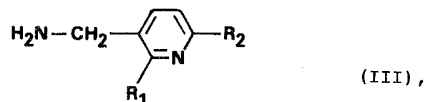
R_1 znamená alkokyskupinu s 1 až 2 atomy uhlíku,

R_2 znamená hydroxymethylový, karboxylový, alkoxykarbonylový s 1 až 2 atomy uhlíku nebo formylový zbytek, a jejich farmakologicky nezávadných solí,

vyznačený tím, že se nechá reagovat sloučenina obecného vzorce II



kde Hal_2 znamená chlor nebo brom,
s aminem obecného vzorce III



kde R_1 a R_2 mají výše uvedený význam, a potom se získané sloučeniny obecného vzorce I přemění na sloučeniny, kde R_2 značí hydroxymethyl a formyl, tím způsobem, že se sloučeniny, kde R_2 značí karboxyl, nechají reagovat s redukčním činidlem jako například borohydridem sodným a případně se převedou sloučeniny obecného vzorce I na farmakologicky nezávadné soli.