



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 140667

(51) Int. Cl.² C 07 D 233/95

(21) Patentsøknad nr. 742237

(22) Inngitt 19.06.74

(23) Løpedag 19.06.74

(41) Alment tilgjengelig fra 27.12.74

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 09.07.79

(30) Prioritet begjært 22.06.73, 18.04.74, USA, nr. 372567, 461821

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive nitroimidazolderivater.

(71)(73) Søker/Patenthaver JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.,
Turnhoutsebaan 30,
B-Beerse,
Belgia.

(72) Oppfinner JAN HEERES, Turnhout,
JOSEPH HECTOR MOSTMANS, Antwerpen,
ROBERT MAES, Vosselaar,
alle: Belgia.

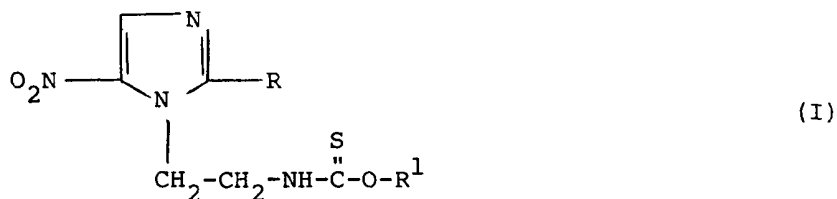
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner U.S.A. (US) patent nr. 3696116

Oppfinnelsen angår fremstillingen av N-(nitroimidazolyl-etyl)-tiokarbamatestere som har antiparasitisk virkning og derfor er egnet for bruk mot f.eks. protozo-parasittsykdommen trichomoniasis. De foreliggende forbindelser skiller seg fra forbindelsene i henhold til teknikkens stand bl.a. ved esterfunksjonens natur. Teknikkens stand kan representeres ved følgende henvisninger:

1. Arzneim.-Forsch. 20, 52 (1970),
2. US-patent nr. 3.520.899 og 3.646.027,
3. Britiske patenter nr. 1.253.002 og 1.264.937, og
4. Chem. Abstr. 73, 98950g (1970).

De foreliggende nye N-[2-(2-R-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]-tiokarbamter har følgende generelle formel:

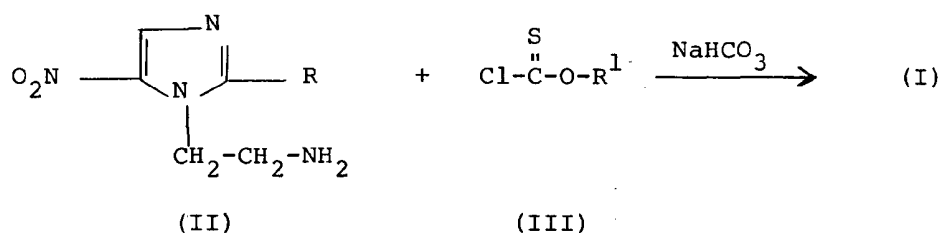


hvor R og R¹ er lavalkyl.

Terapeutisk aktive, ugiftige syreaddisjonssalter av ovenstående forbindelser (I) omfattes også av oppfinnelsen.

Ovenfor og i det følgende mener man med uttrykket "lavalkyl" rette eller forgrenede kjeder med 1-5 C-atomer, f.eks. metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, pentyl o.l. alkylgrupper.

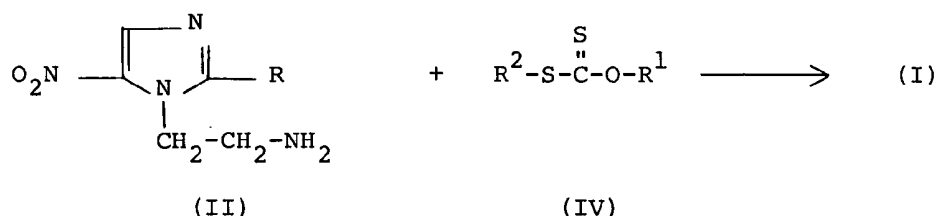
Forbindelser med formel (I) fremstilles på enkel måte ved å omsette en egnet aminoforbindelse med formel (II), hvor R har betydning som ovenfor, med et egnet halogentioformiat med formel (III), hvor halogenet er fortrinnsvis klor og R^1 har samme betydning som tidligere angitt, i et egnet inert oppløsningsmiddel som f.eks. et aromatisk hydrokarbon av typen benzen, toluen, xylen o.l., og et halogenert lavere hydrokarbon som metylenklorid, kloroform o.l. Vannoppløselige syreaddisjonssalter av (II), fortrinnsvis mineralsyresalter som hydrogenhalogenider, nitrater, sulfater o.l., kan også brukes, hvorved man kan benytte vann og vandige blandinger av ovenstående organiske forbindelser som oppløsningsmidler. Tilsetning av en base som f.eks. et alkalimetallkarbonat eller -bikarbonat til reaksjonsblandingen kan brukes med fordel for kombinasjon med den frigjorte syre. Ovenstående reaksjon kan illustreres med følgende reaksjonsskjema:



Basene med formel (I) kan omdannes til tilsvarende terapeutisk aktive, ugiftige syreaddisjonssalter ved omsetning med egnede uorganiske syrer som f.eks. saltsyre, hydrogenbromsyre, hydrogenjodsyre, svovelsyre, fosforsyre, salpetersyre o.l. syrer eller med egnede organiske syrer som eddiksyre, propionsyre, glykolsyre, melkesyre, oksalsyre, malonsyre, sulfaminsyre, p-toluensulfonsyre o.l. syrer. På sin side kan salter med formel (I) omdannes til tilsvarende frie baser ved kjent behandling med egnet alkali.

Forbindelser med formel (I) kan eventuelt fremstilles ved omsetning i et egnet oppløsningsmiddel, av et amin med formel (II) med en passende tiolester med formel (IV) der R^1 har den ovenfor angitte betydning og R^2 angir lavalkyl eller substituert lavalkyl. Foretrukne substituenten på nevnte substituerte lavalkylgrupper er ioniserbare grupper som karboksyl. Nærvær av slike

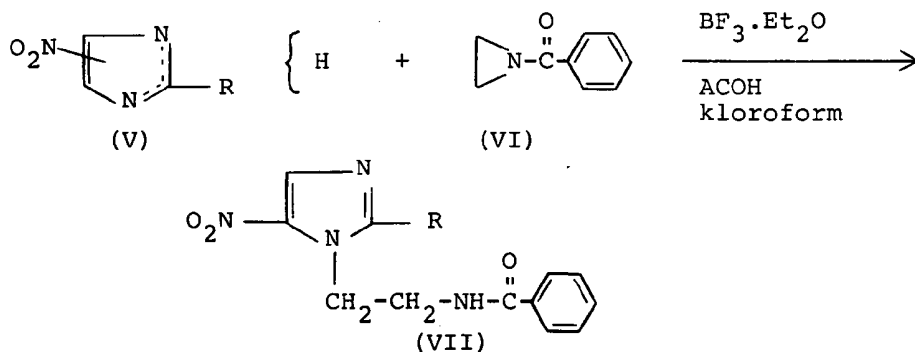
ioniserbare grupper har den fordel at reaksjonen da kan utføres i vandig medium og at tiolforbindelsen som frigjøres i løpet av reaksjonen lett opptas og bindes ved tilsetning av alkali, hvilket gjør at man kan unngå ubehagelig lukt som vanligvis oppstår med tioler. Forøvrig utføres reaksjonen med fordel i et egnet organisk oppløsningsmiddel som f.eks. lavalkanol, eksempelvis metanol, etanol, propanol o.l. alkoholer.



Utgangs-aminoforbindelsene med formel (II) kan enkelt fremstilles etter følgende tottrinns-reaksjonsskjema:

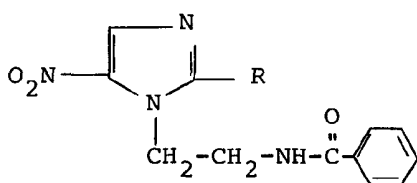
Trinn 1:

Et egnet nitroimidazol med formel (V) hvor R har betydning som tidligere angitt, omsettes med 1-benzoylaziridin (VI) i et egnet organisk oppløsningsmiddel som f.eks. et halogenert lavere hydrokarbon, eksempelvis diklormetan, kloroform o.l., fortrinnsvis surgjort med eddiksyre. Selv om det ikke er avgjørende, har man funnet det gunstig først å behandle nitroimidazol (V) med enten borfluoridmetyleter eller borfluoridetyleter og til det resulterende kompleks langsomt å tilsette 1-benzoylaziridin (VI). Reaksjonen mellom (V) og (VI) foretas fortrinnsvis ved lav temperatur, under 30°C og fortrinnsvis mellom -10 og +10°C.



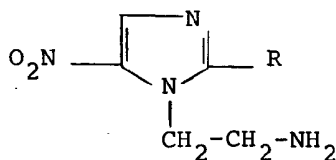
Trinn 2:

De fremstilte N-[2-(2-R-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]-benz-amider (VII) omdannes derpå til de tilsvarende aminoforbindelser med formel (II) med behandling med konsentrert mineralsyre, f. eks. hydrogenbromsyre eller saltsyre, fortrinnsvis under tilbake-løpskokning.



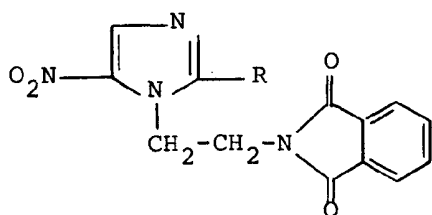
(VII)

48% HBr-oppløsning
 $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$



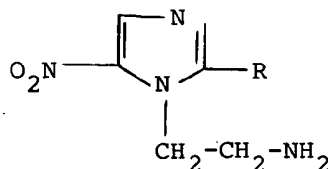
(II)

Alternativt kan forbindelser med formel (II) fremstilles ved lignende hydrogenbromsyrebehandling av analoge 2-[2-(2-R-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]-1,3-isoindolindioner (VIII).



(VIII)

48% HBr-oppløsning
 $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$



(II)

Nitroimidazolderivater med formel (I) og deres syreaddisjonsalter har antiparasitisk virkning, særlig antiprotozoisk virkning, f.eks. mot de sykdomsfremkallende organismer som for-

Nitroimidazolderivater med formel (I) og deres syreaddisjonsalter har antiparasitisk virkning, særlig antiprotozoisk virkning, f.eks. mot de sykdomsfremkallende organismer som forårsaker trichomoniasis, enterohepatitis og amoebiasis. Typiske sykdomsfremkallende organismer av denne type er *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas columbae*, *Histomonas meleagridis* og *Entamoeba histolytica*. Man vil naturligvis forstå at de aktuelle forbindelser har varierende effekt mot disse forskjellige organismer.

De foreliggende forbindelser er særlig egnet, som det fremgår av følgende forsøk, for behandling av protozосykdommen trichomoniasis som forårsakes av parasitter av slekten *Trichomonas*. De er virksomme mot den særlig vanskelige form for trichomoniasis med betegnelsen *T. vaginalis* vaginitis som forårsakes av infeksjon av vagina med *T. vaginalis*.

A. *Trichomonas vaginalis* hos mus:

Voksne mus infiseres kunstig ved subkutan injeksjon av 1×10^6 (± 100.000) levende *Trichomonas vaginalis* ved eksperimentets begynnelse (dag 0). Behandling med den aktuelle forsøksforbindelse startes samtidig med en oral standarddose på 160, 80, 40, 20, 10 eller 5 mg/kg kroppsvekt. Den valgte dose for hver gruppe av mus gjentas i fire fortløpende dager. Alle dyrene drepes på dag 7, og man bruker nærvær eller fravær av *Trichomonas* på injeksjonsområdet som et kriterium på forbindelsens effekt. Alle kontrolldyrene får saltvann istedenfor aktiv forbindelse og viser seg å være sterkt positive for *Trichomonas* 7 dager etter infeksjonen. Det har vist seg at ved orale doser på ca. 10-160 mg/kg blir dyrene negative (dvs. man finner ingen *Trichomonas* på injeksjonsområdet) etter behandling med fem gjentatte daglige doser av de aktuelle forbindelser.

B. *Trichomonas vaginalis* hos rotter:

På unge hunnrotter (midlere kroppsvekt 100 g) skjærer man ut ovariene og behandler rottene 10 dager deretter med 10 mg ovocyklin. 10 dager etter denne ovocyklinbehandling befinner rottene seg i pseudoøstrus, og på dette tidspunkt infiseres de intravaginalt med $3-4 \times 10^6$ levende *Trichomonas vaginalis* pr. rotte. Etter en uke fra dette, tas frisk vaginalutsondring som "kontroll" for å finne nærvær eller fravær av *Trichomonas*. De positive dyrene behandles så oralt med forbind-

elsen som undersøkes i standarddoser på 40, 20, 10, 5 og 2,5 mg/kg kroppsvekt, som gis fem fortløpende dager. Behandlingen stanses etter dette, og en uke senere tas en vaginalutsondring igjen som prøve og undersøkes for å finne nærvær eller fravær av Trichomonas. I henhold til disse prøver blir dyrene negative for Trichomonas ved doseringsnivåer på ca. 2,5-40 mg/kg.

C. Trichomonas columbae hos duer:

Voksne duer (midlere kroppsvekt 500 g) infiseres kunstig i kråsen med ca. 100.000 levende Trichomonas coumbae. Etter ca. en uke undersøkes mikroskopisk en slimhinneprøve fra larynx, og de dyr som er positive med hensyn på Trichomonas brukes for prøving av de aktuelle forbindelser. Behandlingen består i en enkelt eller fordelt (5 dager) orale doser av enten saltvann (kontrollprøve) eller en beregnet standarddose på 20, 10, 5 eller 2,5 mg/dyr av den aktuelle forbindelse. To uker etter behandlingen undersøkes igjen en prøve av slimhinnen mikroskopisk. Nærvær eller fravær av Trichomonas er et kriterium for legemidlets effekt. Generelt viser det seg at doser fra 2,5-2,0 mg/due i 5 fortløpende dager er nok for å drepe Trichomonas.

For behandling av T. vaginalis vaginitis kan de aktuelle forbindelser gis enten oralt eller topisk i form av farmasøytiske preparater, fortrinnsvis som doseringsenheter inneholdende en effektiv antiprotozoisk mengde av den spesielle forbindelse blandet med farmasøytiske bærestoffer. For oral bruk benyttes til doseringsenheter som tabletter, kapsler eller pulvere, vanligvis ca. 25-500 mg aktivt stoff, og fortrinnsvis 25-250 mg. Disse preparater fremstilles som kjent på området, og inneholder de vanlige fortynningsmidler, granuleringsmidler, drøyningsstoffer, fyllstoffer, smøremidler o.l. som man vet er tilfredsstillende for sammensetning av tabletter, kapsler og pulvere. Om ønsket, kan tablettene sukkerbelegges eller overtrekkes med et tarmbelegg etter kjente metoder. Alternativt kan de aktuelle stoffer gis oralt i flytende farmasøytiske media som oppløsninger, emulsjoner, siruper, eleksirer, suspensjoner o.l. som inneholder fortynningsmidler, smaksstoffer, konserveringsmidler, fargestoffer o.l. av den type som vanligvis brukes innen farmasien. Med slike flytende sammensetninger kan en doseringsenhet bestå av en teskje, spiseskje eller lignende. Man kan også bruke parenterale preparater hvor f.eks. et egnet bærestoff som sterilt

vann benyttes, særlig sammen med vannoppløselige salter av formel (I), selv om andre flytende injiserbare stoffer kan brukes, og dette gjelder også andre ingredienser som f.eks. skal gi oppløslighet til de aktuelle forbindelser eller benyttes som konserveringsmidler. Det er gunstig å gi forbindelsene oralt i doser på 25-100 mg/dag i enkle eller adskilte doser.

I tillegg til antiparasittvirkning for de aktuelle forbindelser hos *Trichomonas*, har de også vist seg effektive mot *Histomonas*. Enterohéptatis er en sykdom som hovedsakelig finnes hos kalkuner og forårsakes av protozoparasitten *Histomonas meleagridis*. Den kjennes også som "turkey blackhead disease" (kalkun-svarthodesykdom). Nitroimidazolderivater med formel (I) og deres salter egner seg til forhindring av og behandling av denne sykdommen, og gis for dette formål til kalkuner blandet med en förbestanddel som f.eks. för eller drikkevann. Selv om den optimale dose vil avhenge av den spesielle forbindelse og infeksjonsgraden, oppnås en god kontroll av enterohépatitis ved oral administrasjon til kalkunene av et för som inneholder fra 0,003 til ca. 0,1 vekt-% aktivt stoff. Når dette stoffet gis via drikkevannet, kan man bruke noe høyere prosentvise innhold, særlig for terapeutiske formål. For eksempel kan drikkevannet inneholde opptil 0,2 vekt-% aktivt stoff med gode resultater.

Den følgende forsøksprosedyre demonstrerer antiprotozo-virkningen hos de aktuelle forbindelser mot *Histomonas meleagridis* idet man tar økningen i kalkunens kroppsvekt som indikator på slik virkning. Unge kalkuner (3-4 uker gamle, 120-150 g kroppsvekt) infiseres rektalt (i cloaca) med 2 ml suspensjon inneholdende *Histomonas meleagridis* (dag 0). Suspensjonen fremstilles ved å gni ut leveren og begge caeca hos kunstig infiserte kalkuner i 50 ml saltvann. Alle dyrene settes i bur hver for seg og får mat og drikkevann ad libitum under eksperimentene. Maten består av innkjøpt kalkungrøtför som hverken inneholder förtilsetninger, coccidiostat eller andre medisinske stoffer. Den aktuelle forbindelsen blandes med föret til forskjellige konsentrasjoner (0,01, 0,02, 0,05, 0,1%) og gis til dyrene fra dag 2 til dag 9. Kroppsvektøkningen, förinntaket og mortaliteten noteres daglig. Man tar midlere økning av kroppsvekten (dvs. forholdet mellom kroppsvekt på dag 7 i forhold til kroppsvekt på dag 0) som et mål på forbindelsenes aktivitet, idet

kroppsvektøkningen for ikke-infiserte kontrolldyr på dag 7 sammenlignet med dag 0 er 160%, mens kroppsvektøkningen hos infiserte kontrolldyr i samme periode bare er 120%. Man anser at signifikante virkninger av forbindelsene foreligger hvis kroppsvektøkningen hos behandlede dyr på dag 7 er minst 150% sammenlignet med kroppsvekten på dag 0. Man har funnet at stoff-konsentrasjoner i fôret på ca. 0,01-0,1% muliggjør en vektøkning på 150% eller mer.

På bakgrunn av de aktuelle forbindelsenes antiparasitiske virkning, tilveiebringes en fremgangsmåte for inhibering av protozovekst som består i å administrere inert eller topisk til et varmblodig dyr infisert med protozo-organismer, et farmasøytisk preparat, fortrinnsvis i doseringsenheter, inneholdende en effektiv antiprotozomengde av et nitroimidazolderivat med formel (I) eller deres terapeutisk aktive syreaddisjonssalter, i blanding med farmasøytiske bærestoffer.

Eksempel I

En blanding av 8 deler 1-(2-aminometyl)-2-etyl-5-nitroimidazoldihydrobromid, 4,2 deler O-metylklortioformat, 4,4 deler natriumkarbonat, 20 deler vann og 75 deler kloroform ble omrørt i 4 timer i isbad. Reaksjonsblandingen vaskes to ganger med vann, filtreres, og oppløsningsmidlet fjernes i vakuum. Residuet oppløses i benzen og produktet ekstraheres med 50 deler 5N saltsyreoppløsning (3 ganger). Det hele vaskes med benzen, og den sure vannfasen nøytraliseres med natriumhydrogenkarbonat. Produktet ekstraheres med kloroform. Ekstraktet tørkes, filtreres og inndampes. Residuet krystalliseres fra toluen (aktivkull) som gir rå O-metyl-N-[2-(2-etyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]-tiokarbamat. Denne fraksjon oppløses i kloroform, omrøres med silikagel, filtreres og oppløsningsmidlet inndampes i vakuum. Residuet krystalliseres fra 2-propanol, som gir O-metyl-N-[2-(2-etyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbamat, smeltepunkt 134,9°C.

Eksempel II

Man gjentar fremgangsmåten fra eksempel I bortsett fra at 1-(2-aminometyl)-2-metyl-5-nitroimidazoldihydrobromid, og det anvendte metylklorformiat ble erstattet med en ekvivalent mengde av et egnet 1-(2-aminometyl)-2-R-5-nitroimidazol og R¹-klortioformiat, hvilket ga de tilsvarende forbindelser med formel (I), etter gjennomføring av kondensasjonsreaksjonen i det angitte solventsysttem:

Med en blanding av vann og diklormetan som reaksjonsmedium ble følgende forbindelser fremstilt:

O-metyl-N-[2-(2-metyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt $142,4^{\circ}\text{C}$,

O-etyl-N-[2-(2-metyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt $167,5^{\circ}\text{C}$,

O-metyl-N-[2-(2-isopropyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt $126,1^{\circ}\text{C}$, og

O-etyl-N-[2-(2-isopropyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt $120,2^{\circ}\text{C}$.

De følgende forbindelser ble fremstilt i en blanding av vann og triklormetan:

O-etyl-N-[2-(2-etyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt $118,6^{\circ}\text{C}$,

O-metyl-N-[2-(2-propyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt $113,4^{\circ}\text{C}$,

O-metyl-N-[2-(2-pentyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt $121-124^{\circ}\text{C}$, og

O-metyl-N-[2-(2-butyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt 111°C .

Eksempel III

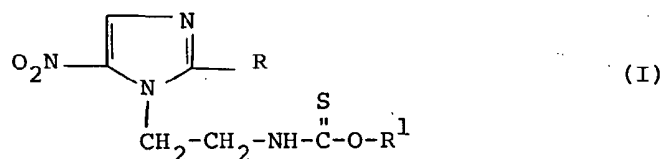
Til en omrørt blanding av 5,8 deler O-metyl-S-metyltioformat og 80 deler metanol settes 5,1 deler 1-(2-aminoetyl)-2-metyl-5-nitroimidazol, og dette omrøres ved romtemperatur i 48 timer. Reaksjonsblandingen dampes inn og residuet gnis ut i 100 deler vann. Produktet filtreres fra og krystalliseres fra 2-propanol, hvilket gir 3 deler O-metyl-N-[2-(2-metyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]tiokarbat, smeltepunkt $147,5^{\circ}\text{C}$.

Eksempel IV

En oppløsning av 10 deler O-metyl-N-[2-(2-metyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]-2-tiokarbat i 140 deler aceton surgjøres med overskudd av 2-propanol som på forhånd er mettet med gassformig hydrogenklorid, ved romtemperatur. Etter henstand i 1 time ved romtemperatur, felles hydrokloridsaltet ut. Dette filtreres fra, vaskes med aceton og tørkes i vakuum ved 40°C og gir O-metyl-N-[2-(2-metyl-5-nitro-1-imidazolyl)etyl]-2-tiokarbat-hydroklorid, smeltepunkt $163,9^{\circ}\text{C}$.

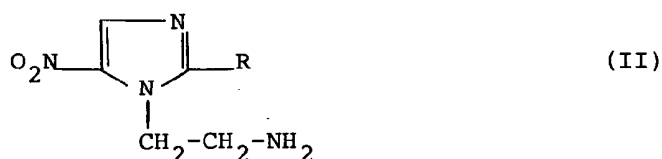
P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive nitroimidazolderivater med formelen:



og deres terapeutiske syreaddisjonssalter, hvor R og R¹ angir lavalkyl, k a r a k t e r i s e r t v e d a t m a n

(1) omsetter en forbindelse med formel:



med en forbindelse med formelen:



i et egnet inert organisk oppløsningsmiddel, fortrinnsvis i nærvær av en base, eller

(2) med en forbindelse med formelen:



i et egnet oppløsningsmiddel, hvor R² betegner eventuelt substituert lavere alkyl,

og om ønsket, fremstiller terapeutisk aktive syreaddisjonssalter ut fra produkter fremstilt som ovenfor.