



URAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

195692
(11) (B2)

[51] Int. Cl.³
C 07 D 237/32

(22) Přihlášeno 30 10 74

(21) [PV 7405-74]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 31 10 73
[121758 a 121759] Japonsko

(40) Zveřejněno 31 05 79

(45) Vydáno 15 03 83

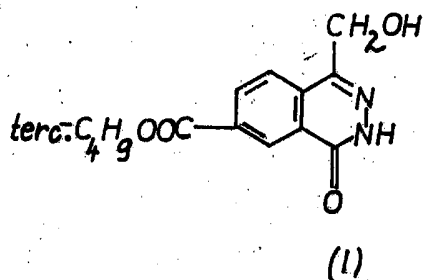
(72) (73)
Autor vynálezu
a současně
majitel patentu

INOUE MICHIO, ISHIKAWA MASAYUKI,
TSUCHIYA TAKASHI a SHIMAMOTO TAKIO, TOKIO (Japonsko)

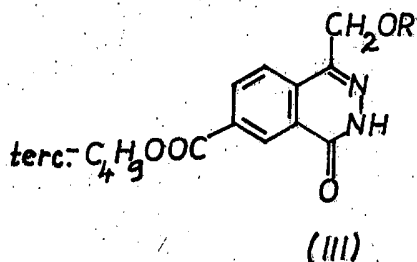
(54) Způsob výroby farmaceuticky účinného derivátu 1-ftalazonu

1

Předmětem vynálezu je způsob výroby farmaceuticky cenného 7-terc.butoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazonu vzorce I



Tento způsob spočívá v tom, že se hydrolyzuje sloučenina obecného vzorce III

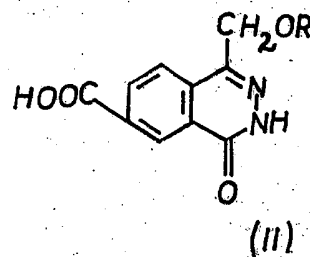


kde

R znamená acetylovou, propionylovou nebo benzoylovou skupinu.

2

Sloučeninu obecného vzorce III je možno připravit reakcí sloučeniny obecného vzorce II



kde

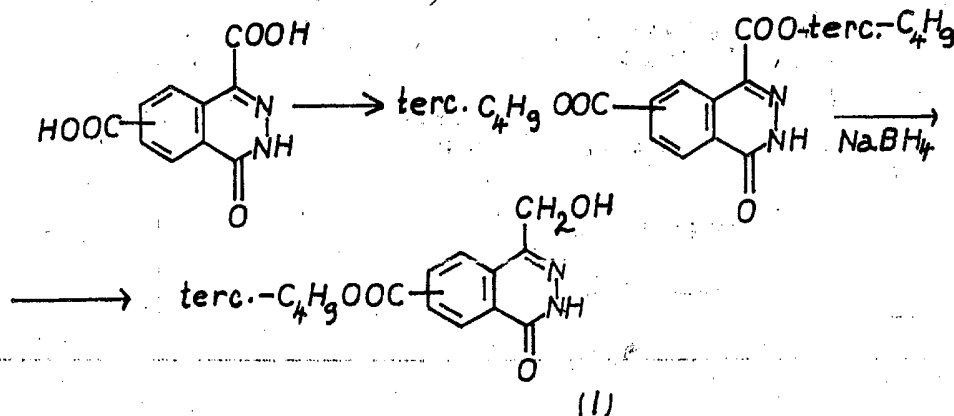
R má výše uvedený význam, s isobutylem v přítomnosti katalyzátoru, nebo přeměnou sloučeniny obecného vzorce II v příslušný 7-halogenid kyseliny, který se pak nechá reagovat s terc.butanolem v přítomnosti katalyzátoru.

V belgickém patentovém spisu 787 139 se uvádí, že alkoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon se vyznačuje cennými vlastnostmi pro léčení krvácení, trombózy a aterosklerózy. Další studium metabolických cest u zvířat a klinické zkoušky se 7-ethoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazonem ukázaly, že se tato sloučenina při aplikaci zvířa-

xysloučeninu, s tím výsledkem, že trvání biologického účinku této sloučeniny je poměrně krátké. Bylo zjištěno, že 7-terc.butoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon odolává metabolické degradaci a má ve srovnání s příslušnými alkoxykarbonylovými tům nebo lidem mění v příslušnou 7-karbo-

sloučeninami s přímým řetězcem déle trávající biologické účinky.

Derivát terc.butoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazonu je možno připravit reakcí popsanou ve výše uvedeném belgickém patentovém spisu, kterou je možno schematicky znázornit takto:



Při tomto postupu se 4-karboxylová skupina, která se má přeměnit v hydroxymethylovou skupinu, nevyhnutelně esterifikuje za vzniku terc.-butoxykarbonylové skupiny, která se nakonec odštěpí. Vzhledem k okolnosti, že komerční příprava terc.butylesterů je složitá a nákladná, je způsob, popsaný ve výše uvedeném patentovém spisu, komerčně nevýhodný, pokud jde o výše uvedené reakční schéma.

Nyní bylo zjištěno, že požadovanou 1-ftalazonovou sloučeninu je možno v technickém měřítku připravit výhodněji než až dosud známými postupy tím, že se postupem popsaným ve výše uvedeném patentovém spisu nejprve připraví ethoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon, který se pak zhydrolyzuje a acyluje, a vzniklá sloučenina obecného vzorce II se pak přemění ve svůj terc.butylester obecného vzorce III, který se pak zhydrolyzuje způsobem podle vynálezu.

Sloučenina vzorce I je účinná pro prevenci atherosklerózy a pro inhibici ukládání cholesterolu na stěnách tepen, jak bylo zjištěno při pokusné atheroskleróze, vyvolané podáváním cholesterolu; její účinek je zhruba třikrát větší než účinek příslušného ethoxykarbonylového derivátu. Sloučenina, získaná způsobem podle vynálezu, rovněž zabraňuje zvýšení koagulovatelnosti a trombogenicity krve, vyvolanému cholesterolem nebo adrenalinem; tento její účinek je rovněž zhruba pětikrát větší než účinek příslušného ethoxykarbonylového derivátu. Sloučenina, vyrobená způsobem podle vynálezu, tím účinněji zabraňuje zkrácení doby srážení krve, jakož i zvýšenému shlukování krevních destiček u lidí, vyvolanému adenosin-difosfátem.

Dále bylo zjištěno, že sloučenina vyrobená způsobem podle vynálezu, je účinná pro snižování a normalizování zvýšeného krev-

ního tlaku při testu na hypertenzi u spontánně hypertenzních krys, zatímco příslušný ethoxykarbonylový derivát nemá žádný výrazný účinek na zvýšený krevní tlak krys. Tato účinnost sloučeniny, získané způsobem podle vynálezu, je pravděpodobně ve spojitosti s jejím inhibičním účinkem na cyklickou AMP-fosfodiesterázu, který je doložen v dále uvedených biologických testech.

Sloučenina, získaná způsobem podle vynálezu, je tedy účinná pro léčení vyššího krevního tlaku, atherosklerotických a trombotických onemocnění. Je rovněž popřípadě vhodná pro léčení nemocí, vyvolaných špatnou funkcí cyklické AMP; příklady takovýchto nemocí jsou rakovina, mentální a neurologické obtíže, hormonální poruchy a selhání činnosti srdečního svalu.

Výchozí sloučeniny, použité při způsobu podle vynálezu, je možno připravit ze sloučenin popsaných v belgickém patentovém spisu 787 139. Například hydrolýzou 7-ethoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazonu, popsaného ve výše uvedeném patentovém spisu, a následnou acylací acylanhydridem nebo chloridem podle známého postupu se získá 4-acyloxymethyl-7-karboxy-ftalazon, odpovídající sloučenině obecného vzorce II. Vhodnou acylovou skupinou je acetylová skupina.

Reakce sloučeniny obecného vzorce II s isobutylenem se může provádět v přítomnosti rozpouštědla, jako je dioxan nebo tetrahydrofuran. Isobutylen se s výhodou použije ve větším množství než je ekvimolární a jako katalyzátoru pro tuto reakci se výhodně použije koncentrované kyseliny sírové. Reakční směs, výhodně umístěná ve vysokotlaké nádobě nebo reaktoru, se míchá při teplotě v rozmezí od 0 do 60 °C.

Reakce 7-halogenidu kyseliny s terciárním butanolem se může provádět bez rozpouštědla za použití nadbytku bezvodého

terciárního butanolu. K reakční směsi je možno s výhodou přidat katalyzátor nebo dehydrochlorační činidlo, například dimethylanilin, diethylanilin, pyridin, kolidin nebo hořčík. Reakce se s výhodou provádí při teplotě v rozmezí od 0 do 150 °C, zejména při teplotě varu terciárního butanolu.

Acylová skupina takto získané sloučeniny obecného vzorce III se odstraní známým postupem, tj. částečnou hydrolýzou malým nadbytkem zásady, jako je hydroxid draselný nebo uhlíčitý draselný, za vzniku sloučeniny vzorce I.

Produkty, získané výše uvedenými postupy, je možno snadno izolovat a přechistit obvyklými způsoby, jak je to doloženo v dále uvedených příkladech.

Sloučenina, připravená způsobem podle vynálezu, se může aplikovat samotná nebo může tvořit složku farmaceutických prostředků, jako jsou prášky, tablety, granule, tobolky, pastilky, suspenze a jiné dávkovací formy pro orální aplikaci, a roztoky, suspenze a jiné dávkovací formy pro parenterální aplikaci. Účinné množství sloučeniny vzorce I je možno snadno měnit podle zamýšlené dávky, avšak obvykle činí 0,1 až 80 % celkového množství nosiče nebo ředidla a sloučeniny vzorce I. Z toho plyne, že sloučenina vyrobená způsobem podle vynálezu, se může používat v jakékoliv požadované koncentraci, nutné pro aplikaci při dávkách 1 až 100 mg/kg tělesné hmotnosti denně.

Nosičem nebo ředidlem může být farmaceuticky vhodná kapalina nebo tuhá látka; výrazem „nosič“ se zde rovněž označují součásti léků, které zesilují účinek vlastního léčiva. Příklady kapalného nosiče jsou destilovaná voda pro injekce, isotonický roztok chloridu sodného, Ringerův roztok, Lockeův roztok, polyethylenglykol, ethylalkohol, propylenglykol, glycerol a rostlinný olej. Pevným nosičem může být například chlorid sodný, glukóza, laktóza, škrob, sacharóza, cetylalkohol, kakaové máslo a vorvanina.

Dále uvedené příklady vynález blíže osvětluje, aniž by však omezovaly jeho rozsah.

Příklad 1

Příprava 4-acetoxymethyl-7-terc.butoxykarbonyl-1-ftalazonu

1. Do tlakové skleněné trubice se vnese 1,2 g 4-acetoxymethyl-7-karboxy-1-ftalazonu o teplotě rozkladu 252 až 253 °C a 50 ml dioxanu, načež se trubice ochladí směsí suchého ledu a acetonu. Do trubice se vnese 12 ml isobutylenu a pak 4 ml koncentrované kyseliny sírové za míchání magnetickým míchadlem. Po uzavření trubice se její obsah míchá po 10 hodin při teplotě místnosti. Po této době se obsah vlije do 10% vodného roztoku uhlíčitanu sodného a směs se

pak extrahuje ethylacetátem. Extrakt se vysuší síranem hořečnatým a odpaří. Zbytek se překrystaluje z ethanolu, čímž se získá 760 mg 4-acetoxymethyl-7-terc.butoxykarbonyl-1-ftalazonu o teplotě tání 202 až 203 °C.

IR spektrum (KBr cm^{-1}): 1740, 1720, 1660, 1360, 1295, 1240, 1160, 1120 a 1035.

2. Směs 2 g 4-acetoxymethyl-7-karboxy-1-ftalazonu a 20 ml destilovaného thionylchloridu se po 3 hodiny mírně zahřívá při teplotě 70 až 80 °C. Nadbytek thionylchloridu se odstraní za sníženého tlaku, načež se ke zbytku přidá 10 ml bezvodého benzenu. Benzen se opět odstraní za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí ve 30 ml bezvodého terc.butanolu. Za míchání se k roztoku přidá 2,2 ml dimethylaminu a směs se zahřívá pod zpětným chladičem po 30 hodin bez přístupu vlhkosti. Rozpouštědlo se pak odstraní za sníženého tlaku a získaný zbytek se zalkalizuje vodným roztokem uhlíčitanu sodného. Směs se extrahuje ethylacetátem, extrakt se vysuší a rozpouštědlo se odstraní. Zbytek se překrystaluje z ethanolu, čímž se získá 1,2 g 4-acetoxymethyl-7-terc.butoxykarbonyl-1-ftalazonu o teplotě tání 202 až 203 °C.

IR spektrum je shodné s IR spektrem sloučeniny, získané podle odst. 1.

Příprava 7-terc.butoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazonu

K roztoku 1,8 g hydroxidu draselného ve 150 ml ethanolu se přidá 3,4 g 4-acetoxymethyl-7-terc.butoxykarbonyl-1-ftalazonu. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po 3 hodiny, načež se nasýtí kyslíčným uhlíčkem. Pak se reakční směs zahustí za sníženého tlaku a obsah baňky se vlije do vody a extrahuje ethylacetátem. Extrakt se vysuší a rozpouštědlo se odstraní. Zbytek se překrystaluje ze směsi ethanolu a n-hexanu, čímž se získá 2,8 g 7-terc.butoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazonu, o teplotě tání 270 až 272 °C.

IR spektrum (KBr, cm^{-1}): 3500 (široký), 1730, 1660, 1370, 1310, 1270, 1162, 1130, 1030;

hmotové spektrum, m/e 276, (M^+), 220, 203, 191.

Biologické testy

1. Inhibiční účinek sloučeniny, získané způsobem podle vynálezu, na shlukování destiček v plazmě lidské krve *in vitro*

Sloučenina, získaná způsobem podle vynálezu, má výrazný inhibiční účinek na shlukování destiček v plazmě lidské krve, vyvolané ADP (adenosin-difosfátem), nebo adrenalinem *in vitro*.

Vzorky lidské CPRP (citrátová plazma s vysokým obsahem destiček) se inkubují při

teplotě 37 °C po 200 sekund, s fyziologickým roztokem, obsahujícím různá množství zkoumané sloučeniny, přičemž objem tohoto roztoku je 0,1 objemu vzorku CPRP. Ke směsi se pak přidají 3 μ moly ADP nebo 1 μ g/ml adrenalinu. Intenzita primárního a sekundárního shlukování se měří měřičem shlukování destiček (Chrono-Log, model 300).

U každého z výše uvedených vzorků, který byl inkubován se zkoumanou sloučeninou, se intenzita shlukování destiček, vyvolaného ADP nebo adrenalinem, porovnává s intenzitou shlukování u téhož vzorku, inkubovaného s fyziologickým roztokem. Tento poměr se vyjádří v procentech, přičemž se jako 100 % bere intenzita shlukování vyvolaného roztokem, který byl inkubován s fyziologickým roztokem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce I.

Intenzita primárního a sekundárního shlukování destiček se měří metodou, popsanou H. Jamazakim, T. Sanoem a kol. v článku „Platelet Functions in Thromboem-

bolic Disorders“ časopisu „Thrombosis et Diatheses Haemorrhagica“ a v odkazech uvedených v tomto článku.

Jak je zřejmé z tabulky I, inhibuje sloučenina, připravená způsobem podle vynálezu, primární shlukování vyvolané ADP nebo adrenalinem s přibližně srovnatelnou účinností jako 4-hydroxymethyl-1-ftalazon, popsany v belgickém patentovém spisu č. 789 138, a 7-ethoxy-karbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon, popsany v belgickém patentovém spisu 789 139. Sloučenina, získaná způsobem podle vynálezu, však inhibuje sekundární shlukování ve srovnání s výše uvedenými sloučeninami mnohem účinněji. Sloučenina, získaná způsobem podle vynálezu, totiž inhibuje sekundární shlukování, vyvolané ADP nebo adrenalinem, statisticky významně v koncentraci 1 až 2,5 μ g/ml, zatímco 7-ethoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon inhibuje sekundární shlukování v koncentraci teprve 5 až 10 μ g/ml.

TABULKA I:

Inhibiční poměr proti shlukování destiček v plazmě lidské krve *in vitro*

Inkubováno s	$\mu\text{g/ml}$	Počet případů	ADP 3 μmoly		Počet případů	Adrenalin 1 $\mu\text{g/ml}$ sekundární	
			primární	sekundární		primární	sekundární
kyselinou acetyl- salicylovou (kontrola)	300	10	108,9 $\pm$ 3,6	75,5 $\pm$ 5,9 ⁺⁺	10	107,5 $\pm$ 2,6	62,7 $\pm$ 10,7 ⁺⁺
	80	10	95,7 $\pm$ 1,8	70,2 $\pm$ 10,1 ⁺	10	95,6 $\pm$ 5,2	46,6 $\pm$ 7,9 ⁺⁺
	40	10	98,9 $\pm$ 3,4	78,0 $\pm$ 9,9	10	105,7 $\pm$ 3,3	45,0 $\pm$ 7,8 ⁺⁺
4-hydroxymethyl- -1-ftalazonem (kontrola)	300	10	84,5 $\pm$ 2,0 ⁺	68,3 $\pm$ 3,8 ⁺	10	85,4 $\pm$ 3,1 ⁺	60,2 $\pm$ 8,0 ⁺
	80	10	82,4 $\pm$ 3,2	64,9 $\pm$ 6,7	10	92,3 $\pm$ 6,0	69,2 $\pm$ 7,2
	40	10	86,2 $\pm$ 2,5	72,0 $\pm$ 6,8	10	98,8 $\pm$ 5,9	85,9 $\pm$ 10,1
7-ethoxykarbonyl- -4-hydroxymethyl- -1-ftalazonem (kontrola)	80	10	62,9 $\pm$ 5,0 ⁺⁺	15,7 $\pm$ 0,4 ⁺⁺	10	81,9 $\pm$ 6,5 ⁺	33,0 $\pm$ 7,1 ⁺⁺
	20	14	77,0 $\pm$ 5,1 ⁺⁺	58,6 $\pm$ 7,6 ⁺⁺	10	92,9 $\pm$ 16,9	71,7 $\pm$ 13,5 ⁺
	10	14	81,9 $\pm$ 5,2 ⁺⁺	67,1 $\pm$ 6,3 ⁺⁺	10	97,0 $\pm$ 4,1	82,1 $\pm$ 9,5
	5	14	90,5 $\pm$ 5,6	84,9 $\pm$ 6,3 ⁺	10	105,8 $\pm$ 6,9	80,8 $\pm$ 13,9
7-terc.butoxykarbonyl- -4-hydroxymethyl- -1-ftalazonem (podle vynálezu)	40	10	72,3 $\pm$ 5,4	57,5 $\pm$ 3,0	10	—	—
	20	10	88,6 $\pm$ 7,6	57,0 $\pm$ 5,9 ⁺⁺	10	102,8 $\pm$ 7,9	102,2 $\pm$ 12,4
	10	10	87,2 $\pm$ 5,8	51,4 $\pm$ 6,1	10	96,5 $\pm$ 8,2	63,6 $\pm$ 13,2 ⁺⁺
	5	12	90,1 $\pm$ 7,8	62,3 $\pm$ 5,8 ⁺⁺	10	94,6 $\pm$ 4,5	65,5 $\pm$ 6,8
	2,5	10	92,5 $\pm$ 8,0	98,1 $\pm$ 8,3	10	98,8 $\pm$ 4,7 ⁺⁺	69,2 $\pm$ 7,2 ⁺⁺

+ B < 0,05

++ P < 0,01

Inhibiční poměr = $\frac{\text{intenzita shlukování CPRP, inkubováno se zkoumanou sloučeninou}}{\text{intenzita shlukování CPRP, inkubováno s fyziologickým roztokem}}$

2. Inhibiční účinek sloučeniny, získané způsobem podle vynálezu, na cyklickou AMP-fosfodiesterázu ve stěně aorty králíka a v destičkách v plazmě lidské krve.

Sloučenina, připravená způsobem podle vynálezu, se vyznačuje výrazným inhibičním účinkem proti cyklické AMP-fosfodiesteráze ve stěně aorty králíka a v destičkách v plazmě lidské krve.

Kapalina nad homogenizačním materiálem z vnitřní a střední vrstvy stěny aorty králíka nebo z lidské plazmy s vysokým obsahem destiček se inkubuje s reagenční směsí, sestávající z cyklického AMP (adenosin-3',5'-cyklického monofosfátu), značeného tritiem a z různých množství zkoumané sloučeniny.

TABULKA II

Sloučenina	Iso (μ moly)		
	destičky (lidské)	vnitřní vrstva (králík)	střední vrstva (králík)
7-ethoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon (kontrola)	57	52	144
theofyllin (kontrola)	91	127	155
kofein (kontrola)	350	—	460
7-terc.butoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon (podle vynálezu)	22	13,4	48

Tento test se provádí podle postupu popsaného H. Hidakaem a M. Shibuyaem, v článku „A New Assay of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase and its Application to Humans“, který vyjde v časopisu *Biochemical Medicine*.

3. Hypotenzivní účinek sloučeniny získané způsobem podle vynálezu u spontánně hypertenzivních krys

Sloučenina, získaná způsobem podle vynálezu, má jedinečný hypotenzivní účinek na spontánně hypertenzivní krysy. Spontánně hypertenzivní krysy (SH-krysy) se získají selektivním výběrem spontánně hypertenzivních krys a kontinuálním chovem s hypertenzivními zvířaty opačného pohlaví; je možno je považovat za geneticky hypertenzivní. Hypertenze spontánně hyperten-

zovaných směs se přečistí chromatograficky na sloupci a frakce obsahující nukleotidy se kvantitativně analyzuje počítačem pro kapalinovou scintilaci.

Z tabulky II je patrný inhibiční účinek těchto sloučenin na cyklickou AMP-fosfodiesterázu. Číselné údaje v tabulce značí množství zkoumané sloučeniny, jehož je třeba k dosažení 50% inhibice cyklické AMP-fosfodiesterázy.

Jak je zřejmé z tabulky II, je sloučenina, získaná způsobem podle vynálezu mnohem účinnější pro inhibici difosfoesterázy než theofyllin, kofein nebo až dosud známé sloučeniny. Znamená to, že sloučenina získaná způsobem podle vynálezu, je účinná pro zvyšování koncentrace cyklické AMP v destičkách a ve stěně.

sivních krys je výrazně podobná esenciální hypertenzi u lidí; proto byla tato zvířata použita k testům na toto onemocnění.

Znamé sloučeniny 4-hydroxymethyl-1-ftalazon a 7-ethoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon se nevyznačují významným hypotenzivním účinkem v intraperitoneálních nebo orálních dávkách až do 50 mg/kg. Naproti tomu má sloučenina, získaná způsobem podle vynálezu, výrazný hypotenzivní účinek v dávkách 0,78 až 50 mg/kg při intraperitoneální nebo orální aplikaci, jak je zřejmé z tabulky IIIb.

Při zkoušce krevního tlaku se použije SH-krys, každé o hmotnosti 210 až 250 g a ve stáří 13 až 15 týdnů; zkoumané sloučeniny se aplikují intraperitoneálně. Každá z hodnot, uvedených v tabulkách IIIa a b, je průměrem z hodnot, zjišťovaných u tří krys.

TABULKA IIIa

Sloučenina (dávka: 50 mg/kg)		Krevní tlak doba od aplikace sloučeniny h					
		před	1	3	6	24	48
4-hydroxymethyl- -1-ftalazon	krevní tlak	183	178	179	180	182	184
7-ethoxykarbonyl- -4-hydroxymethyl- -1-ftalazon	krevní tlak	178	165	176	180	179	184

TABULKA IIIb

Sloučenina: 7-terc.butoxykarbonyl-4-hydroxymethyl-1-ftalazon

Dávka mg/kg		Krevní tlak a snížení, % doba od aplikace sloučeniny h					
		před	1	3	6	24	48
50	krevní tlak	183	165	165	143	173	168
	snížení %		9,8	9,8	21,9	5,5	8,2
12,5	krevní tlak	178	177	158	140	160	167
	snížení %		0,6	11,2	21,4	10,1	6,2
3,1	krevní tlak	187	183	167	140	173	183
	snížení %		2,1	10,7	25,1	7,5	2,1
0,78	krevní tlak	190	180	163	163	180	188
	snížení %		5,3	14,2	14,2	5,3	1,1

4. Zkoušky toxicity

Výsledky zkoušek toxicity (LD₅₀) sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu, jsou uvedeny v tabulce IV v porovnání se

zápornými sloučeninami. Tyto zkoušky se provádějí na myších orální aplikací. Zkoušky toxicity ukazují, že tato sloučenina je srovnatelně netoxická.

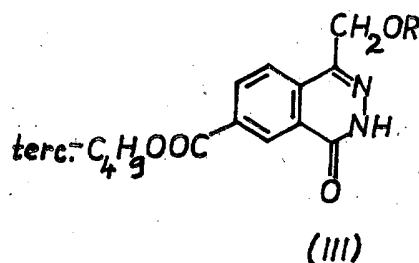
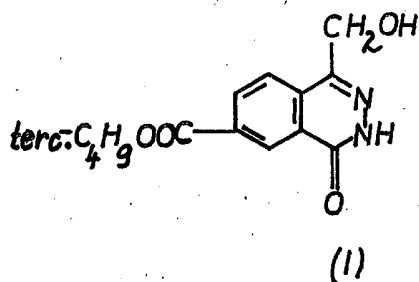
TABULKA IV

Sloučenina	LD ₅₀ (mg/kg)
4-hydroxymethyl-1-ftalazon	[známá] 4,000
7-ethoxykarbonyl-4-hydroxymethyl- -1-ftalazon	[známá] 5,000
7-terc.butoxykarbonyl-4-hydroxy- methyl-1-ftalazon	[podle vynálezu] 4,600

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby farmaceuticky účinného derivátu 1-ftalazonu vzorce I

vyznačující se tím, že se hydrolyzuje sloučenina obecného vzorce III



kde

R znamená acetylovou, propionylovou nebo benzoylovou skupinu.