



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) ÚTLEGNINGSSKRIFT Nr. 146397

(51) Int. Cl.³ C 07 D 417/06, 417/14

(21) Patentsøknad nr. 763400

(22) Inngitt 05.10.76

(24) Løpedag 05.10.76

(41) Alment tilgjengelig fra 13.04.77

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 14.06.82

(30) Prioritet begjært 07.10.75, 09.09.76, Forbundsrepublikken Tyskland,
nr. P 25 44 702, P 26 40 504

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte til fremstilling av terapeutisk aktive nitroimidazolylvinyltiadiazoler.

(71)(73) Søker/Patenthaver BASF AKTIENGESELLSCHAFT,
Carl-Bosch-Str. 38,
D-6700 Ludwigshafen am Rhein,
Forbundsrepublikken Tyskland.

(72) Oppfinner HELMUT FLEIG, Mannheim,
HELMUT HAGEN, Frankenthal,
TONI DOCKNER, Meckenheim,
FRIEDRICH WILHELM KOHLMANN, Moorrege,
Forbundsrepublikken Tyskland.

(74) Fullmektig Cand.mag. Johan H. Gørbitz,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Norsk (NO) utl. skrift nr. 135420
BRD (DE) off. skrift nr. 2329653

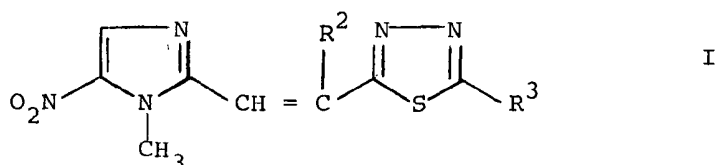
146397

1

Oppfinnelsens gjenstand er fremstillingen av nitroimidazolylvinyltiadiazoler, som anvendes som kjemoterapeutica til behandling av mikrobielle infeksjoner hos mennesker og dyr.

Det er kjent at nitroheterocykliske forbindelser, såsom nitrofuraner, nitrotiazoler eller nitroimidazoler, er virksomme midler mot bakterier, sopp og protozoer. De minimumskonsentrasjoner som virker hemmende i kjente preparater, eksempelvis "Metronidazol" eller "Tinidazol", ligger i størrelsesorden mellom 0,1 og 2 $\mu\text{g/ml}$. Deres virkning og forlikelighet er imidlertid ikke alltid tilfredsstillende. Det foreligger derfor et ønske om å syntetisere nye substanser med bedre virkning.

Det ble nå funnet at forbindelser med formelen I



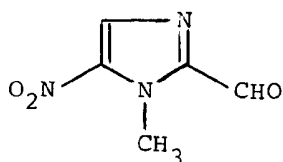
hvor R^2 betyr hydrogen eller metyl, og R^3 betyr hydrogen, metyl, etyl, fenyl eller pyridyl, oppviser verdifulle farmakologiske egenskaper.

Forbindelsene fremstilles ifølge oppfinnelsen ved at man på i og for seg kjent måte omsetter 2-substituerte 1,3,4-tiadiazoler med den generelle formel II



hvor R^2 og R^3 har samme betydning som ovenfor, med 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd med den generelle formel III

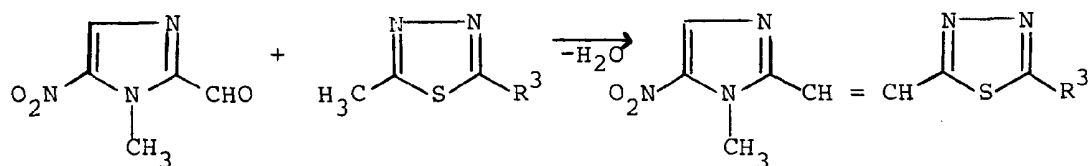
146397



III

eller dettes acetal eller acylal, idet man på vanlig måte anvender forhøyede temperaturer og eventuelt utfører omsetningen i nærvær av en sur kondensasjonskatalysator og eventuelt et løsningsmiddel. Aldehyder med formelen III kan også anvendes som acetaler eller acylaler, særlig da slike acetaler som erholdes ved omsetning med metanol og etanol, og det acetal som dannes ved omsetning med eddiksyre.

Reaksjonen kan illustreres ved følgende reaksjonslikning:



De 1,3,4-tiadiazoler med formelen II som anvendes som utgangsforbindelser, er til dels kjente forbindelser, eller de kan uten videre fremstilles eksempelvis ifølge den av R. Stollé, Ber. dtsch. chem. Ges. 32, 797 (1899) beskrevne fremgangsmåte. Man omsetter da N,N'-diacylhydraziner med P_2S_5 i et aromatisk hydrokarbon, såsom xylen, ved forhøyet temperatur.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen til fremstilling av forbindelsene I kan hensiktsmessig utføres ved at en forbindelse med formelen II omsettes med en forbindelse med formelen III eller acetal eller acylal derav ved temperaturer mellom 50 og 220°C, hensiktsmessig i nærvær av en sur kondensasjonskatalysator, for eksempel en Lewis-syre, en mineralsyre eller en sur ioneveksler, og eventuelt i nærvær av et løsningsmiddel.

Det foretrukne temperaturområde ligger ved anvendelse av et løsningsmiddel mellom 90 og 150°C, i fravær av løsningsmiddel ved 150-200°C.

Som katalysatorer kan det anvendes for aldehydkondensasjoner i og for seg kjente sure kondensasjonskatalysatorer,

hvilke anvendes i mengder på 0,005-1 mol, fortrinnsvis 0,05 - 0,2 mol katalysator pr. mol utgangsstoff II. Sure kondensasjonskatalysatorer er eksempelvis polyfosforsyre, borfluorid eller sinkklorid. Den foretrukne katalysator er sinkklorid.

Utgangsstoffene anvendes i almindelighet i støkiometriske forhold, men det kan også anvendes et overskudd av en av forbindelsene. Reaksjonen foregår i almindelighet ved normalt trykk, men overtrykk eller undertrykk kan i spesielle tilfelle være fordelaktig. Omsetningen kan utføres med eller uten løsningsmiddel. Som løsningsmiddel har særlig lavere karboksylsyrer, såsom eddiksyre eller propionsyre, disses anhydrider og blandinger av en lavere karboksylsyre og det tilsvarende anhydrid viste seg godt egnet. Ved anvendelse av blandinger av karboksylsyre og karboksylsyreanhydrid ligger forholdet hensiktsmessig mellom 9:1 og 1:9.

I almindelighet vil reaksjonen være fullført på noen timer. Opparbeidelsen volder ingen vanskeligheter; den kan eksempelvis skje ved at reaksjonsblandingen tilsettes et fellemiddel, værlig vann eller aceton, reaksjonsproduktet utfelles, avsuges, vaskes med vann og alkohol og omkrystalliseres fra et egnet løsningsmiddel.

Forbindelsene I viser en god virkning mot mikroorganismer. De viser en fremragende virkning ved behandling av infeksjoner som skyldes flagellater, særlig trichomonader og trypanosomer, og *Entamoeba histolytica* hos mennesker og dyr.

De kan også virke meget godt antibakterielt i grensekonsentrasjoner $<10^{-5}$, eksempelvis forbindelsene ifølge eksemplene 6 og 7.

En rekke forsøk, inklusive sammenligningsforsøk, er blitt utført, in vitro og in vivo, som viser effektiviteten av forbindelsene I. Forsøkene er nærmere beskrevet nedenfor, og resultatene av sammenligningsforsøkene er sammenstillet i Tabell 1, hvor den anvendte forbindelse I er angitt ved henvisning til de senere gitte eksempler. (Resultater fra forsøk in vivo kan ikke uten videre sammenlignes med resultater in vitro, og disse to forsøkesgrupper må betraktes hver for seg).

Tabell 1

Minimale hemmekonsentrasjoner (MHK) mot *Trichomonas vaginalis*

Stoff	MHK ($\mu\text{g/ml}$)	Relativ virkning, "Metronidazol" = 1,0	
		in vitro ¹⁾	in vivo ²⁾
Eksempel 1	0,02	5,0	
Eksempel 2	0,01	10,0	
Eksempel 3	0,01	10,0	
Eksempel 7	< 0,01	> 10,0	21,5 mg/kg 1,0
Eksempel 4	< 0,01	> 10,0	
Eksempel 5	< 0,01	> 10,0	
"Metronidazol"	0,1	1,0	46,4 mg/kg 1,0
"Tinidazol"	0,1	1,0	
Patent 135 420			
Eks. 1		2,0	46,4 mg/kg <1,0

1) Forsøkene ble utført i rør-rekke-fortynningstest in vitro ifølge P. Klein, Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis, Springer-Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg 1957.

2) Utført etter metoder som beskrevet i Handbuch für experimentelle Pharmakologie, Ergänzungswerk 16, Erzeugung von Krankheits-Zuständen durch das Experiment, del 9, s. 150 - 192, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1964.

Sammenligning mellom forbindelsen i Eksempel 1 i norsk patent nr. 135.420, handelsproduktet "Metronidazol" og forbindelse I ifølge Eksempel 7 nedenfor.

Det ble ved forsøkene anvendt albino-mus (NMRJ-stamme) av hunkjønn infisert med *Trichomonas vaginalis*. Det ble i hvert forsøk anvendt 10 mus, vekt 18-22 g, og infiseringen ble utført med 2,5 million *Trichomonas vaginalis* i 0,5 ml 0,5-proscentig tragant-suspensjon.

Fra tredje dag etter infiseringen ble musene en gang daglig i 5 dager behandlet med angjeldende aktive stoff per os. Som dose ble det anvendt 46,4 mg/kg av henholdsvis "Metronidazol" og forbindelsen i eksempel 1 i patent 135.420, mens dosen var

21,5 mg/kg av forbindelsen I i Eksempel 7 nedenfor.

To dager etter den siste medikasjon ble forsøksdyrene undersøkt:

1. Ved mikroskopisk påvisning av fremdeles foreliggende trichomonader i sekretet fra det infiserte abscess-området. Det ble funnet at av de 10 mus som var behandlet med forbindelsen ifølge Eksempel 1 i patentet, var 5 fremdeles positivt angrepet. Av de 10 forsøksdyr som henholdsvis var behandlet med "Metronidazol" og forbindelsen I ifølge Eksempel 9, var ingen positivt angrepet (ikke lenger noen infeksjon).
2. Ved anvendelse av kulturer podet med sekret fra abscess-området. Dette er en viktigere påvisningsmetode. Det ble funnet at alle 10 forsøksdyr som var behandlet med forbindelsen ifølge Eksempel 1 i patent 135.420, fremdeles var angrepet, mens ingen av de dyr som var behandlet med henholdsvis "Metronidazol" og forbindelsen I ifølge Eksempel 7, var positivt angrepet.

Ovenstående forsøk in vivo viser at forbindelsen ifølge Eksempel 1 i norsk patent nr. 135.420 var mindre aktiv enn handelsproduktet "Metronidazol" ved samme dosering, og at forbindelsen I ifølge Eksempel 7 anvendt med vesentlig lavere dosering var like aktiv som "Metronidazol".

Det var overraskende at innføringen av en tiadiazolrest som er bundet via en etylenbro, forbedrer virkningen av kjente handelsprodukter mot trichomonade-infeksjoner, for eksempel "Metronidazol" og "Tinidazol", maksimalt til over det 10-dobbelte.

Når det gjelder virkningen mot trichomonader, kan spesielt forbindelsene i eksempel 1, 3, 5 og 7 fremheves.

Virkningen overfor infeksjoner ved trypanosomer og Entamoeba histolytika kan vises ved forsøk med mus (NMRJ-stammer) ved metoder som er beskrevet i Handbuch für experimentelle Pharmakologie (nevnt ovenfor).

146397

1. Trypanosoma brucei - infeksjon hos mus.

Forskjellige doseringer utprøves. Helbredelsen ble fastslått mikroskopisk og ved hjelp av kulturer. Dessuten ble det foretatt en etter-observasjon i 25 dager etter endt behandling med sikte på å finne eventuelle tilbakefallstilfeller.

eksempel 1 11 x 50 mg/kg peroral, akutt 100% virkning,
70% tilbakefall.

eksempel 2 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning

eksempel 3 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning

eksempel 7 11 x 25 mg/kg peroral, akutt 100% virkning,
ingen tilbakefall.

eksempel 4 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

eksempel 5 11 x 50 mg/kg peroral, akutt 100% virkning,
30% tilbakefall.

"Suramin" 7x 50 mg/kg intraperitonealt, akutt 80% virkning,
ingen tilbakefall.

"Metronidazol" 11x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

"Tinidazol" 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

2. Trypanosoma gambiense - infeksjoner hos mus.

Metodikk som ved trypanosoma brucei.

eksempel 1 11 x 50 mg/kg peroral, akutt 100% virkning,
80% tilbakefall.

eksempel 2 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

eksempel 3 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

eksempel 7 11 x 50 mg/kg peroral, akutt 100% virkning, 60%
virkning.

eksempel 4 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

eksempel 5 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

"Suramin" 7 x 50 mg/kg intraperitonealt, akutt 50% virkning,
ingen virkning.

3. Trypanosoma congolense - infeksjoner hos mus.

Metodikk som ved trypanosoma brucei.

eksempel 1 11 x 50 mg/kg peroral, akutt 100% virkning,
20% tilbakefall

eksempel 2 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

eksempel 3 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.

eksempel 7 11 x 50 mg/kg peroral, akutt 100% virkning,
ingen tilbakefall.

146397

eksempel 4 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.
 eksempel 5 11 x 50 mg/kg peroral, ingen virkning.
 suramin 7 x 50 mg/kg intraperitonalt, akutt 70% virkning,
 ingen tilbakefall.

4. Entamoeba histolytica (rekke-fortynningstest).

Utprøvet ble stammene PN og Q.

De minimale hemmekonsentrasjoner var ved

eksempel 1 <0,01 µg/ml
 eksempel 2 0,1 µg/ml
 eksempel 3 <0,01 µg/ml
 eksempel 7 <0,01 µg/ml
 eksempel 4 <0,01 µg/ml
 eksempel 5 <0,01 µg/ml
 "Metronidazol" 0,1 µg/ml

Forsøkene ble utført i rør-rekkefortynningstest in vitro ifølge P. Klein, Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis, Springer-Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg 1957.

Av resultatene fremgår at forbindelsene i eksemplene 1 og 7 på grunn av sin virkning og i sammenlikning med suramin, som er en bestanddel i eksempelvis de kjente preparater germanin og naganol, må fremheves spesielt. Også virkningen mot Entamoeba histolytica må betegnes som meget god til god in vitro. Som det fremgår av tabellen er virkningen her mer enn ti ganger så god som for det kjente "Metronidazol".

5. Trichomonas vaginal - infeksjoner hos mus.

Forskjellige doseringer ble utprøvet. Helbredelsen ble fastslått mikroskopisk og ved hjelp av kulturer.

eksempel 1 100% helbredelse ved 5 x 25 mg/kg peroral
 eksempel 2 10% helbredelse ved 5 x 50 mg/kg peroral
 eksempel 3 100% helbredelse ved 5 x 25 mg/kg peroral
 eksempel 7 100% helbredelse ved 5 x 25 mg/kg peroral
 eksempel 4 50% helbredelse ved 5 x 50 mg/kg peroral
 eksempel 5 100% helbredelse ved 5 x 50 mg/kg peroral
 "Metronidazol" 100% helbredelse ved 5x 25 mg/kg peroral
 "Tinidazol" 100% helbredelse ved 5 x 25 mg/kg peroral.

De toksisitetsverdier LD 50 som ble funnet ved forsøkene med mus, stamme NMRJ, ved oralingivelse og i et opp-

servasjonstidsrom på 1 uke, ligger høyere enn 1.500 mg/kg for forbindelsene i eksempler 1, 5 og 7 .

De forbindelser som skal anvendes ifølge oppfinnelsen, kan følgelig anvendes ved terapeutisk behandling av mennesker og dyr mot trikomoniasis, trypanosomiasis og dysenteri forårsaket av amøber. Videre kommer de i betraktning ved behandling av leishmaniasis.

Av de foretrukne, virksomme forbindelser nevnes følgende:

2-fenyl-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol
2-(4-pyridyl)-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol
2-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol
2-etyl-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

Videre er følgende forbindelser blant de spesielt foretrukne:

2-metyl-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol, og
2-etyl-5-[1-metyl-2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

Eksempel 1

Fremstilling av 2-metyl-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

I en røreapparat blir 11,4 g 2,5-dimetyl-1,3,4-tiadiazol, 15,5 g 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd oppvarmet under tilbakeløp sammen 0,2 g sinkklorid i en blanding av 50 ml iseddik og 20 ml eddiksyreanhydrid i 10 timer. Etter avkjøling vaskes det utfelte faste stoff med iseddik og omkrystalliseres fra dimetylformamid. Det erholdes 15,6 g farvede krystaller med et smeltepunkt på 248°C; dette tilsvarer 62% av det teoretiske.

Eksempel 2

2-fenyl-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

17,6 g 2-metyl-5-fenyl-1,3,4-tiadiazol, 15,5 g 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd og 0,5 g ZnCl_2 oppvarmes i 100 ml eddiksyre og 50 ml eddiksyreanhydrid i 7 timer ved tilbakeløpstemperatur. Det tilsettes vann til reaksjonsblandingen, og det utfelte faste stoff omkrystalliseres fra iseddik. Det erholdes 17,5 g av et produkt som smelter ved 257°C ; dette tilsvarer 56% av det teoretiske.

Eksempel 3.

2-(4-pyridyl)-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

8,8 g 2-metyl-5-(4-pyridyl)-1,3,4-tiadiazol og 7,7 g 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd oppvarmes sammen med 0,2 g ZnCl_2 i en blanding av 50 ml iseddik og 25 ml eddiksyreanhydrid i 6 timer ved tilbakeløpstemperatur. Etter avkjøling avsuges det utfelte faste stoff, vaskes med konsentrert ammoniakk og omkrystalliseres fra DMF, smeltepunkt $240-241^\circ\text{C}$.

Eksempel 4

2-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

Til 10 g 2-metyl-1,3,4-tiadiazol oppløst i en blanding av 100 ml eddiksyre og 50 ml eddiksyreanhydrid blir det etter tilsetning av 0,3 g sinkklorid dråpevis tilsatt 15,5 g 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd, oppløst i 100 ml eddiksyre og 50 ml eddiksyreanhydrid, i løpet av 5 timer ved tilbakeløpstemperatur. Etter 24 blir reaksjonsblandingen befridd for løsningsmiddel ved inndampning, og eter tilsettes. Etter vasking med vann omkrystalliseres råproduktet fra xylen. Det erholdes 9,3 g, tilsvarende 39% av det teoretiske. Forbindelsen smelter ved 214°C .

Eksempel 5

2-etyl-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

Til 12,8 g 5-etyl-2-metyl-1,3,4-tiadiazol og 0,5 g ZnCl_2 oppløst i 100 ml iseddik og 50 ml eddiksyreanhydrid til-

settes ved tilbakeløpstemperatur i løpet av 10 timer en løsning av 15,5 g 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd i 50 ml is-eddik og 25 ml eddiksyreanhydrid. Blandingen holdes i ytterligere 20 timer ved tilbakeløpstemperatur, hvorefter løsningsmidlet avdampes. Residuet vaskes med aceton og renses i en kiselsyre-ferdigsøyle (type A fra firma Merck); det elueres med $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 98 : 2$. Det erholdes 5,6 g av ovennevnte reaksjonsprodukt, smeltepunkt 165°C ; dette tilsvarer 21% av det teoretiske.

Eksempel 6

2-metyl-5-[1-metyl-2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

Acetonløsningen fra eksempel 7 ble inndampet, residuet plasseres i en kiselsyre-ferdigsøyle (type A fra firma Merck) og elueres med $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 98 : 2$. Utbyttet var 5,4 g; smeltepunkt 249°C . Dessuten erholdes 3,4 g av den stereoisomere forbindelse med et smeltepunkt på 155°C .

Det samlede utbytte fra eksempel 7 og 8 utgjør 54% av det teoretiske.

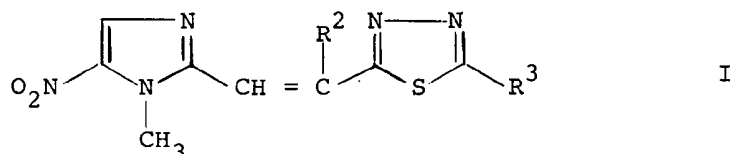
Eksempel 7

2-etyl-5-[1-metyl-2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol.

Til 17,1 g 2,5-dietyl-1,3,4-tiadiazol, oppløst i en blanding av 60 ml eddiksyre, 25 ml eddiksyreanhydrid og 0,5 g sinkklorid, tilsettes dråpevis 4,65 g 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd oppløst i 80 ml iseddik og 35 ml eddiksyreanhydrid ved tilbakeløpstemperatur i løpet av 5 timer. Etter 24 timers oppvarming ved tilbakeløpstemperatur fjernes løsningsmidlet ved inndampning, og det tilsettes vann til reaksjonsblandingen. Det utfelte reaksjonsprodukt underkastes deretter en sublimering og omkrystalliseres fra propanol. Det erholdes 2,9 g, tilsvarende 35% av det teoretiske. Forbindelsen smelter ved 125°C .

P a t e n t k r a v

1. Analogifremgangsmåte til fremstilling av terapeutisk aktive nitroimidazolylvinyltiadiazoler med den generelle formel I



hvor R^2 betyr hydrogen eller metyl, og R^3 betyr hydrogen, metyl, etyl, fenyl eller pyridyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at et 2-substituert 1,3,4-tiadiazol med den generelle formel II



hvor R^2 og R^3 har samme betydning som ovenfor, på i og for seg kjent måte omsettes med 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd eller dettes acetal eller acylal, ved høyere temperaturer, eventuelt i nærvær av en sur kondensasjonskatalysator og eventuelt et løsningsmiddel.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til fremstilling av 2-etyl-5-[2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol k a r a k t e r i s e r t v e d at 5-etyl-2-metyl-1,3,4-tiadiazol omsettes med 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til fremstilling av 2-etyl-5-[1-metyl-2-(1-metyl-5-nitroimidazol-2-yl)-vinyl]-1,3,4-tiadiazol, k a r a k t e r i s e r t v e d at 2,5-dietyl-1,3,4-tiadiazol omsettes med 1-metyl-5-nitroimidazol-2-karboksaldehyd.