



(12) Ausschließungspatent

DD 287 506 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(1) C 07 D 513/04
A 61 K 31/505

DEUTSCHES PATENTAMT

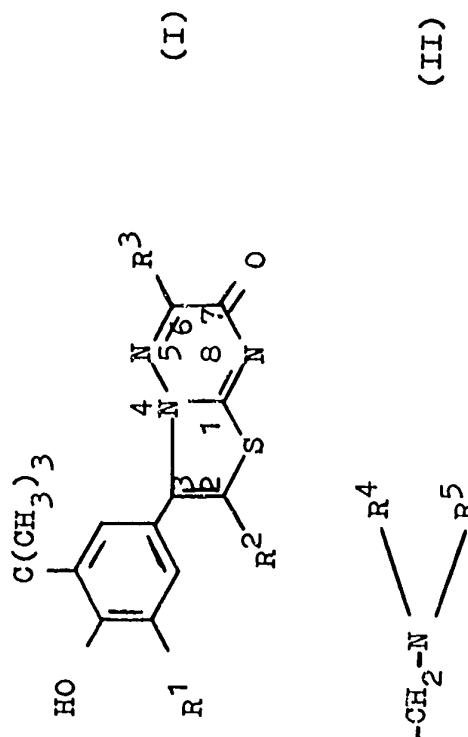
In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

| | | | | | |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | DD C 07 D / 312 515 0 | (22) | 28.01.88 | (44) | 28.02.91 |
| (31) | P3702758.1 | (32) | 30.01.87 | (33) | DE |

(71) siehe (73)
 (72) Thorwart, Werner, Dr., DE; Gebert, Ulrich, Dr., DE; Schleyerbach, Rudolf, Dr., DE; Bartlett, Robert R., Dr., US
 (73) Hoechst AG, Frankfurt am Main, DE
 (74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, O - 1020 Berlin, DE

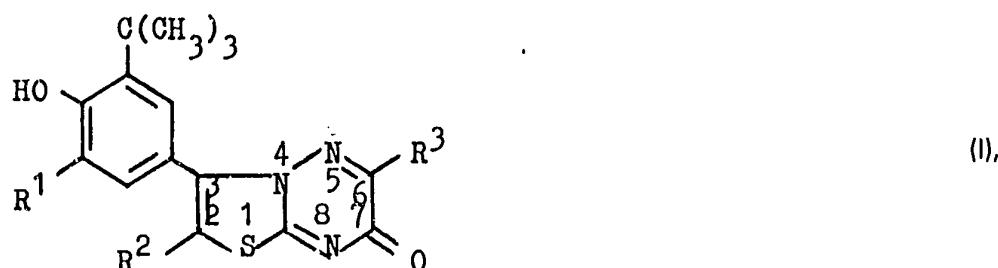
(54) Verfahren zur Herstellung von substituierten 3-Phenyl-7H-thiazolo[3,2-b] [1,2,4]triazin-7-one

(55) Verfahren; substituierte 3-Phenyl-7H-thiazolo[3,2-b] [1,2,4]triazin-7-one-Herstellung; Arzneimittel; Rheumatherapie
 (57) Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von neuen substituierten 3-Phenyl-7H-thiazolo[3,2-b] [1,2,4]triazin-7-onen der allgemeinen Formel (I), in der R¹ eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, Hydroxymethyl oder eine Aminomethylgruppe der Formel (II), R² ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit 1 bis 3 C-Atomen und R³ ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, Hydroxymethyl oder eine Aminomethylgruppe der Formel II bedeuten, wobei R⁴ und R⁵ gleich oder verschieden sind und ein Wasserstoffatom oder einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen darstellen, oder beide Reste zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 5- bis 7gliedrigen gesättigten Ring mit 4 bis 6 C-Atomen oder mit 4 oder 5 C-Atomen und zusätzlich einem weiteren Heteroatom in Form von O, S oder NR⁶ bilden und R⁶ die Bedeutung von Wasserstoff oder (C₁-C₄)Alkyl hat, und die physiologisch verträglichen Säureadditionsalze der Verbindungen mit dem Strukturelement der Formel II in den Positionen von R¹ und/oder R³. Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen eignen sich hauptsächlich zur Vorbeugung und Behandlung von entzündlichen – insbesondere entzündlich rheumatischen – Erkrankungen. Formeln (I), (II)



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von substituierten 3-Phenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-onen der allgemeinen Formel I



in der

R¹ eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, Hydroxymethyl oder eine Aminomethylgruppe der Formel II



R² ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit 1 bis 3 C-Atomen und

R³ ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, Hydroxymethyl oder eine Aminomethylgruppe der Formel II bedeuten,
wobei

R⁴ und R⁵ gleich oder verschieden sind und ein Wasserstoff oder einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen darstellen, oder beide Reste zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 5- bis 7gliedrigen gesättigten Ring mit 4 bis 6 C-Atomen, mit 4 oder 5 C-Atomen und zusätzlich einem weiteren Heteroatom in Form von O, S oder NR⁶ bilden und R⁶ die Bedeutung von Wasserstoff oder (C₁-C₄)-Alkyl hat,
und der physiologisch verträglichen Säureadditionssalze der Verbindungen mit dem Strukturelement der Formel II in den Positionen von R¹ und/oder R³ und gegebenenfalls der üblichen pharmazeutischen Anwendungsformen, dadurch gekennzeichnet, daß man
a) ein 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-on der Formel III

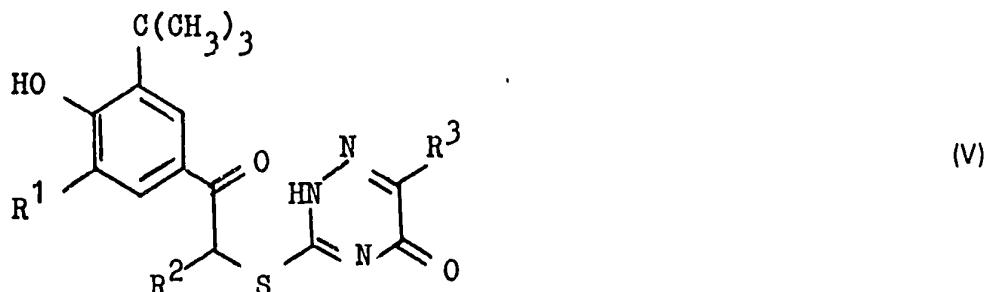


mit einem 2-Halogen-1-phenylalkanon der Formel IV



zu einer Verbindung der Formel I umsetzt, wobei R¹ die im Anspruch 1 definierte (C₁-C₄)-Alkylgruppe darstellt und R² und R³ die im Anspruch 1 genannten Bedeutungen haben und X für ein Halogenatom steht, oder

- b) eine Verbindung der Formel III mit einer Verbindung der Formel IV (mit der dort angegebenen Bedeutung der Reste R¹, R² und X) unter basischen Bedingungen zunächst zu einem S-alkylierten 2H-1,2,4-Triazin-5-on der Formel V



umsetzt und dieses unter Dehydratisierung in eine Verbindung der Formel I umwandelt, wobei R¹ die im Anspruch 1 definierte (C₁–C₄)-Alkylgruppe darstellt und R² und R³ die bei Formel I genannten Bedeutungen haben, oder

- c) ein 2-Halogen-1-phenylalkanon der Formel IV (mit der dort angegebenen Bedeutung der Reste R¹, R² und X) zuerst mit Thiosemicarbazid zu dem entsprechenden 2-Amino-6H-1,3,4-thiadiazin der Formel VI



umsetzt und dieses unter sauren Bedingungen in ein 3-Amino-2-imino-2,3-dihydro-thiazol der Formel VII



umlagert, das anschließend mit einer α -Ketocarbonsäure bzw. deren Alkylestern der Formel VIII,



zu einer Verbindung der Formel I cyclo kondensiert wird, wobei R¹ die im Anspruch 1 definierte (C₁–C₄)-Alkylgruppe darstellt, R² die bei Formel I genannten Bedeutungen hat, R³ ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen oder eine Hydroxymethylgruppe bedeutet und R⁷ ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit 1 bis 3 C-Atomen darstellt, oder daß man

- d) ausgehend von einer Verbindung der Formel I, die in der Position R¹ und/oder R³ einen Hydroxymethyl-Rest trägt, zunächst deren Hydroxygruppe(n) gegen Halogen austauscht

oder in einen aktivierten Sulfon- oder Phosphorsäureester überführt und anschließend mit einem Amin der Formel IX



zu einer Verbindung der Formel I mit dem Strukturelement der Formel II in der Stellung von R¹ und/oder R³ umsetzt, wobei R², R⁴, R⁵ und gegebenenfalls auch R¹ bzw. R³ die im Anspruch 1 genannten Bedeutungen haben, und diese Aminomethyl-Verbindung entweder in freier Form isoliert oder aber mit geeigneten Säuren in physiologisch verträgliche Additionssalze umwandelt, oder daß man

- e) zur Herstellung einer Verbindung der Formel I mit dem Strukturmerkmal der Formel II oder dem Hydroxymethylrest in der Position von R¹ von einer Verbindung der Formel I, in der R¹ für Wasserstoff steht, ausgeht und diese zur Einführung des Hydroxymethyl-Restes mit Formaldehyd umsetzt, zur Einführung von N-substituierten Aminomethylgruppen der Formel II mit den entsprechenden Aminen der Formel IX in Gegenwart von Formaldehyd umsetzt oder zur Einführung des unsubstituierten Aminomethyl-Restes zunächst mit N-Hydroxymethyl-acetamiden der Formel X,



in der R⁸ für Trifluormethyl, Trichlormethyl oder Chlormethyl steht, unter sauren Bedingungen kondensiert und anschließend den Acylrest R⁸-CO-hydrolytisch eliminiert, wobei R² bis R⁵ die in Anspruch 1 genannten Bedeutungen haben, und die so erhaltenen Aminomethylverbindungen entweder in freier Form isoliert oder mit geeigneten Säuren in physiologisch verträgliche Additionssalze überführt und gegebenenfalls dieser erhaltenen Verbindungen mit einem physiologisch annehmbaren Träger und gegebenenfalls weiteren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen zu einer geeigneten Darreichungsform verarbeitet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Formel I herstellt mit wenigstens einem der Merkmale, daß R¹ einen tert.-Butylrest oder eine Aminomethylgruppe der Formel II darstellt und daß R² und R³ unabhängig voneinander für Wasserstoff oder Methyl stehen.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Formel I herstellt, worin R¹ eine tert.-Butylgruppe darstellt und gleichzeitig R² und R³ unabhängig voneinander für Wasserstoff oder Methyl stehen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Verbindungen der Formel I mit R¹ = tert.-Butylgruppe mit R² = R³ = Wasserstoff herstellt (= 3-(3,5-Di-tert.-butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2,b][1,2,3]triazin-7-on).
5. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I und der physiologisch verträglichen Säureadditionssalze dieser Verbindungen mit dem Strukturelement der Formel II in Position R¹ und/oder R³ gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Heilmittel verwendet werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren gemäß hergestellte Arzneimittel zur Vorbeugung und Behandlung von Krankheiten bestimmt ist, bei denen die therapeutische Anwendung von Entzündungshemmern, Immunmodulatoren, Sauerstoffradikalen, desaktivierenden Mitteln und/oder Hemmstoffen des durch die 5-Lipoxygenase vermittelten Arachidonsäureabbaus indiziert ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das verfahrensgemäß hergestellte Arzneimittel zur Vorbeugung und Behandlung von entzündlichen, insbesondere von entzündlich rheumatischen Erkrankungen, bestimmt ist.
8. Verwendung von Verbindungen der Formel I gemäß der Definitionen in Anspruch 1 oder wie erhalten nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 und/oder gegebenenfalls von deren physiologisch verträglichen Säureadditionssalzen, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Herstellung von Arzneimitteln zur Vorbeugung und Behandlung der in den Ansprüchen 6 und 7 genannten Erkrankungen eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer mehrfach substituierter 3-Phenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-one, die als Wirkstoffe in Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen verwendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bei den bisher in der Rheumatherapie vorzugsweise eingesetzten nichtsteroidalen Antiphlogistika handelt es sich fast ausschließlich um verhältnismäßig starke Cyclooxygenase-Inhibitoren, die den endogenen Abbau der Arachidonsäure zu den entzündungs- und schmerzfördernden Prostaglandinen hemmen. Allerdings stehen im ursächlichen Zusammenhang mit einer zu starken Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität eine Reihe von gravierenden Nebenwirkungen, wie gastrointestinale Beschwerden, Nierenfunktionsstörungen und allergische Reaktionen (z. B. Hautallergien und Asthmaanfälle), die insbesondere bei der üblicherweise notwendigen Langzeitbehandlung häufig zum Abbruch der Therapie zwingen (vergl. K. Brune, Eur. J. Rheumatol. Inflam. 5, 335–349, 1982).

Ein weiterer mit dem beschriebenen Wirkungsmechanismus ursächlich verbundener Nachteil dieser klassischen nichtsteroidalen Antiphlogistika besteht darin, daß sie zwar die Beseitigung oder Linderung der Symptome Schmerz, Entzündung und Schwellung gestatten, aber die den entzündlich rheumatischen Erkrankungen zugrunde liegenden immunpathologischen Prozesse unbeeinflußt lassen und daher den progredienten Krankheitsverlauf nicht aufzuhalten vermögen.

Aus der Literatur sind bereits einige 7H-Thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-one bekannt. So stellten F. Soliman et al. auf der Suche nach antineoplastisch aktiven Verbindungen das 6-(3-Jodstyryl)-3-methyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-5-on her, ohne aber über dessen pharmakologische Eigenschaften zu berichten (Pharmazie 34 [1979], S. 392–394). Dasselbe Ringsystem mitständigem Alkyl- bzw. Phenylrest wurde von W. Klose et al. (Liebigs Ann. Chem. 1984, S. 1302–1307) aufgebaut; diese Verbindungen sollen herbizide Wirkung besitzen. In der DE-OS 3146300 werden schließlich neben einer ganzen Reihe partiell hydrierter 7H-Thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-one das 3,6-Diphenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on beschrieben und das entsprechende 3-Methyl-6-phenyl-Derivat erwähnt, die ebenfalls herbizid wirksam sein sollen.

Ziel der Erfindung

Die erfindungsgemäß hergestellten gastral äußerst gut verträglichen Verbindungen hemmen im Unterschied zu den bekannten nichtsteroidalen Antiphlogistika das Arachidonsäure abbauende Enzym 5-Lipoxygenase, während eine Beeinflussung der Cyclooxygenase nicht nachgewiesen werden kann. Die Fähigkeit der Verbindungen, Sauerstoffradikale zu desaktivieren, zeigt sich beispielsweise im Modell der Adriamycin (Fa. Farmitalia)-induzierten Entzündung und durch die Inhibition der Lipidperoxydation.

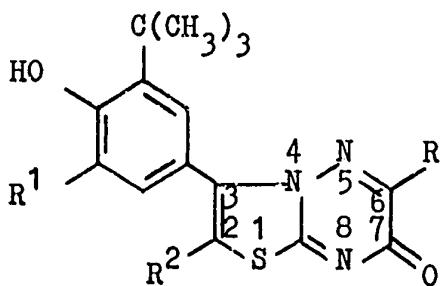
Darüber hinaus greifen sie vorteilhaft in das gestörte Immunsystem ein, wie sich durch Unterdrückung der Arthus-Reaktion und durch Normalisierung der supprimierten Immunaktivität in den pathologischen Modellen der mit Freundschem Adjuvans oder Typ II-Collagen induzierten Arthritis demonstrieren läßt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, therapeutisch nutzbare Antirheumatika aufzufinden, die sich aufgrund eines günstigeren Wirkungsprofils von den bekannten nichtsteroidalen Antiphlogistika vorteilhaft durch bessere Verträglichkeit einerseits und einem mehr kausalen Eingriff in das rheumatische Krankheitsgeschehen andererseits unterscheiden. Erfolgversprechende Ansatzpunkte hierfür bieten solche Pharmaka, die verstärkt in den alternativen Weg des Arachidonsäureabbaus eingreifen, indem sie beispielsweise die 5-Lipoxygenase hemmen und somit die exzessive Bildung der proinflammatorischen Leukotriene unterbinden, hochreaktive Sauerstoffradikale, die als Entzündungsmediatoren die Zell- und Gewebszerstörung in den entzündlich rheumatischen Gelenken perpetuell unterhalten, desaktivieren und/oder das entgleiste Immunsystem restaurieren und damit die Möglichkeit eröffnen, mehr ursächlich die rheumatischen Erkrankungen medikamentös zu behandeln.

Überraschend wurde nun gefunden, daß durch Einführung bestimmter 3-substituierter 5-tert.-butyl-4-hydroxyphenyl-Reste in die 3-Stellung von gegebenenfalls in 2- und/oder 6-Position substituierten 7H-Thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-one neuartige Verbindungen erhalten werden, die aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften die zuvor aufgestellten Anforderungen erfüllen und sich demnach hervorragend zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen eignen.

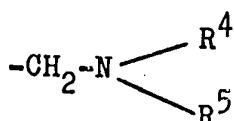
Gegenüber den bereits bekannten Verbindungen betreffen die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen neue 7H-Thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-one, die in 3-Stellung eine 3-substituierte 5-tert.-butyl-4-hydroxyphenyl-Gruppe und gegebenenfalls in 2- und/oder 6-Position weitere Substituenten tragen, wobei allerdings die Einführung eines Phenylrestes in die 6-Stellung des bicyclischen Systems zu vollständigem Wirkungsverlust führt. Aufgrund ihrer zuvor erwähnten pharmakologischen Eigenschaften eignen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Verwendung in Arzneimitteln, insbesondere in solchen, die bei entzündlich rheumatischen Erkrankungen indiziert sind. Erfindungsgemäß werden substituierte 3-Phenyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-one der allgemeinen Formel I, hergestellt,



(II),

in der

R¹ eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, Hydroxymethyl oder eine Aminomethylgruppe der Formel II



(III),

R² ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit 1 bis 3 C-Atomen und

R³ ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, Hydroxymethyl oder eine Aminomethylgruppe der Formel II

bedeuten, wobei

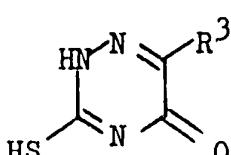
R⁴ und R⁵ gleich oder verschieden sind und ein Wasserstoffatom oder einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen darstellen, oder beide Reste zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 5- bis 7gliedrigen gesättigten Ring mit 4 bis 6 C-Atomen oder mit 4 oder 5 C-Atomen und zusätzlich einem weiteren Heteroatom in Form von O, S oder NR⁶ bilden und R⁶ die Bedeutung von Wasserstoff oder (C₁-C₄)-Alkyl hat, sowie die physiologisch verträglichen Säureadditionssalze der Verbindungen mit dem Strukturelement der Formel II in den Positionen von R¹ und/oder R³.

Wenn R⁴ und R⁵ zusammen mit dem N-Atom, an das sie gebunden sind, einen gesättigten Ring mit 4 oder 5 C-Atomen und zusätzlich einem weiteren Heteroatom bilden, müssen die Heteroatome durch mindestens 1 C-Atom voneinander getrennt sein.

Bevorzugt sind dabei solche Verbindungen der Formel I, bei denen entweder R¹ einen tert.-Butylrest oder eine Aminomethylgruppe der Formel II bedeutet oder R² und R³ unabhängig voneinander für Wasserstoff oder Methyl stehen. Weiterhin sind diejenigen Verbindungen der Formel I besonders hervorzuheben, in denen R¹ eine tert.-Butylgruppe darstellt und gleichzeitig R² und R³ unabhängig voneinander für Wasserstoff oder Methyl stehen, wie etwa das 3-(3,5-Di-tert.-butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on.

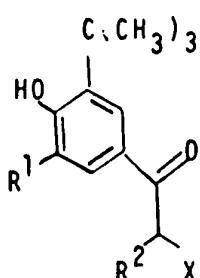
Als Alkylreste für die Gruppen R¹ und R³ bis R⁶ kommen Methyl, Äthyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sek. Butyl und tert.-Butyl und für die Gruppe R² Methyl, Äthyl, n-Propyl und Isopropyl in Frage. Geeignete cyclische Aminomethylgruppen für das Strukturelement der Formel II stellen Pyrrolidino-, Piperidino-, Hexamethylenimino-, Morphilino-, Thiomorpholino- sowie gegebenenfalls am zweiten Stickstoffatom alkyliertes Piperazino- und Homopiperazino-methyl dar.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung der neuen 7H-Thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-one. Eine Ausführungsform a) besteht beispielsweise darin, daß man 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-one der Formel III,



(III)

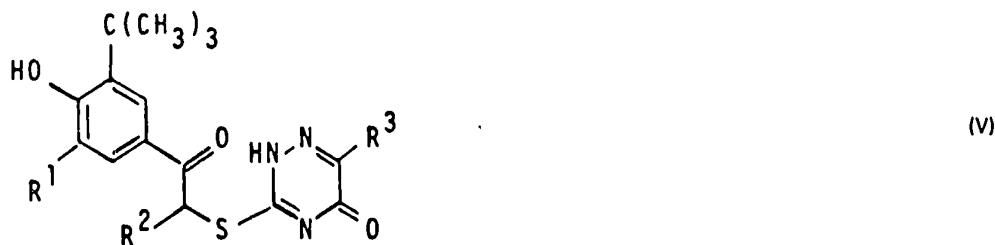
in der R³ die oben genannte Bedeutung hat, mit 2-Halogen-1-phenylalkanonen der Formel IV,



(IV)

in der R¹ die voranstehend definierte Alkylgruppe bedeutet, R² die oben angegebene Bedeutung hat und X für ein Halogenatom, vorzugsweise Chlor oder Brom steht, zu den entsprechenden erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I umgesetzt.

Eine andere Ausführungsform b) besteht darin, daß man Verbindungen der Formel III mit einer Verbindung der Formel IV (mit $R^1 = (C_1-C_4)$ -Alkyl) unter basischen Bedingungen zunächst zu den S-alkylierten 2H-1,2,4-Tiazin-5-onen der Formel V



umsetzt und diese unter Dehydratisierung in die entsprechenden erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I umwandelt; die Zwischenprodukte der Formel V sind neue Verbindungen.

Eine weitere Ausführungsform c) besteht darin, daß man die 2-Halogen-1-phenylalkanone der Formel IV (mit $R^1 = (C_1-C_4)$ -Alkyl) zuerst mit Thiosemicarbazid zu den entsprechenden – ebenfalls neuen – 2-Amino-6H-1,3,4-thiadiazinen der Formel VI



umsetzt und diese unter sauren Bedingungen in die 3-Amino-2-imino-2,3-dihydro-thiazole der Formel VII



umlagert, die anschließend mit α -Ketocarbonsäure bzw. deren Alkylestern der Formel VIII,



in der R³ ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen oder eine Hydroxymethylgruppe und R⁷ ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit 1 bis 3 C-Atomen darstellen, zu den betreffenden erfundungsgemäßen Verbindungen der Formel I cyclo kondensiert werden;

Eine ebenso praktikable Ausführungsform d) besteht darin, daß man ausgehend von jenen erfundungsgemäßen Verbindungen der Formel I, die in der Position von R¹ und/oder R³ einen Hydroxymethylrest tragen, zunächst deren Hydroxygruppe(n) entweder gegen Halogen austauscht oder in einen aktivierten Sulfon- oder Phosphorsäureester überführt und anschließend mit den Aminen der Formel IX.



in der R⁴ und R⁵ die zuvor genannten Bedeutungen haben, zu erfundungsgemäßen Verbindungen der Formel I mit dem Strukturelement der Formel II in der Stellung von R¹ und/oder R³ umsetzt, wobei diese Aminomethyl-Verbindungen entweder in freier Form isoliert oder aber mit geeigneten Säuren in physiologisch verträgliche Additionssalze umgewandelt werden.

Eine weitere für die Herstellung von Verbindungen der Formel I mit dem Strukturmerkmal der Formel II oder dem Hydroxymethylrest in der Position von R¹ geeignete Ausführungsform e) besteht schließlich darin, daß man Verbindungen der Formel I, in der R¹ für Wasserstoff steht,

Formel I, in der R' für Wasserstoff steht, zur Einführung des Hydroxymethylrestes mit Formaldehyd umgesetzt.

zur Einführung des Hydroxymethylrestes mit Formaldehyd umsetzt,
zur Einführung von N-substituierten Aminomethylgruppen der Formel II, in der also R⁴ und R⁵ nicht gleichzeitig Wasserstoff bedeuten, mit den entsprechenden Aminen der Formel IX in Gegenwart von Formaldehyd umsetzt oder

zur Einführung des unsubstituierten Aminomethylrestes ($R^4 = R^5 = H$) zunächst mit N-Hydroxymethyl-acetamiden der Formel X,



in der R^8 für Trifluormethyl, Trichlormethyl oder Chlormethyl steht, unter sauren Bedingungen und Wasseraustritt kondensiert und anschließend den Acylrest $R^8\text{-CO-}$ hydrolytisch eliminiert, wobei die so erhaltenen Aminomethyl-Verbindungen entweder in freier Form isoliert oder aber mit geeigneten Säuren in physiologisch verträgliche Additionssalze überführt werden. Für die Herstellung dieser Säureadditionssalze kommen beispielsweise Mineralsäuren, wie Schwefel- oder Phosphorsäure oder Halogenwasserstoffsäuren, insbesondere Bromwasserstoff- und Salzsäure, sowie organische Säuren, wie ein- bis dreibasische Carbonsäuren, z. B. Essig-, Milch-, Malein-, Fumar-, Oxal-, Wein-, Zitronensäure oder andere verträgliche Säuren, wie Sulfinsäuren (Benzolsulfinsäure, 4-Toluolsulfinsäure, Methansulfinsäure, Trifluormethylsulfinsäure, Cyclohexylamidosulfinsäure, usw.) in Frage.

Die für das erfundungsgemäße Verfahren als Ausgangsstoffe benutzten 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-one der Formel III sind bekannt (H. Neunhoeffer und P. L. Wiley in A. Weisberger und E. C. Taylor, The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Wiley-Interscience, New York, Bd. 33 [1978] S. 430-465) oder lassen sich auf analoge Weise darstellen.

Die ebenfalls als Ausgangsstoffe verwendeten 2-Halogen-1-phenylalkanone der Formel IV sind auch literaturbekannt oder lassen sich beispielsweise aus den 1-(3-Alkyl-5-tert.-butyl-4-hydroxyphenyl)-alkanonen durch Umsetzung mit einem geeigneten Halogenierungsmittel nach den im Houben-Weyl Bd. V/4 S. 171-189 (1960) beschriebenen Methoden leicht herstellen. Als geeignete Verbindungen IV seien beispielsweise das 2-Brom-1-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon und 2-Brom-1-(3-methyl-5-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon genannt, die sich durch Halogenierung der entsprechend substituierten 1-Phenylalkanone mit elementarem Brom oder mit Kupfer-II-bromid nach einem Verfahren von L. C. King und G. K. Ostrum, J. org. Chem. 29 (1964) S. 3459-3461 herstellen lassen.

Zur Gewinnung jener Verbindungen der Formel IV, in denen für X ein Chloratom steht, eignet sich insbesondere Sulfurylchlorid, das vorzugsweise bei Temperaturen zwischen etwa 10 und 30°C in Anwesenheit inerter Lösungsmittel wie z.B. Methylenechlorid oder Chloroform, mit den entsprechenden 1-Phenylalkanonen zur Reaktion gebracht wird. Ein weiteres Herstellungsverfahren besteht in der Friedel-Crafts-Acylierung von 2-Alkyl-6-tert.butylphenolen mit vorzugsweise Chloracetylchlorid in Gegenwart von Lewisäuren, wie z. B. Aluminiumchlorid oder Bortrifluorid.

Bei der Umsetzung der 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-one III mit den 2-Halogen-1-phenylalkanonen IV gemäß Verfahrensweise a) arbeitet man gewöhnlich mit äquimolaren Mengen der Reaktionspartner in einem Verteilungs- oder Lösungsmittel. Als solche kommen vor allem polare Solventien, beispielsweise niedere aliphatische Carbonsäuren, wie Ameisensäure oder Essigsäure, Alkohole, wie Methanol, Äthanol, die verschiedenen Propanole oder Butanole, in Frage. Es können aber auch Äthylenglykol und dessen Äther, Essigsäureester, Aceton, Butan-2-on, Dimethylformamid oder Acetonitril sowie Mischungen der genannten Lösungsmittel oder deren Gemische mit Wasser Verwendung finden. Die Reaktionstemperaturen liegen im allgemeinen zwischen etwa 20°C und dem Siedepunkt des jeweils verwendeten Reaktionsmediums. Vorzugsweise wird in Essigsäure zwischen etwa 70 und 100°C gearbeitet, wobei die Reaktionszeiten im allgemeinen weniger als einer Stunde und etwa 6 Stunden liegen.

Die Herstellung der bei Verfahrensvariante b) als Zwischenprodukte benötigten S-alkylierten 2H-1,2,4-Triazin-5-one der Formel V kann in der Weise erfolgen, daß man 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-one der Formel III zweckmäßigerweise mit einer äquimolaren Menge eines 2-Halogen-1-phenylalkanons der Formel IV in Gegenwart eines basischen Mittels, wie eines Alkali- oder Erdalkalihydroxids, -carbonats, -hydrids oder -alkoholats, oder einer organischen Base, beispielsweise eines Trialkylamins, wie Triäthyl- oder Tributylamin, umsetzt. Die Reaktion erfolgt bevorzugt in einem gegenüber den Reaktionspartnern indifferenten Verteilungs- oder Lösungsmittel oder deren Gemischen. Als solche kommen beispielsweise Wasser, Alkohole, wie Methanol, Äthanol, die verschiedenen Propanole und Butanole, Äther, wie Diäthyläther, Diisopropyläther, Tetrahydrofuran und Dioxan, Nitrile, wie Acetonitril, Ketone, wie Aceton und Butanon sowie Dimethylformamid, Dimethylacetamid und Dimethylsulfoxid in Frage. Die Umsetzung wird in der Regel zwischen etwa 0°C und der Siedetemperatur des Reaktionsmediums, vorzugsweise zwischen etwa 30 und 90°C durchgeführt, wobei Reaktionszeiten von durchschnittlich einer bis zu mehreren Stunden benötigt werden.

Die anschließende Dehydratisierung der Verbindungen V unter Ringschluß zu den erfundungsgemäßen Verbindungen der Formel I gelingt bevorzugt in Gegenwart einer Säure, wie Chlorwasserstoff- oder Bromwasserstoff-, Schwefel-, p-Toluolsulfon-, Polyphosphor- oder Essigsäure in einem Äther, wie Diisopropyläther, Tetrahydrofuran und Dioxan, oder Alkohol, wie Methanol, Äthanol oder Propanol, oder deren Gemischen mit Wasser bei Temperaturen von etwa 0 bis 80°C, insbesondere von etwa 10 bis 40°C, und Reaktionszeiten von etwa einer Stunde bis zu mehreren Tagen.

Die Verfahrensweise c) führt über die 2-Amino-6H-1,3,4-thiadiazine der Formel VI als Zwischenprodukte, die sich aus den 2-Halogen-1-phenylalkanonen der Formel IV und Thiosemicarbazid nach Literaturmethoden leicht herstellen lassen. Deren Umlagerung in die entsprechenden 3-Amino-2-imino-2,3-dihydro-thiazole der Formel VII erfolgt vorzugsweise in einem sauren Medium, wie beispielsweise in Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Schwefel- oder Essigsäure sowie deren Mischungen oder Gemischen mit Wasser.

Die anschließende Cyclokondensation zu den Verbindungen der Formel I wird im allgemeinen ohne Zwischenisolierung der intermediär gebildeten 3-Amino-2-imino-2,3-dihydro-thiazole VII durchgeführt, indem man der Reaktionsmischung eine α -Ketocarbonsäure oder deren Alkylester der Formel VIII, wie etwa Glyoxalsäure oder Brenztraubensäure bzw. deren Methyl- oder Äthylester, in bis zu zweifach äquimolarer Menge hinzufügt. Die Temperaturen liegen dabei vorzugsweise zwischen etwa 50°C und dem Siedepunkt des jeweils verwendeten Reaktionsmediums, während die Reaktionszeiten im allgemeinen von etwa 5 bis zu etwa 30 Stunden betragen können.

Die etwaige Umwandlung der erfundungsgemäßen Verbindungen der Formel I, die in der Position von R^1 und/oder R^3 einen Hydroxymethylrest tragen, in die Aminomethylverbindung der Formel I entsprechend Ausführungsform d) erfolgt in üblicher Weise. So kann die Aktivierung der Hydroxylgruppe beispielsweise durch Umsetzung mit Halogenierungsmitteln, wie Thionylchlorid und Phosphortrichlorid oder -bromid, zu den Halogenmethylverbindungen oder durch Veresterung z. B. mit Methan- oder Toluol-4-sulfonylchlorid vorgenommen werden. Bei der anschließenden Kondensationsreaktion mit den Aminen

der Formel IX arbeitet man vorteilhaft in Gegenwart einer mindestens zweifach molaren Menge des jeweils eingesetzten Amins pro derivatisierter Hydroxymethylgruppe; auch der Einsatz äquivalenter Mengen beider Reaktionspartner ist möglich, doch empfiehlt sich dann die Zugabe eines säurebindenden Mittels, z.B. eines Alkali- oder Erdalkalihydroxids oder -carbonats oder auch einer organischen Base, wie Triäthylamin oder Pyridin, in mindestens stöchiometrischer Menge. Die Umsetzung wird zweckmäßig in einem gegenüber den Reaktionspartnern inerten Lösungs- oder Verteilungsmittel durchgeführt. Hierfür kommen z.B. Alkohole, wie Methanol, Äthanol, Isopropanol, n-Propanol, die verschiedenen Butanole, sowie Gemische derselben, oder auch deren Mischungen mit Äthern, wie Tetrahydrofuran und Dioxan, oder Kohlenwasserstoffen, wie Benzol, Toluol und Xylool, sowie aprotische Lösungsmittel, wie Pyridin, Dimethylformamid, Dimethylacetamid, Dimethylsulfoxid und Hexamethylphosphorsäuretriamid in Frage. Die Reaktion wird im allgemeinen bei Temperaturen zwischen etwa 0°C und dem Siedepunkt des jeweiligen Lösungsmittels, vorzugsweise zwischen etwa 20 und 100°C durchgeführt, wobei die Reaktionszeit bis zu mehreren Stunden betragen kann.

Zur Einführung der Aminomethylgruppen gemäß Formel II in die Verbindungen der Formel I, in der R¹ für Wasserstoff steht, entsprechend Verfahrensweise e) bedient man sich im Falle der Umsetzungen mit primären und insbesondere sekundären Aminen der Formel IX vorteilhaft der aus der Literatur hinlänglich bekannten Mannich-Reaktion (z. B. Houben-Weyl, Bd. XI/1 [1957], S. 755–763). Der an der Umsetzung beteiligte Formaldehyd kann sowohl in monomerer Form als wäßrige Lösung oder in polymerer Form als Feststoff (z. B. Paraformaldehyd) eingesetzt werden. Im allgemeinen arbeitet man mit einer 4- bis 10fach molaren Menge an Formaldehyd und einem bis zu 40fach molaren Überschuss an dem jeweiligen Amin, das auch in Form seiner Hydrohalogenide zur Reaktion gebracht werden kann. Als Reaktionsmedium dienen bevorzugt Wasser oder Alkohole, wie Methanol, Ethanol oder Propanol, oder deren Gemische. Die Umsetzung erfolgt vorzugsweise bei Temperaturen zwischen etwa 20°C und 100°C, wobei Reaktionszeiten von einer Stunde bis zu mehreren Tagen benötigt werden.

Die Kondensation mit den N-Hydroxymethylacetamiden der Formel X bietet den bevorzugten Weg zur Einführung des am Stickstoffatom unsubstituierten Aminoethylrestes. Als Kondensationsmittel kommen Säuren, wie etwa Methansulfinsäure oder Gemische von konzentrierter Schwefelsäure und Eisessig, in Frage, die gleichzeitig als Reaktionsmedium dienen können, wobei die Umsetzung in der Regel zwischen etwa 0°C und Raumtemperatur abläuft und innerhalb von 30 Minuten bis 6 Stunden beendet ist. Die Abspaltung des Acylrestes aus den primär gebildeten N-acylierten Aminomethylverbindungen erfolgt nach dem Fachmann hinlänglich bekannten Standardverfahren durch saure Hydrolyse, wobei sich das Arbeiten in wäßriger Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff- oder Schwefelsäure bei erhöhter Temperatur, vorzugsweise beim Siedepunkt des jeweiligen Reaktionsmediums, besonders bewährt.

Die erfindungsgemäßen 7H-Thiazolo[3,2-b][1,2,4]-triazin-7-one der Formel I und deren entsprechende Säureadditionssalze eignen sich aufgrund ihrer wertvollen pharmakologischen Eigenschaften bei gleichzeitig hervorragender Verträglichkeit in besonderer Weise für die Verwendung als Wirkstoffe in Arzneimitteln, insbesondere in solchen zur Behandlung von entzündlich rheumatischen Erkrankungen. Sie können entweder für sich allein, beispielsweise in Form von Mikrokapseln, in Mischungen miteinander oder in Kombination mit geeigneten Hilfs- und/oder Trägerstoffen verabreicht werden.

Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, die aus mindestens einer Verbindung der Formel I und/oder mindestens einem von deren entsprechenden Säureadditionssalzen bestehen oder mindestens einen dieser Wirkstoffe neben pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoffen, Verdünnungsmitteln und/oder anderen Hilfsstoffen enthalten.

Die erfindungsgemäß hergestellten Arzneimittel können oral, topisch, rektal oder gegebenenfalls auch parenteral appliziert werden, wobei die orale Anwendung bevorzugt ist.

Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro)Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen sowie Präparate mit protrahierter Wirkstofffreigabe, bei deren Herstellung üblicherweise Hilfsmittel, wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel oder Lösungsvermittler, Verwendung finden. Als häufig verwendete Hilfsstoffe seien z.B. Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Cellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle, Polyäthylenglykole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, z.B. Glycerin, genannt.

Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine bestimmte Dosis mindestens einer Verbindung gemäß Formel I und/oder mindestens eines entsprechenden Säureadditionssalzes enthält. Bei festen Dosierungseinheiten, wie Tabletten, Kapseln, Dragees oder Suppositorien, kann diese Dosis bis zu etwa 800mg, bevorzugt jedoch etwa 100 bis 500mg betragen.

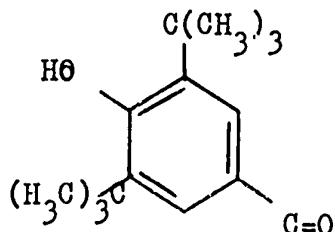
Für die Behandlung eines an entzündlich rheumatischen Erkrankungen leidenden, erwachsenen Patienten sind – je nach Wirksamkeit der Verbindungen gemäß Formel I und/oder der entsprechenden Säureadditionssalze am Menschen – Tagesdosen von etwa 100 bis 2000mg Wirkstoff, vorzugsweise etwa 300 bis 1000mg, bei oraler Verabreichung indiziert. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Tagesdosen angebracht sein. Die Verabreichung der Tagesdosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber mehrerer kleinerer Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

Schließlich können die Verbindungen der Formel I und die entsprechenden Säureadditionssalze bei der Herstellung der vorgenannten galenischen Zubereitungsformen auch zusammen mit anderen geeigneten Wirkstoffen, beispielsweise Antiuricopathika, Thrombocytenaggregationshemmern, Analgetika und anderen steroidalen oder nichtsteroidalen Antiphlogistika, formuliert werden.

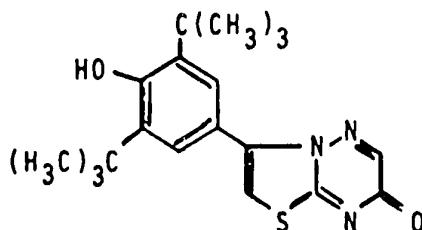
Die Struktur aller nachstehend beschriebenen Verbindungen wurde durch Elementaranalyse und IR- sowie ¹H-NMR-Spektren gesichert. Die gemäß den nachfolgenden Beispielen 1 bis 5 bzw. 12 und 13 sowie die auf analoge Weise hergestellten Verbindungen der Formel I sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Ausführungsbeispiele**Beispiel 1****3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on**

nach Verfahrensweise a)

a₁) 2-Brom-1-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon

206 g (0,83 mol) 1-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon wurden unter Rühren in 415 ml Methylenchlorid gelöst, zum Sieden erhitzt und innerhalb von 30 Minuten tropfenweise mit 144 g (0,9 mol) Brom versetzt. Danach wurde für weitere 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt, die Mischung abgekühlt, mit 400 ml Wasser versetzt, die organische Phase abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter verminderter Druck wurde das erhaltene feste Rohprodukt aus 540 ml Methylcyclohexan umkristallisiert.

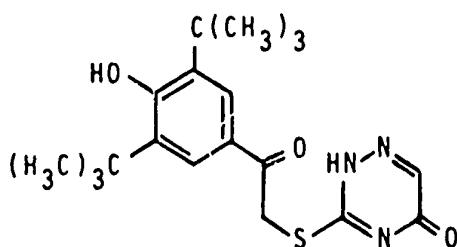
Ausbeute: 191 g (67% der Theorie)**Schmelzpunkt:** 105–108°C $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{BrO}_2$ (Mg = 327,3)a₂) 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on

197 g (0,6 mol) 2-Brom-1-(3,5-di-tert.-butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon aus Stufe a₁) und 80 g (0,62 mol) 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-on wurden in 700 ml Eisessig 4 Stunden bei 90°C gerührt. Danach ließ man die Reaktionsmischung langsam erkalten und saugte den gebildeten kristallinen Niederschlag ab, der anschließend mit Wasser gewaschen und dann in 1000 ml Wasser bei maximal 90°C für 30 Minuten ausgerührt wurde. Die Umkristallisation des noch wasserfeuchten Kristallbreies erfolgte aus 7000 ml Äthanol.

Ausbeute: 171,6 g (80% der Theorie)**Schmelzpunkt:** 257°C (Zers.) $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ (Mg = 357,5)**Analyse:** Berechnet: C 63,84% H 6,49% N 11,75% S 8,99%

Gefunden: C 63,55% H 6,44% N 12,03% S 9,00%

nach Verfahrensweise b)

b₁) 3-[3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenacyl]-thio]-2H-1,2,4-triazin-5-on

Zu einer Suspension von 12,9 g (0,1 mol) 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-on in 250 ml Wasser gab man 5,3 g (0,05 mol) Natriumcarbonat und rührte 30 Minuten, tropfte dann eine Lösung von 32,7 g (0,1 mol) 2-Brom-1-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon in 250 ml Methanol zu und hielt das Reaktionsgemisch für 1 Stunde auf 75°C. Nach dem Abkühlen filtrierte man den angefallenen Niederschlag ab und kristallisierte aus Essigsäureäthylester um.

Ausbeute: 26,6 g (71% der Theorie)
 Schmelzpunkt: 209–211°C
 $C_{19}H_{25}N_3O_3S$ (MG = 375,5)

Analyse: Berechnet: C 60,78% H 6,71% N 11,19% S 8,54%
 Gefunden: C 60,45% H 6,82% N 11,06% S 8,68%

b₂) 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on

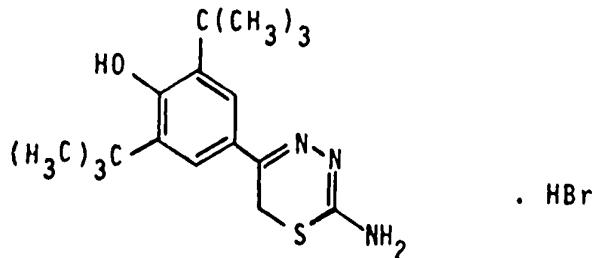
3,7 g (0,01 mol) 3-[3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenacyl]-thio-2H-1,2,4-triazin-5-on aus Stufe b₁) wurden in einer Mischung aus 60 ml Tetrahydrofuran und 50 ml 2 N Salzsäure 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das langsam ausgeschiedene Cyclökondensationsprodukt wurde abfiltriert und ein- bis dreimal aus Tetrahydrofuran/Äthan (3:2) umkristallisiert.

Ausbeute: 1,5 g (42% der Theorie)
 Schmelzpunkt: 256–27°C (Zers.)
 $C_{19}H_{23}N_3O_2S$ (MG = 357,5)

Analytische und spektroskopische Daten bestätigten die Identität des gewonnenen Produktes mit der nach Verfahrensweise a) hergestellten Verbindung.

nach Verfahrensweise c)

c₁) 2-Amino-5-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-6H-1,3,4-thiadiazin-hydrobromid



Eine Lösung von 32,7 g (0,1 mol) 2-Brom-1-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon (Beispiel 1a₁) und 9,1 g (0,1 mol) Thiosemicarbazid in 250 ml Eisessig wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert und in 500 ml Äthan gelöst. Nach dem Abkühlen wurden die Kristalle abgesaugt, mehrmals mit Essigsäureäthylester gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 27,2 g (68% der Theorie)
 Schmelzpunkt: 255–257°C
 $C_{19}H_{26}BrN_3OS$ (MG = 400,4)

Analyse: Berechnet: C 51,00% H 6,55% Br 19,96% N 10,49% S 8,01%
 Gefunden: C 50,71% H 6,52% Br 19,92% N 10,46% S 8,17%

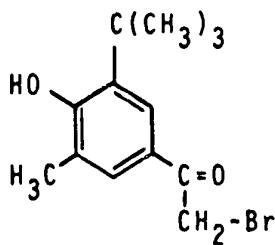
c₂) 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on

Zu einer Lösung von 10,0 g (0,025 mol) 2-Amino-5-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-6H-1,3,4-thiadiazin-hydrobromid aus Stufe c₁) in 250 ml Eisessig und 25 ml 4 N Salzsäure wurden bei 80°C 4,8 g (0,05 mol) Glyoxalsäure-monohydrat in 75 ml Wasser zugetropft. Nach 20ständigem Röhren bei 80°C wurde unter verminderter Druck eingedampft. Der feste Rückstand ließ sich vorteilhaft durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Methylchlorid/Methanol (25:1) als Fließmittel und anschließende Umkristallisation aus Äthan reinigen und erwies sich aufgrund der analytischen und spektroskopischen Untersuchungen identisch mit dem nach den Verfahrensweisen a) und b) hergestellten Produkt.

Ausbeute: 3,9 g (42% der Theorie)
 Schmelzpunkt: 255–256°C (Zers.)
 $C_{19}H_{23}N_3O_2S$ (MG = 357,5)

Beispiel 2: 3-(3-tert.Butyl-5-methyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]-triazin-7-on

a₁) 2-Brom-1-(3-tert.butyl-5-methyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon



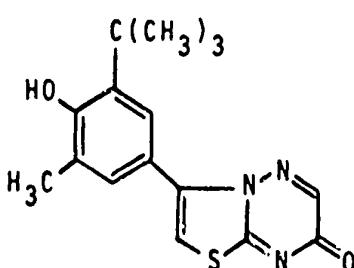
Eine zum Sieden erhitzte Suspension von 179 g (0,8 mol) Kupfer(II)bromid in 360 ml Essigsäureäthylester wurde unter Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 82,5 g (0,4 mol) 1-(3-tert.Butyl-5-methyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon in 360 ml Chloroform versetzt. Anschließend wurde bis zur Beendigung der Bromwasserstoffentwicklung 4 Stunden lang unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Kupfersalze abgesaugt, der Filterrückstand mehrmals mit Essigsäureäthylester gewaschen, das Filtrat unter verminderter Druck eingeengt und der feste Rückstand aus Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 81,9 g (72 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 90–92 °C

$C_{13}H_{17}BrO_2$ (MG = 285,2)

a₂) 3-(3-tert.Butyl-5-methyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on



Eine Lösung aus 28,5 g (0,1 mol) 2-Brom-1-(3-tert.butyl)-5-methyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon aus Stufe a₁) und 12,9 g (0,1 mol) 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-on wurden in 250 ml Äthanol 8 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der feste Rückstand in 200 ml siedendem Essigsäureäthylester gelöst und heiß filtriert. Beim Einengen des Filtrats fielen farblose Kristalle an, die nochmals aus Isopropanol umkristallisiert wurden.

Ausbeute: 18,9 g (61 % der Theorie)

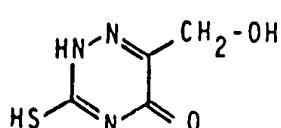
Schmelzpunkt: 225–226 °C (Zers.)

$C_{16}H_{17}N_3O_2S$ (MG = 315,4)

Analyse: Berechnet: C 59,23 % H 8,08 % N 12,95 % S 9,88 %
Gefunden: C 59,51 % H 8,1 % N 12,83 % S 9,82 %

Beispiel 3: 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-6-hydroxymethyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on

a₁) 6-Hydroxymethyl-3-mercaptop-2H-1,2,4-triazin-5-on



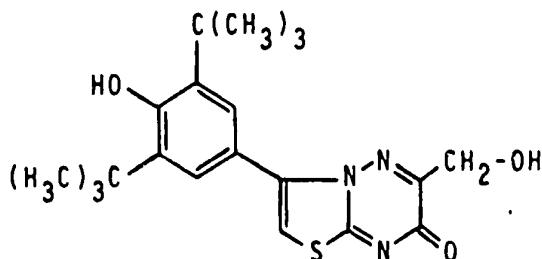
4,0 g (0,18 mol) Lithiumborhydrid wurden in 100 ml wasserfreies Tetrahydrofuran suspendiert und unter Rühren und Eiskühlung mit einer Lösung von 19,0 g (0,094 mol) 6-Äthoxycarbonyl-3-mercaptop-2H-1,2,4-triazin-5-on in 40 ml absolutes Tetrahydrofuran tropfenweise versetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch 4 Stunden lang unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen gab man unter weiterem Rühren portionsweise Wasser hinzu und stellte die Mischung nach Beendigung der Wasserstoff-Entwicklung mit 10%iger Schwefelsäure auf pH 1 ein. Nach dem Abdampfen des Tetrahydrofurans unter verminderter Druck wurde die Lösung mit Essigsäureäthylester mittels eines Perforators extrahiert. Eindampfen der über Natriumsulfat getrockneten organischen Phase und Umkristallisation des festen Rückstandes aus Wasser lieferte das Produkt in Form gelber Nadeln.

Ausbeute: 9,5 g (63 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 233–235 °C

$C_6H_5N_3O_2S$ (MG = 159,2)

a₂) 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-6-hydroxymethyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on



14,4 g (0,044 mol) 2-Brom-1-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon (Beispiel 1 a₁) und 7,0 g (0,044 mol) 6-Hydroxymethyl-3-mercaptop-2H-1,2,4-triazin-5-on aus Stufe a₁) werden in 300 ml Äthanol 4 Stunden zum Sieden erhitzt. Das unter reduziertem Druck eingeengte Reaktionsgemisch wurde in 300 ml Chloroform gelöst und mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung behandelt. Die Chloroformphase wurde schließlich abgetrennt, getrocknet und eingeengt. Filtration des Rohprodukts über Kieselgel mit Essigester/Methanol (99:1) als Fließmittel lieferte farblose Nadeln.

Ausbeute: 11,1 g (65 % der Theorie)

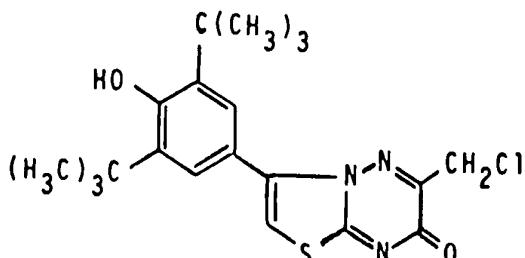
Schmelzpunkt: 215–217 °C

C₂₀H₂₆N₃O₃S (MG = 387,5)

Analyse: Berechnet: C 61,99 % H 6,50 % N 10,84 % S 8,27 %
Gefunden: C 61,98 % H 6,65 % N 10,75 % S 8,25 %

Beispiel 4: 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-6-pyrrolidinomethyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on-hydrochlorid
(nach Verfahrensweise d))

d₁) 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-6-chlormethyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on



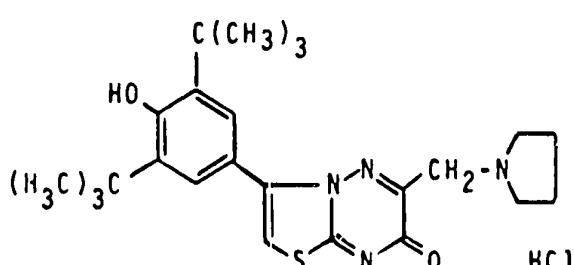
9,5 g (0,025 mol) des Thiazolo-triazinons gemäß vorgenanntem Beispiel 3a₂ wurden in 230 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und nach Zugabe von 2,1 ml Pyridin mit 7,0 g (0,06 mol) Thionylchlorid tropfenweise versetzt. Nach einstündigem Erhitzen unter Rückfluß und Abkühlen auf Raumtemperatur fügte man 200 ml Diäthyläther hinzu und ließ im Kühlschrank über Nacht stehen. Das ausgefallene Kristallat wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 6,7 g (66 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 238–240 °C

C₂₀H₂₄CIN₃O₂S (MG = 405,9)

d₂) 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-6-pyrrolidinomethyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on-hydrochlorid



Eine Lösung von 6,7 g (0,017 mol) der Chlormethyl-Verbindung aus Stufe d₁) in 100 ml Methylenchlorid wurde nach Zugabe von 2,5 g (0,035 mol) Pyrrolidin 2,5 Stunden zum Sieden erhitzt, danach abgekühlt, zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Bildung des Hydrochlorids eine äquimolare Menge äthanolischer Salzsäure hinzugegeben. Das kristallin angefallene Rohprodukt wurde abfiltriert und aus einem Isopropanol/Essigsäureäthylester-Gemisch (1:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 4,2 g (52 % der Theorie)

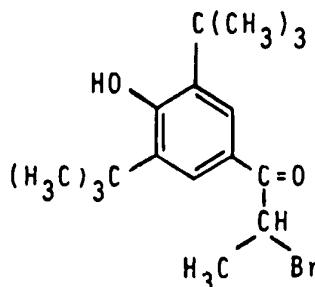
Schmelzpunkt: 222–223 °C

C₂₄H₃₃CIN₄O₂S (MG = 477,1)

Analyse: Berechnet: C 60,42% H 6,97% Cl 7,43% N 11,74% S 6,72%
 Gefunden: C 60,46% H 7,25% Cl 7,24% N 11,49% S 6,45%

Beispiel 5: 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-2,6-dimethyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on

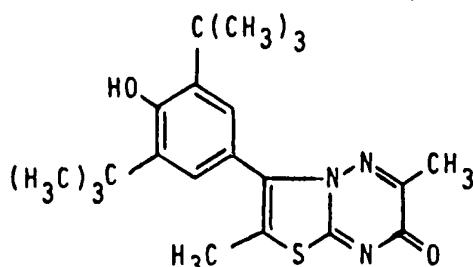
a₁) 2-Brom-1-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-propanon



Zu einer siedenden Suspension von 139,0 g (0,62 mol) Kupfer-II-bromid in 300 ml Essigsäureäthylester tropfte man unter Rühren eine Lösung von 82,0 g (0,31 mol) 1-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-propanon in 300 ml Chloroform. Anschließend wurde bis zur Beendigung der Bromwasserstoff-Entwicklung 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Kupfersalze abgesaugt, der Filterrückstand zweimal mit Essigsäureäthylester nachgewaschen und das Filtrat unter verminderter Druck eingengegt. Die Umkristallisation des festen Rückstandes erfolgte aus Petroläther (40–60°C).

Ausbeute: 87,5 g (82 % der Theorie)
 Schmelzpunkt: 130–132°C
 $C_{17}H_{25}BrO_2$ (MG = 341,3)

a₂) 3-(3,5-Di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-2,6-dimethyl-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on



17,1 g (0,05 mol) 2-Brom-1-(3,5-di-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-propanon aus Stufe a₁) und 7,2 g (0,05 mol) 3-Mercapto-6-methyl-2H-1,2,4-triazin-5-on wurden in 60 ml Eisessig 4 Stunden bei 90°C gerührt. Das unter reduziertem Druck eingedampfte Reaktionsgemisch wurde in 300 ml Chloroform gelöst und mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung behandelt.

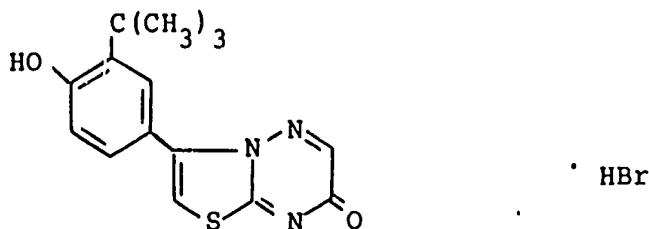
Nach Abtrennen, Trocknen und Einengen der Chloroformphase erfolgte zweimaliges Umkristallisieren aus Isopropanol.

Ausbeute: 10,8 g (56 % der Theorie)
 Schmelzpunkt: 256–257 %
 $C_{21}H_{27}N_3O_2S$ (MG = 385,5)

Analyse: Berechnet: C 65,42% H 7,06% N 10,90% S 8,32%
 Gefunden: C 65,11% H 7,15% N 10,75% S 8,16%

Beispiel 12: 3-(3-Aminomethyl-5-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on-hydrochlorid
 (nach Verfahrensweise e))

e₁) 3-(3-Tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on-hydrobromid



Gemäß Verfahrensweise a₂) wurden 47,5 g (0,175 mol) 2-Brom-1-(3-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-äthanon und 20,6 g (0,16 mol) 3-Mercapto-2H-1,2,4-triazin-5-on in 190 ml Eisessig 1 Stunde bei 90°C gerührt. Der beim Erkalten anfallende Niederschlag wurde abgesaugt und aus einem Gemisch von Essigsäureäthylester/Äthanol umkristallisiert.

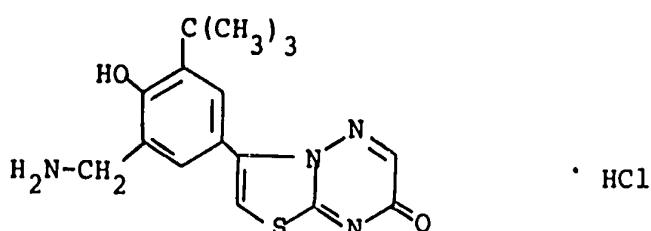
Ausbeute: 44,0 g (72% der Theorie)

Schmelzpunkt: 250–252 °C (Zers.)

C₁₆H₁₆BrN₃O₂S (MG = 382,3)

Analyse: Ber.: C 47,13% H 4,22% Br 20,89% N 10,98% S 8,36%
Gef.: C 47,22% H 4,25% Br 20,43% N 11,17% S 8,60%

e₂) 3-(3-Aminomethyl-5-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on-hydrochlorid



Eine auf 5°C gekühlte Lösung von 15,1 g (0,05 mol) 3-(3-Tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on in 240 ml Methansulfonsäure wurde portionsweise mit 7,1 g (0,005 mol) 2,2,2-Trifluor-N-(hydroxymethyl)-acetamid versetzt und anschließend 3 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung in 1 l Eisswasser eingerührt und der Kristallbrei abgesaugt.

Zur Abspaltung der Trifluoracetylgruppe erhielt man die erhaltene N-acylierte Aminomethyl-Verbindung in 600 ml 6 N-Salzsäure 1 Stunde unter Rückfluß. Die salzaure Lösung wurde heiß filtriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand aus Essigsäureäthylester/Methanol fraktioniert umkristallisiert.

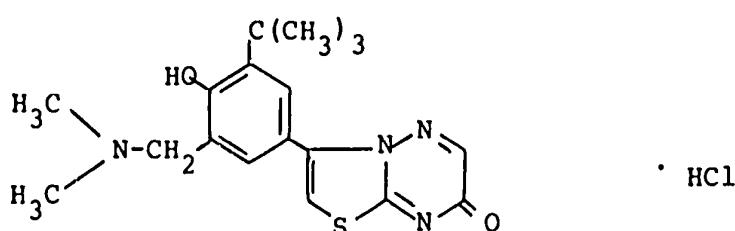
Ausbeute: 8,4 g (46% der Theorie)

Schmelzpunkt: 210–212 °C

C₁₆H₁₉ClN₄O₂S (MG = 366,9)

Analyse: Ber.: C 52,38% H 5,22% Cl 9,66% N 15,27% S 8,74%
Gef.: C 51,55% H 5,40% Cl 9,17% N 14,98% S 8,54%

Beispiel 13: 3-(3-Dimethylaminomethyl-5-tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on-hydrochlorid
(nach Verfahrensweise e))



12,8 ml (0,28 mol) einer 40%igen wäßrigen Dimethylamin-Lösung wurden tropfenweise unter Eiskühlung zu 6,4 ml (0,086 mol) einer 37%igen wäßrigen Formaldehyd-Lösung gegeben. Nach Zusatz von 4,2 g (0,011 mol) 3-(3-Tert.butyl-4-hydroxyphenyl)-7H-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazin-7-on-hydrobromid aus Beispiel 12, Stufe e₁) und 70 ml Äthanol erhielt man 19 Stunden zum Sieden. Nach dem Erkalten wurde 2 N Natronlauge zugetropft, bis sich die Mannich-Base abschied. Diese wurde abgesaugt, zur Bildung des Hydrochlorids eine äquimolare Menge äthanolischer Salzsäure hinzugegeben und abschließend aus Wasser umkristallisiert.

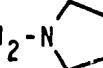
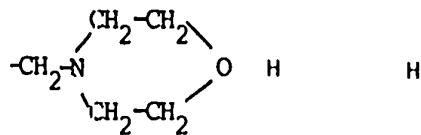
Ausbeute: 3,0 g (69% der Theorie)

Schmelzpunkt: 260–261 °C

C₁₈H₂₃ClN₄O₂S (MG = 394,9)

Analyse: Ber.: C 54,75% H 5,87% Cl 8,98% N 14,19% S 8,12%
Gef.: C 54,58% H 5,89% Cl 9,22% N 13,90% S 8,11%

Tabelle 1: Verbindungen gemäß Formel I (siehe Anspruch 1)

| Beispiel | R ¹ | R ² | R ³ | Schmelzpunkt °C |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1 | (H ₃ C) ₃ C- | H | H | 257 (Zers.) |
| 2 | H ₃ C- | H | H | 225-226 (Zers.) |
| 3 | (H ₃ C) ₃ C- | H | -CH ₂ -OH | 215-217 |
| 4 | (H ₃ C) ₃ C- | H | -CH ₂ -N  | 222-223 |
| | | | | (als Hydrochlorid) |
| 5 | (H ₃ C) ₃ C- | -CH ₃ | -CH ₃ | 256-257 |
| 6 | (H ₃ C) ₃ C- | H | -CH ₃ | 219-220 |
| 7 | (H ₃ C) ₃ C- | -CH ₃ | H | 249-251 |
| 8 | (H ₃ C) ₃ C- | H | -CH ₂ -CH ₃ | 240-242 |
| 9 | (H ₃ C) ₃ C- | H | -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ | 216-217 |
| 10 | (H ₃ C) ₃ C- | H | -CH(CH ₃) ₂ | 237-238 |
| 11 | H ₃ C- | H | -CH ₃ | 232-233 |
| 12 | H ₂ N-CH ₂ - | H | H | 210-212 (als Hydrochlorid) |
| 13 | (H ₃ C) ₃ N-CH ₂ - | H | H | 260-261 (als Hydrochlorid) |
| 14 | (H ₅ C ₂) ₂ N-CH ₂ - | H | H | 234-236 (als Hydrochlorid) |
| 15 |  N-CH ₂ - | H | H | 238-240 |
| | | | | (als Hydrochlorid) |
| 16 |  | | H | 177-179 |
| | | | | (als Hydrochlorid) |

Pharmakologische Prüfung und Ergebnisse

Die Prüfung der erfundungsgemäßen Verbindungen der Formel I auf antiphlogistische Wirkung, Beeinflussung immunpathologischer Prozesse, Sauerstoffradikale desaktivierende Potenz, ulzerogene Aktivität und akute Toxizität erfolgte in den anschließend beschr. ebenen Tiermodellen, wobei das in der Rheumatherapie zu den Standardpräparaten der ersten Wahl zählende Antiphlogistikum Naproxen (2-(6-Methoxy-2-naphthyl)-propionsäure) als Vergleichssubstanz in die Untersuchungen miteinbezogen wurde.

1. Adjuvans-Arthritis

Die Untersuchungen wurden nach der Methode von Pearson (Arthrit. Rheum. 2 [1959] S.44) durchgeführt. Als Versuchstiere dienten männliche Ratten eines Wistar-Lewis-Stammes mit einem Körpergewicht zwischen 130 und 200g. Die zu prüfenden Verbindungen wurden in Dosen von 50mg pro kg Körpergewicht einmal täglich vom 1. bis zum 5. Versuchstag oral (p. o.) appliziert. Die Tiere einer Kontrollgruppe erhielten nur das Vehikel. Jede Präparat- und die Kontrollgruppe umfaßte 8 Tiere. Als Wirkungskriterium diente die prozentuale Herabsetzung der Pfotenvolumenzunahme gegenüber jener der unbehandelten Kontrollgruppe.

2. Akute gastrale Ulzerogenität

Die Untersuchung erfolgte an jeweils 10 männlichen Sprague-Dawley Ratten mit durch Hungerstreß sensibilisierter Magenschleimhaut. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 200 und 300g. 48 Stunden vor Applikation der Prüfpräparate bis zum Töten der Tiere wurde bei freiem Zugang zum Trinkwasser das Futter entzogen. Die Ratten wurden 24 Stunden nach oraler Substanzgabe getötet, die Mägen entnommen, unter fließendem Wasser gereinigt und auf Schleimhautläsionen inspiziert. Als Ulza galten alle makroskopisch sichtbaren Läsionen.

Bestimmt wurde die Anzahl der Tiere mit Ulzera je Dosis und daraus die UD_{50} -Werte, also jene Dosen, mit denen bei 50% der Tiere Läsionen hervorgerufen wurden, nach Litchfield und Wilcoxon (J. Pharmacol. exp. Ther. 96 [1949] S.99) berechnet.

3. Akute Toxizität

Die Bestimmung der LD_{50} -Werte erfolgte standardgemäß über die innerhalb von 7 Tagen bei NMRI(Naval Medical Research Institute)-Mäusen (6 Tiere pro dosi) nach einmaliger intraperitonealer (i. p.) Gabe auftretende Mortalität. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die die Überlegenheit der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I gegenüber dem Standardpräparat Naproxen eindeutig belegen, sind in der nachstehenden Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Antiphlogistische Wirkung, Ulzerogenität und akute Toxizität

| Verbindung aus Beispiel | Adjuvans-Arthritis (% Hemmung bei 50 mg/kg p. o.) | Akute Ulzerogenität UD_{50} (mg/kg) | Akute Toxizität LD_{50} (mg/kg) |
|-------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 67 | > 400* | > 1200 |
| 2 | 41 | > 400* | > 1200 |
| 3 | 41 | > 200* | > 1200 |
| 6 | 50 | > 200* | > 1200 |
| 9 | 45 | > 200* | > 1200 |
| Naproxen | 55 | 23 | 500 |

* jeweils verabreichte Höchstdosis

Aus der Dosiswirkungskurve im Modell der Adjuvans-Arthritis ergab sich beispielsweise für die Verbindung aus Beispiel 1 ein ED_{50} -Wert von 10,9 mg/kg, der deutlich günstiger als der entsprechende Vergleichswert von 17,5 mg/kg für das Standardpräparat Naproxen liegt. Bezogen auf die akute Ulzerogenität errechnet sich daraus durch die Quotientenbildung von UD_{50} zu ED_{50} eine therapeutische Breite von > 36,7 für die Verbindung des Beispiels 1, die beim Vergleichspräparat Naproxen nur 1,3 beträgt, womit besonders eindrucksvoll unterstrichen wird, welch hoher Stellenwert der außerordentlich guten gastralen Verträglichkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen zukommt. Eine ebenso eindeutige Überlegenheit gegenüber der Vergleichsverbindung ergibt sich, wenn man bei der Berechnung der therapeutischen Breite die ermittelten LD_{50} -Werte zugrunde legt und den Quotienten LD_{50}/ED_{50} bildet, der für die Verbindung des Beispiels 1 über 110 und für Naproxen bei 28,6 liegt. Auch in weiteren speziellen Versuchen erwiesen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen dem Standardpräparat Naproxen eindeutig überlegen.

4. Hemmung immunpathologischer Prozesse

Es ist heute allgemein bekannt, daß der progrediente Verlauf der entzündlich rheumatischen Erkrankungen hauptsächlich durch Entgleisungen im Immunsystem verursacht wird und daß eine kausale Therapie nur mit solchen Medikamenten gelingen kann, die diese immunpathologischen Prozesse zu durchbrechen vermögen.

a) Adjuvans-Arthritis

In dem unter Punkt 1 beschriebenen Rattenmodell der mit Freundschem Adjuvans induzierten Arthritis ist gewöhnlich die Immunaktivität der Lymphocyten gegenüber bestimmten Mitogenen, wie Concavalin-A, Phytohämagglutinin-A und Dextransulfat, drastisch herabgesetzt. Es wurde daher die stimulierende Wirkung auf diese stark supprimierte Immunantwort untersucht. Hierbei bewirkte beispielsweise die Verbindung aus Beispiel 1 nach oraler Verabreichung von 3,15 und 6,3 mg/kg eine weitgehende Normalisierung der Immunreakтивität, während das in Dosen bis zu 25 mg/kg geprüfte Naproxen wirkungslos war.

b) Typ II-Collagen-Induzierte Arthritis

In diesem Versuch wurde die Arthritis an männlichen Wistar-Ratten mit Collagen vom Typ II ausgelöst, das sich nach Standardmethoden von Miller und Rhodes (Meth. Enzymol. 82 [1982] S.33) aus der Nasenscheidewand des Kalbes gewinnen ließ und den Tieren im Gemisch mit inkomplettem Freundschem Adjuvans intradermal injiziert wurde. Dieser Immunisierungsvorgang wurde 7 Tage später wiederholt. 20 Tage nach der Erstimmunisierung teilte man die erkrankten Ratten in Gruppen zu jeweils 7 Tieren auf, die in der anschließenden 20-tägigen Behandlungsphase einmal täglich die jeweilige Prüfsubstanz bzw. das reine Vehikel (Kontrollgruppe) oral erhielten.

Am 41. Versuchstag, also einen Tag nach der letzten Substanzgabe, wurde die Volumenzunahme beider Hinterpfoten bestimmt.

Hierbei zeigte etwa die Verbindung des Beispiels 1 eine dosisabhängige Hemmung der Pfotenvolumenzunahme, die ab Dosen von 25 mg/kg p. o. statistisch signifikant war, während sich für Naproxen in gleicher Dosierung nur nicht-signifikante Hemmwerte ergaben.

Auch in diesem Modell der Collagen-Arthritis ist der Immunstatus der Lymphocyten empfindlich gestört. Daher wurden aus der Milz der Versuchstiere Lymphocyten gewonnen und deren Immunaktivität gegenüber Mitogenen untersucht, wobei sich wiederum für die erfindungsgemäßen Verbindungen dosisabhängige kurative Effekte auf das stark geschwächte Immunsystem nachweisen ließen, während Naproxen keine Wirkung entfaltete. So wurde beispielsweise mit einer Dosis von 12 mg/kg p. o. der Verbindung aus Beispiel 1 die Immunfunktion sowohl der T- als auch der B-Lymphocyten vollständig normalisiert.

c) Aktive Arthus-Reaktion

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 80 und 100 g, denen 0,5 ml einer Emulsion von Pertussis-Vakzine und Ovalbumin in Paraffinöl subkutan in die Schwanzwurzel injiziert wurde. Nach zwei Wochen wurden die Ratten in Gruppen von jeweils 8 Tieren aufgeteilt. 24 Stunden und eine Stunde vor Auslösung der

Arthus-Reaktion durch Injektion von 0,1 ml einer 0,4%igen Ovalbumin-Lösung in die rechte Hinterpfote erfolgte die orale Verabreichung der jeweiligen Prüfsubstanz oder des reinen Vehikels (Positivkontrolle). In die linke Pfote wurde Natriumchlorid-Lösung injiziert. Eine Gruppe nicht-sensibilisierter Tiere (Negativkontrolle) wurde gleichfalls mit Ovalbumin behandelt, um unspezifische Reaktionen gegenüber dem Protein ausschließen zu können.

Als Meßparameter für die Präparatewirkung diente die Hemmung der Pfotenvolumenzunahme gegenüber jener der zwar sensibilisierten, aber unbehandelten Kontrollgruppe (Positivkontrolle) 4 Stunden nach der Ovalbumin-Provokation, wenn die Schwellung ihren Maximalwert erreicht.

Nicht-steroidale Antiphlogistika einschließlich Naproxen sind in dieser Versuchsanordnung wirkungslos. Demgegenüber ließ sich die Arthus-Reaktion nach oraler Verabreichung z.B. der Verbindung gemäß Beispiel 1 mit einer ED₅₀ zwischen 10 und 15 mg/kg eindrucksvoll hemmen.

5. Antioxydative Wirkung

Nach heutiger Lehrmeinung sind an dem multifaktoriell bedingten, progressiven Verlauf der rheumatischen Arthritis und anderer entzündlicher Erkrankungen aggressive Sauerstoffradikale maßgeblich beteiligt, die während des chronischen Entzündungsprozesses exzessiv gebildet werden und selbst als hochtoxische Entzündungsmediatoren die über eine irreversible Lipidperoxydation der Zellmembranen verlaufende Bindegewebszerstörung perpetuell unterhalten. Folglich sollten antioxydativ wirksame Pharmaka mit der Fähigkeit zur Desaktivierung dieser extrem cytotoxischen Sauerstoffradikale einen gezielten Eingriff in das chronische Entzündungsgeschehen gestatten. Ein geeignetes Tiermodell für eine derartige durch Sauerstoffradikale vermittelte Gewebszerstörung stellt die an der Ratte mit Adriamycin (Doxorubicin) induzierte Entzündung dar.

a) Adriamycin-induzierte Entzündung

Die Untersuchungen wurden nach der Methode von D. M. Siegel et al. (Inflammation 4 [1980] S. 233) an männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 200 und 230 g in Gruppen von jeweils 7 Tieren durchgeführt, die 0,1 mg Adriamycin, gelöst in 0,1 ml 0,9%iger Kochsalzlösung, durch subkutane Injektion in die linke Hinterpfote erhielten.

72 Stunden danach wurde die Pfotenvolumenzunahme als Maß für den Entzündungsgrad durch plethysmographische Messung bestimmt.

Die orale Verabreichung der Prüfpräparate in 1%iger wässriger Carboxymethylcellulose-Suspension erfolgte einmal täglich an 4 aufeinanderfolgenden Tagen, beginnend mit dem Tag der Adriamycin-Injektion.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, zeigte auch in diesem Test beispielsweise die Verbindung aus Beispiel 1 einen starken, dosisabhängigen Schutzeffekt gegen die durch Adriamycin ausgelöste Gewebszerstörung. Sowohl steroidale als auch nichtsteroidale Antiphlogistika, einschließlich Naproxen, sind in dieser Versuchsanordnung unwirksam.

Tabelle 3: Hemmung der Adriamycin-induzierten Entzündung

| Tierkollektiv | Dosis in mg/kg p. o. | Pfotenvolumenzunahme in µml | Schutzwirkung in % |
|---------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| Kontrolle | - | 430 | - |
| Verbindung aus Beispiel 1 | 20 | 220 | 49* |
| | 40 | 200 | 54* |
| | 80 | 10 | 98* |

* Signifikanz $p < 0,05$.

b) In-vitro-Hemmung der Lipidperoxydation

Einen weiteren überzeugenden Beleg für die ausgeprägte Schutzwirkung der erfundungsgemäßen Verbindungen gegenüber den aggressiven Sauerstoffradikalen lieferte der Thiobarbitursäure-Test nach A. Ottolenghi (Arch. Biochem. Biophys. 79 [1959] S. 355-363). Mit dieser In-vitro-Methode lässt sich anhand des beim oxydativen Abbau membrangebundener, mehrfach ungesättigter Fettsäuren entstehenden Malondialdehyds die Beeinflussung sowohl der mikrosomalen als auch der mitochondrialen Lipidperoxydation durch antioxydativ wirksame Präparate bestimmen.

Auch hier übten die Verbindungen der Formel I eine starke Hemmwirkung aus. Für die Verbindung des Beispiels 1 ergaben sich mit Mikrosomen und Mitochondrien aus der Rattenleber beispielsweise IC₅₀-Werte von $6 \cdot 10^{-7}$ bzw. $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

6. Hemmung der 5-Lipoxygenase

Die Hemmwirkung der erfundungsgemäßen Verbindungen auf den durch die 5-Lipoxygenase katalysierten Arachidonsäure-Abbau wurde, wie üblich, in In-vitro-Versuchen an isolierten polymorphkernigen Humangranulozyten nachgewiesen. Hierzu wurden die durch den Calcium-Ionophor A23187 (Calbiochem GmbH, Frankfurt [Main], BRD, Biochemical and Immunochemical Catalog 1985, S. 284) stimulierten Zellen mit ¹⁴C-markierter Arachidonsäure inkubiert und die nach 15 Minuten bei 37°C durch Biotransformation gebildeten radioaktiven Hauptabbauprodukte der Arachidonsäure, die 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) und das besonders stark proinflammatorisch wirkende Leukotrien B₄ (LTB₄), nach Auftrennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Hilfe eines Radio-Monitors quantitativ bestimmt.

In dieser Versuchsanordnung ließ sich die Bildung sowohl von LTB₄ als auch 5-HETE und demzufolge der Arachidonsäure-Abbau über die 5-Lipoxygenase durch 15minütige Vorinkubation der Granulozyten etwa mit der Verbindung des Beispiels 1 im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-5} und 10^{-6} mol/l signifikant hemmen.