



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 135030

(51) Int. Cl.² C 07 D 417/06

(21) Patentsøknad nr. 4579/72

(22) Inngitt 12.12.72

(23) Løpedag 03.05.72

(62) Avdelt fra søknad nr. 1550/72

(41) Alment tilgjengelig fra 07.11.72

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 18.10.76

(30) Prioritet begjært 04.05.71, Japan, nr. 29545/71, 29546/71, 29547/71

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte ved fremstilling av terapeutisk aktive thiazolderivater.

(71)(73) Søker/Patenthaver KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA,
No. 8, Horidome-cho, 1-chome, Nihonbashi,
Chuo-ku, Tokyo,
Japan.

(72) Oppfinner SABURO UENO,
TAKAO KAWASAKI,
DAISAKU INMARU,
YOSHIAKI OHSAKA,
KOUJI SATOMI,
OSAMU OHTAKE, Tokyo,
AKIO SASAKI, Saitama-ken,
Japan.

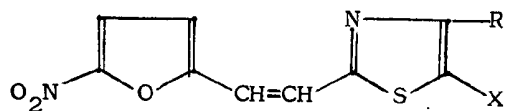
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor A-S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører nye nitrofuransubstituerte thiazolderivater. Mer spesielt vedrører oppfinnelsen 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthianol-derivater.

Et antall nitrofuranderivater har vært foreslått for anvendelse som midler til å inhibere vekst av mikroorganismer. Kjente nitrofuranderivater utviser utmerket antimikrobiell aktivitet, demonstrert ved forsøk in vitro. Imidlertid har de en tendens til å tape sin antimikrobielle aktivitet når de anvendes i kombinasjon med mercaptoforbindelser eller proteinholdige materialer. F.eks. når 1 mol nitrofurazon oppvarmes med 10 mol cystein og 0,1 mol FeSO_4 , doseres den antimikrobielle effekt overfor *Bacillus subtilis* til 0,1 av det originale nivå. Når 1 mol 5-nitrofurylacrylamid oppvarmes med 10 mol cystein og 0,5 mol FeSO_4 , reduseres den antimikrobielle aktivitet til 1/20 av det opprinnelige nivå.

2-(5-nitrofurylvinyl)-4-alkyl-5-substituerte thiazolderivater som nylig er blitt utviklet og åpenbart innen teknikkens stand kan representeres av den generelle formel:



hvor R representerer alkyl, og X er en acetyl-, nitro- eller carbonylgruppe. Tidligere kjente nitrofuranderivater utviser en selektiv antimikrobiell aktivitet og har vist seg nyttige innen mange anvendelsesområder som antimikrobielle midler. Imidlertid utviser også disse en tendens til å tape den antimikrobielle aktivitet når de anvendes i kombinasjon med mercaptoforbindelser eller proteinholdig materiale. Slike deaktiverende substanser er ofte tilstede i omgivelsen hvor antimikrobielle midler anvendes. Følgelig kan effektiviteten ved praktisk anvendelse av disse antimikrobielle midler ventes å bli mindre enn det som vist ved forsøk in vitro.

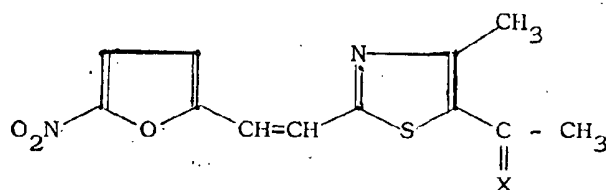
135030

2

Der er således innen teknikkens stand et behov for en ny type antimikrobielt middel som kan motstå en reduksjon av den antimikrobielle aktivitet som følge av tilstedeværelse av mercaptoforbindelser eller proteinholdige materialer.

Der er nu funnet at visse 2-(5-nitrofurylviny)-4-methyl-5-acetylthiazol-derivater utviser den nødvendige antimikrobielle aktivitet kombinert med god lysstabilitet, høy oppløselighet og motstandsevne mot den nøytraliserende effekt av mercaptoforbindelser eller proteinholdige materialer.

De nye 2-(5-nitrofurylviny)-4-methyl-5-acetylthiazol-derivater som fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse omfattes av den generelle formel:



hvor X har betydningen NCH_3 , N-OCOCH_3 , N-NH-C(=O)-NH_2 , N-NH-C(=S)-NH_2 eller

N-NH-C(=O)-NH-A , hvor A er et anion av syren HA. Eksempler på anion A

innbefatter halogen og sulfatanioner.

Disse 2-(5-nitrofurylviny)-4-methyl-5-acetylthiazol-derivater har en sterk antimikrobiell aktivitet og lav toksisitet i varmblodige dyr. Disse antimikrobielle midler er nyttige som kjemoterapeutiske midler.

Forbindelsene fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse ved at

- 2-(5-nitrofurylviny)-4-methyl-5-acetylthiazol omsettes, i nærvær av et organisk oppløsningsmiddel og ved $50 - 150^\circ\text{C}$, med hydroxylamin, semicarbazid, thiosemicarbazid eller et syreaddisjonssalt av aminoguanidin, eller
- 2,4-dimethyl-5-acetyldiazol omsettes med hydroxylamin, semicarbazid, thiosemicarbazid eller et syreaddisjonssalt av aminoguanidin og reaksjonsproduktet derefter omsettes med 5-nitrofurfural eller dets diacetat, eventuelt i nærvær av eddiksyreanhydrid.

Egenskapene for forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er gitt i tabell 1 nedenfor.

Tabell 1

Forb. nr.	Kjemisk formel	Kjem. nomenklatur	Sm.p. °C	Utseende
1		2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazol-oxim	205	Lysegule krystaller
2		2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazol-oximacetat	191	Lysegule krystaller
3		2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazol-semicarbazon	255 med spaltn.	Rød-orange krystaller
4+		2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazol-thiosemicarbazon	höyere enn 260	Rød-orange krystaller

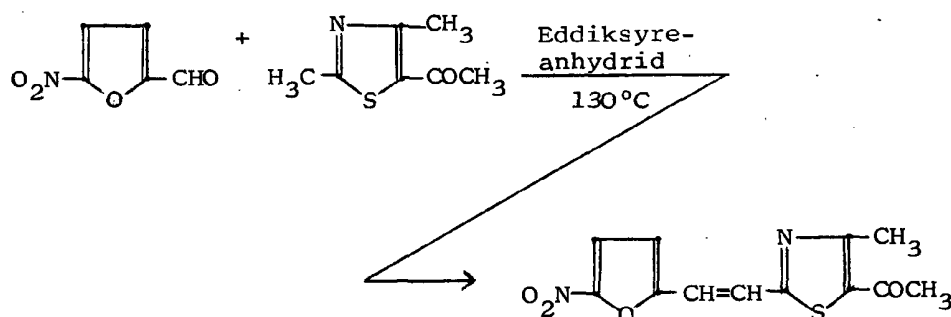
135030

Tabell 1 fortsatt

Forb. nr.	Kjemisk formel	Kjem. nomenklatur	Sm.p. °C	Utseende
5 ⁺		2-(5-nitrofuryl- vinyl)-4-methyl- 5-acetylthiazol- amidinohydrazon- hydroklorid	høyere enn 300	Rødbrune krystal- ler
6 ⁺		2-(5-nitrofuryl- vinyl)-4-methyl- 5-acetylthiazol- amidinohydrazon- sulfat	høyere enn 300	Rødbrune krystal- ler

+ Forbindelsene nr. 4, 5 og 6 utviser ingen definerte smeltepunkter, men begynner å spaltes meget langsomt til carbon ved de tabulerte temperaturer. Renheten av disse forbindelser kan bestemmes ved aluminiumoxyd-tynnskikt-kromatografi og ved andre måter.

Utgangsmaterialene som anvendes ved foreliggende oppfinnelse, dvs. 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazol, kan fremstilles som angitt i det følgende reaksjonsskjema, ved oppvarming av 5-nitrofurfural eller dets diacetat med 2,4-dimethyl-5-acetylthiazol i et oppløsningsmiddel for å gi et kondensasjonsprodukt.



Forbindelsene fremstillet ifølge foreliggende oppfinnelse erholdes ved reaksjon med en carbonylgruppe (ketongruppe) i utgangsmaterialet. Således kan reaksjonsforløpet følges ved en kvalitativ analyse for ketongrupper.

Det er funnet at forbindelsene som fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse utviser en bemerkelsesverdig vekstinhibering overfor forskjellige typer mikroorganismer innbefattende Gram-positive bakterier og Gram-negative bakterier. Stabiliteten av den antimikrobielle aktivitet av disse forbindelser er indikert ved det faktum at den vekstinhiberende effektivitet av disse forbindelser mot bakterier, slik som målt i kulturmedia inneholdende mercaptoforbindelser, protein, blod, homogeniserte innvoller etc. er den samme som den måte i kontrollkulturmedia frie for slike deaktiverende materialer. Det sistnevnte faktum indikerer at forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse ikke vil bli deaktivert ved samspill mellom biologiske forbindelser i et levende legeme.

Forsøk har vist at forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse utviser en større lysstabilitet enn tidligere kjente nitrofuranforbindelser. F.eks. hvis 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazol (utgangsmaterialet som anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse) oppløses i et oppløsningsmiddel som benzen eller ethylacetat, og den erholdte oppløsning gjennomlyses av lys med en intensitet på 1000 - 5000 Lux, vil forbindelsen spaltes i løpet av 5 - 6

135030

6

timer, i motsetning til en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, eksempelvis 2-(5-nitrofurylviny1)-4-methyl-5-acetylthiazol-semicarbazon som bibeholder sin struktur i over 30 timer under de samme betingelser.

Et forsøk ble utført for å bestemme toksisiteten av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse overfor varmblodige dyr. Prøveoppløsninger ble fremstillet for hver forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse i polyoxyethylensorbitanester (Tween 80). Hver oppløsning ble fortynnet med en fysiologisk saltoppløsning og administrert oralt til mus i konsentrasjoner på 1, 5, 10 og 15 g (regnet på selve forbindelsen) pr. kg kroppsvekt av musene. Ingen dødsfall fant sted i løpet av en to ukers observasjonsperiode. 15 g/kg kroppsvekt er antatt å være den øvre grense for doser ved dyreforsøk, og det var derfor umulig å bestemme LD₅₀ for forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse. Når mus og rotter ble føret med fôr inneholdende 2 % av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, kunne der ikke observeres noen vekstinhiberende, patologisk eller histologisk abnormitet, selv etter et tidsrom på 3 måneder.

Forbindelsene som fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse er også stabile overfor varme.

Forbindelsene som fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige som sykdomsforhindrende midler for fisk og dyr. F.eks. et bad inneholdende en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse i en mengde på 1 - 5 ppm er effektivt ved behandling av "gullhaler" infisert med vibrio eller ål infisert med Aeromonas. En forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse kan også tilsettes i en mengde på 50 - 100 ppm til fôr for behandling av griser infisert med enteritis bivrio.

De følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen.

Fremstilling av 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetyl-
thiazolderivater

Eksempel 1 Fremstilling av 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetyl-
thiazoloxim

2,8 g (0,01 mol) 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetyl-thiazol oppløses i 50 ml dioxan, og til den derved erholdte oppløsning tilsettes en oppløsning av 1,4 g (0,02 mol) hydroxylaminhydroklorid og 1,6 g (0,02 mol) natriumacetat oppløst i 10 ml vann. Den erholdte oppløsning ble oppvarmet til 70 - 80°C i 5 timer under omrøring.

Efter avkjøling ble det erholdte krystallinske produkt oppsamlet ved filtrering og omkrystallisert fra en blanding av dimethylformamid og vann. Utbyttet var 2,1 g lysegule krystaller, sm.p. 205°C.

Elementær analyse som $C_{12}H_{11}N_3O_4S$ (molevekt 293)

	C	H	N
Beregnet:	49,14	3,75	14,33
Funnet:	49,25	3,60	14,82

Eksempel 2 Fremstilling av 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetyl-
thiazoloximacetat

En blanding av 2,8 g (0,02 mol) 5-nitrofurfural, 3,4 g (0,02 mol) 2,4-dimethyl-5-acetylthiazoloxim og 30 ml eddiksyreanhydrid ble oppvarmet til 120°C i 8 timer. Efter avkjøling ble reaksjonsblandingen heldt i ca. 100 ml vann. Den erholdte faste bestanddel ble oppsamlet ved filtrering og omkrystallisert fra ethylacetat. Utbytte: 4,7 g lysegule krystaller med smeltepunkt på 191°C.

Elementær analyse for $C_{14}H_{13}N_3O_5S$ (molevekt 335)

	C	H	N
Beregnet:	50,15	3,88	12,54
Funnet:	50,10	4,01	12,33

135030

8

Eksempel 3: Fremstilling av 2-(5-nitrofurylvinyI)-4-methyl-5-acetyl-thiazolsemicarbazon

15 g (0,054 mol) 2-(5-nitrofurylvinyI)-4-methyl-5-acetyl-thiazol ble oppløst i 300 ml dioxan og derefter tilsatt en oppløsning av 11 g (0,1 mol) semicarbazidhydroklorid og 5,6 g (0,1 mol) kaliumhydroxyd oppløst i 100 ml vann. Blandingen ble oppvarmet til 70-80°C i 2 timer. Etter avkjøling ble det utfeldte krystallinske produkt oppsamlet ved filtrering, filtrert ved omkrystallisering fra dimethylformamid.

Utbytte: 7 g rødbrune krystaller med smeltepunkt på 255°C.

Elementær analyse som $C_{13}H_{13}N_5O_4S$ (molekt 335)

	C	H	N
Beregnet:	46,75	3,88	20,89
Funnet:	46,41	3,90	20,60

Eksempel 4: Fremstilling av 2-(5-nitrofurylvinyI)-4-methyl-5-acetyl-thiazolthiosemicarbazon

2,8 g (0,01 mol) 2-(5-nitrofurylvinyI)-4-methyl-5-acetyl-thiazol ble oppløst i 50 ml dioxan og derefter tilsatt en oppløsning av 1,9 g (0,015 mol) thiosemicarbazidhydroklorid og 1,2 g (0,015 mol) natriumacetat oppløst i 10 ml vann. Blandingen ble oppvarmet til 70-80°C i 3 timer. Etter avkjøling ble det erholdte krystallinske produkt oppsamlet ved filtrering og omkrystallisert fra dimethylformamid.

Utbytte: 3,2 g rød-orange krystaller med smeltepunkt høyere enn 260°C.

Elementær analyse som $C_{13}H_{13}N_5O_3S_2$ (molekt 351)

	C	H	N
Beregnet:	44,44	3,70	19,94
Funnet:	44,63	3,55	19,53

Eksempel 5: Fremstilling av 2-(5-nitrofurylvinyI)-4-methyl-5-acetyl-thiazolamidinohydrazonhydroklorid

25 g (0,09 mol) 2-(5-nitrofurylvinyI)-4-methyl-5-acetyl-thiazol ble oppløst under oppvarmning i 500 ml dioxan, og til den erholdte oppløsning ble tilsatt 50 ml konsentrert saltsyre og en oppløsning av 16 g (0,145 mol) aminoguanidinhydroklorid, oppløst i 200 ml vann. Oppløsningen ble oppvarmet til 80 - 100°C. Ved avkjøling pre-siperte krystallene fra reaksjonsblandingen. Produktet ble oppsamlet

ved filtrering og omkrystallisert fra propylenglycol. Utbytte: 19,5 g sinoberrøde krystaller med smeltepunkt høyere enn 300°C.

Elementær analyse som $C_{13}H_{15}N_6O_3SCl$ (molekt 370,5)

	C	H	N
Beregnet:	42,10	4,04	22,67
Funnet:	41,88	4,34	22,57

Eksempel 6: Fremstilling av 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazolamidinohydrazonsulfat

2,8 g (0,01 mol) 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazol ble oppløst i 50 ml dioxan, og til den erholdte oppløsning ble tilsatt 2,5 ml konsentrert svovelsyre og en oppløsning av 1,0 g (0,004 mol) aminoguanidinsulfat i 20 ml vann. Blandingen ble oppvarmet til 80 - 100°C i 60 minutter. Da reaksjonen var ferdig, ble reaksjonsvæsken blandet med aktivt carbon og filtrert. Ved avkjøling precipiterte krystaller fra filtratet.

Utbytte: 2,6 g rødbrune krystaller med smeltepunkt høyere enn 300°C.

Elementær analyse: som $C_{26}H_{30}N_{12}O_{10}S_3$ (molekt 766)

	C	H	N
Beregnet:	40,73	3,92	21,93
Funnet:	40,70	4,05	21,72

Antimikrobiell aktivitet av 2-(5-nitrofurylvinyl)-4-methyl-5-acetylthiazolderivater

In vitro prøve på antimikrobiell aktivitet

Bestemmelse av den antimikrobielle aktivitet in vitro ble utført på følgende måte:

Hvert antimikrobielt middel ble oppløst i en liten mengde DMF (N,N-dimethylformamid), og den erholdte oppløsning fortynnet med vann for å gi oppløsninger med forskjellige konsentrasjoner.

8 stammer av bakterier og fungi, angitt i tabell 2, ble anvendt som prøvemikroorganismer. De anvendte kulturmedia var en 3% NaCl næringsbuljong for *Vibrio anguillarum*, næringsbuljonger for de andre bakterier og maltekstraktbuljonger for fungi. pH-verdien for de forskjellige kulturmedia ble justert til 6,5. En for-

135030

10

tynnet oppløsning av hvert antimikrobiologisk middel ble blandet sammen med hvert av de ovenfor nevnte kulturmedia som derefter separat ble inokulert med små mengder av en cellesuspensjon av en av prøvestammene. *Vibrio anguillarum* og fungi ble kultivert ved 25°C i 2 - 5 dager, og de andre bakterier ble kultivert ved 37°C i 2 dager, og den minimale inhiberende konsentrasjon (MIC) ble bestemt i hvert tilfelle. Resultatene for en serie av prøvene i henhold til eksempel 7 er vist i tabell 2 nedenfor.

Tabell 2

Forbindelser		V.a.	E.c	P.v	S.a	B.s	C.a	(MIC µg/ml)
Tabell 1 Nr. 1	1	1,25	0,31	2,5	0,63	0,08>	200 <	
" "	2	0,63	0,31	5,0	0,63	0,16	12,5>	
" "	3	0,63	1,25	2,5	1,25	0,08>	200 <	
" "	4	2,5	1,25	5,0	2,5	0,08>	200 <	
" "	5	0,63	0,63	2,5	0,63	0,16	100	
" "	6	2,5	2,5	10	5,0	0,31	-	
Nitrofurazon +	-	10	50	10	12,5	-	-	
Furazolidon +	-	0,6	30	3	0,4	-	-	
Furylfuramid +	-	0,6	6,25	1,56	0,1	-	-	

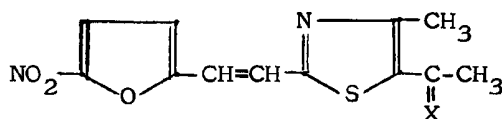
(+) Referanseeksempler, verdiene tatt fra tilgjengelig litteratur.

(-) Ingen data.

Forkortelser: V.a - *Vibrio anguillarum*
 E.c - *Escherichia coli*
 P.v - *Proteus vulgaris*
 S.a - *Staphylococcus aureus*
 B.a - *Bacillus subtilis*
 C.a - *Candida albicans*

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte ved fremstilling av en terapeutisk aktiv forbindelse av den generelle formel:



hvor X er NOH, N-OCOCH₃, N-NH-C(=O)-NH₂, N-NH-C(=S)-NH₂ eller N-NH-C(=NH)-NH₂·HA

hvor A er et syreanion, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

- a) 2-(5-nitrofurylviny)-4-methyl-5-acetylthiazol omsettes, i nærvær av et organisk oppløsningsmiddel og ved 50 - 150°C, med hydroxylamin, semicarbazid, thiosemicarbazid eller et syreaddisjonssalt av aminoguanidin, eller
- b) 2,4-dimethyl-5-acetyldiazol omsettes med hydroxylamin, semicarbad, thiosemicarbazid eller et syreaddisjonssalt av aminoguanidin og reaksjonsproduktet derefter omsettes med 5-nitrofurfural eller dets diacetat, eventuelt i nærvær av eddiksyreanhydrid.