

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

133 813

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 81 02 04 /P. 237929/

Pierwszeństwo: 80 02 04 Stany Zjedno-
czone Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 83 03 28

Opis patentowy opublikowano: 1986 10 31

CZŁONIA

Urzedu Patentowego
Patent 81 02 04

Int. Cl.³ C07C 69/24
C07C 69/753

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Merck and Co. Inc., Rahway /Stany Zjednoczone
Ameryki/

SPOSÓB WYTWARZANIA NOWYCH POCHODNYCH KWASU 7-[2/S/, 6/S/-DWUMETYLO-1/S/-
-NAFTYLO]-3/R/, 5/R/-DWUHYDROKSYHEKSANOKARBOKSYLOWEGO

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych pochodnych kwasu 7-[2/S/, 6/S/-dwumetylo-1/S/-naftylo]-3/R/- 5/R/-dwyhydroksyheksanokarboksylowego o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza prostolancuchową lub rozgałęzioną grupę alkilową o 3-10 atomach węgla, z wyjątkiem grupy 2-/S/-butylowej, a także farmakologicznie dopuszczalnych soli tych związków. Związki wytwarzane sposobem według wynalazku mają działanie przeciwhipercholesterolemiczne.

Znane są pewne pochodne kwasu β , α -dwyhydroksy- β -metylo-walerianowego o działaniu hamującym syntezę cholesterolu /patrz F.M. Singer i inni, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 102, 370 /1959/ oraz F.N. Hulcher, Arch. Biochem. Biophys., 146, 422 /1971/. Nie we wszystkich przypadkach jednak aktywność tych związków jest dostateczna, a więc nie znajdują one praktycznego zastosowania.

Z opisów patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr nr 4 049 495, 4 137 322 i 3 983 140 znany jest proces fermentacji, którego produkty wykazują dość znaczną aktywność w hamowaniu biosyntezy cholesterolu. Najbardziej aktywny z tej grupy naturalnych produktów jest związek zwany kompaktyną, będący mawalonolaktonem o wzorze 3a /R' oznacza atom wodoru/, opisany przez Browne i innych w J. Chem. Soc. Perkin I, 1165, /1976/.

Z opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr nr 4 231 938, przytoczonego tu jako źródło literaturowe, znany jest inny proces fermentacji, którego produktem jest wykazujący działanie inhibitujące biosyntezę cholesterolu związek o wzorze 3a, określony w tym opisie jako MK-803. Z opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 294 846 znany jest dihydro-MK-803 oznaczony wzorem 3d /R' oznacza grupę metylową/, o sile działania równej sile działania MK-803, a wyodrębniony z tej samej brzojki fermentacyjnej, co MK-803. Z opisu patentowego nr 4 351 844 Stanów Zjednoczonych Ameryki znane są dihydro- i tetrahydropochodne MK-803 o wzorach 3b, 3c i 3d /R' oznacza grupę metylową/. Związki te otrzymuje się drogą katalitycznego

uwodornienia MK-803. Tetrahydro-analog kompaktyny, związek o wzorze 3a /R' oznacza atom wodoru/ znany jest z opublikowanego japońskiego zgłoszenia /kokai/ nr 55009-024. Ostatnio z brzożki fermentacyjnej po fermentacji kompaktyny wyizolowano dihydro-analog o wzorze 3d /R' oznacza atom wodoru/, co opisane zostało w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4 343 814.

Indeksy a, b, c, d i e występujące przy numerze wzoru 3 oznaczają położenie wiązań podwójnych X, Y i Z, względnie brak tych wiązań. Stereochemię związków o wzorze 3, wynikającą z położenia wiązań podwójnych, przedstawia tablica.

T a b l i c a

Indeks	Pozycja wiązania podwójnego	Budowa
a	X i Z	wzór 4
b	X	wzór 5
c	Y	wzór 6
d	Z	wzór 7
e	brak wiązań podwójnych	wzór 8

Wszystkie związki o wzorze 1 mają taką samą orientację przestrzenną grup na każdym z centrów chiralności, a zatem należą do tej samej serii stereochemicznej.

Cechą sposobu według wynalazku jest to, że związek o ogólnym wzorze 2, w którym ma wyżej podane znaczenie, poddaje się działaniu alkaliów, a powstały związek pośredni łagodnie zakwasza, po czym ewentualnie powstały związek przeprowadza się w jego farmakologicznie dopuszczalną sól. Korzystne są te związki, w których R oznacza grupę 1,1-dwuetylopropylową lub 1-etylo-1-metopropylową. Najkorzystniejszym związkiem według wynalazku jest związek o wzorze 1, w którym R oznacza grupę 1,1-dwumetylopropylową.

Związki o wzorze 2 można hydrolizować za pomocą zasad, takich jak NaOH, otrzymując sole, takie jak sól sodowa związku o wzorze 1. Zastosowanie zasad zawierających inne farmakologicznie dopuszczalne kationy prowadzi do powstawania soli zawierających te kationy. Po ostrożnym zakwaszeniu soli otrzymuje się hydroksykwasy o wzorze 1, które ulegają przemianie w związki o wzorze 3 w środowisku o odczynie kwasowym.

Farmakologicznie dopuszczalnymi solami, objętymi zakresem wynalazku są sole zawierające kationy sodu, potasu, glinu, wapnia, litu, magnezu i cynku oraz kation czterometyloamonowy, a także sole amin, takich jak amoniak, etylenodwuamina, N-metyloglukamina, lizyna, arganina, ornityna, cholina, N,N'-dwubenzylodetylenodwuamina, chloroproteina, dwuetanolocamina, proteina, N-benzylod2-fenylodetylo/amina, 1-p-chlorobenzylod2-pirolidynolod1'-metylobenzimidazol, dwuetyloamina, piperazyna i tris/hydroksymetylo/aminometan.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku są użyteczne jako środki przeciwhipercholesterolemiczne w leczeniu miażdżycy, hiperlipemii i podobnych chorób występujących wśród ludzi. Można je podawać doustnie lub pozajelitowo, w postaci kapsułek, tabletek, preparatów do wstrzyknięć, itp. Na ogół korzystne jest podawanie doustne. Dawki mogą być różne, w zależności od wieku pacjenta, nasilenia choroby, wagi ciała i innych warunków, przy czym zazwyczaj dawka dzienna dla dorosłych wynosi około 2-2000 mg, korzystnie 10-100 mg/, w 3-4 dawkach podzielonych. W razie konieczności można podawać dawki wyższe.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku mają również działanie przeciwwgrzybiczne. Można je np. stosować dla zwalczania szczepów *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Cochliobolus miuabeanus* i *Helminthosporium cynodnotis*. W tym celu związki te umieszcza się z odpowiednimi środkami pomocniczymi, takimi jak proszki, emulgatory lub rozpuszczalniki, np. z wodnym roztworem etanolu, a następnie powstałymi preparatami opyla się lub opryskuje ochraniające rośliny.

Badanie działania przeciwhipercholesterolonowego, zbadano działanie inhibitujące związku o wzorze 1 wobec reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A /reduktazy HMG-CoA/. Związek o wzorze 1, w którym R oznacza grupę $/C_2H_5/2 - C/CH_3/-$, badano w postaci soli sodowej. Sól sodową sporządza się rozpuszczając 4 mg badanego laktonu w 0,1 ml etanolu, dodając roztwór NaOH /1,025 równoważnika 0,1 n zasady na 1 równoważnik laktonu/ i rozcieńczając mieszaninę wodą do objętości 1 ml. Stężenie związku, konieczne dla uzyskania zahamowania aktywności enzymu w stopniu odpowiadającym połowie zahamowania maksymalnego $/IC_{50}$ w nanomolach/ obliczono metodą analizy komputerowej, stosując jako dane wyjściowe wyniki uzyskane w próbach z czterema różnymi dawkami związku.

Badania prowadzono stosując zmodyfikowaną metodę Beg'a i współpracowników, opisaną w 1977 FEBS Letters 50, 123-129, z użyciem enzymów otrzymanych metodą Kleinsek'a i współpracowników /1977 Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 1431-1435/.

P r ó b a. Określenie czynności reduktazy HMG-CoA w wątrobie in vitro i badanie działania inhibitorów in vitro.

Badanie działania reduktazy HMG-CoA w wątrobie szczura in vitro obejmuje dwa etapy /według metody Shefera i innych, J. Lipid Res., 13, 402-412, 1972/: sporządzanie mikrosomatycznych pastylek z wątroby, próba na pastylce na działanie reduktazy HMG-CoA.

Mikrozomy sporządza się z wątroby samców szczurów /Charles River/ o wadze 150-200 g, karmionych w ciągu 1 tygodnia mielonym pożywieniem, zawierającym 0,75% chlorku jonenu-3,3, środka zatrzymującego kwas żółciowy. Szczury uśmiercone przez skrócenie kręgów szyjnych, po czym natychmiast wyjęto wątroby i oziębiono je na lodzie. Wszystkie następne zabiegi prowadzono w temperaturze 0-5°C.

Sporządzanie mikrosomatycznych pastylek z buforowych roztworów wątroby szczura: bufor I /do komogenizacji/: 50 mmol KPO₄ /pH 7,0/, 0,2 mola sacharozy, 2 mmole DTT; bufor I + EDTA /do przemycania pastylek/: 50 mmol KPO₄ /pH 7,0/, 0,2 mola sacharozy, 2 mmole DTT, 50 mmol EDTA.

W temperaturze 4°C wykonuje się kolejno następujące czynności: uśmiercenie zwierząt i przemycie ich wątroby oziębionym do temperatury lodu buforem I, odcisnięcie nadmiaru cieczy i zważenie wątroby, dodanie 2 objętości buforu I, mielenie i homogenizacja przy prędkości 1000 obrotów na minutę, 10 pionowych wstrząśnień /w górę - w dół/, odwirowanie homogenizatu przy prędkości 12000 obrotów na minutę w ciągu 15 minut, usunięcie pastylki, odwirowanie cieczy znad osadu przy prędkości 40×10^3 obrotów na minutę w ciągu 75 minut, przemycie pastylki buforem I i EDTA, intensywne odwirowanie, ponowne odwirowanie przy prędkości 40×10^3 obrotów na minutę w ciągu 75 minut, odessanie cieczy znad osadu, zamrożenie pastylki do temperatury -70°C do czasu dalszego oczyszczenia.

Oczyszczenie HMG-CoA reduktazy w pastylce mikrosomatycznej.

Roztwory buforowe:

B u f o r A + 50% gliceryny: 0,1 mola sacharozy, 0,05 mola KCl, 0,04 mola KPO₄ /pH 7,0/, 0,03 mola EDTA, 0,01 mola DTT, 50% gliceryny.

B u f o r A: 0,1 mola sacharozy, 0,05 mola KCl, 0,04 mola KPO₄ /pH 7,0/, 0,03 mola EDTA, 0,01 mola DTT.

B u f o r n o ś n i k o w y: 0,03 mola KPO₄ /pH 7,4/, 3 mmole DTT, 30% gliceryny, 1 mol KCl, 0,03 mola EDTA.

B u f o r B: 0,04 mola KPO₄ /pH 7,4/, 0,03 mola EDTA, 0,01 mola DTT.

Tok postępowania - wszystkie zabiegi w temperaturze pokojowej: dodanie 3 ml buforu A i 50% gliceryny do każdej pastylki mikrosomatycznej, homogenizacja przy prędkości 1000 obrotów na minutę, 10 pionowych wstrząśnień /w górę - w dół/, inkubacja homogenizatu mikrosomatycznego w temperaturze 37°C w ciągu 60 minut, dodanie buforu A do homogenizatu mikrosomatycznego w celu zmniejszenia stężenia gliceryny do 8% lub poniżej 8%, wirowanie homogenizatu przy prędkości 40×10^3 obrotów na minutę w ciągu 60 minut, strącenie 0-35% $/NH_4/2SO_4$, wirowanie przy prędkości 15×10^3 obrotów na minutę w ciągu 15 minut, usunięcie pastylki, strącenie 35-50% $/NH_4/2SO_4$ z cieczy znad osadu, wirowanie przy prędkości 15×10^3 w ciągu 15 minut, odessanie cieczy znad osadu, badanie 1 ml buforu nośnikowego do każdej pastylki, ogrzewanie w temperaturze 65°C w ciągu 6 minut, wirowanie przy prędkości 40×10^3 obrotów na minutę w ciągu 6 minut, rozcień-

czenie cieczy znad osadu w stosunku 1:3 przy użyciu buforu A dla zmniejszenia stężenia KCl, strącenie 0-60% NH_2/SO_4 , wirowanie przy prędkości 15×10^3 obrotów/minutę w ciągu 15 minut, odrzucenie cieczy znad osadu, rozтворzenie pastylki w minimalnej objętości buforu A, przechowywanie w temperaturze -70°C .

Badanie działania HMG-CoA reduktazy.

Pełny układ badany o ogólnej objętości 0,8 ml zawarty jest w buforze fosforanowym o pH 7,2 /100 mmol/, zawierającym 3 mmole MgCl_2 , 10 mmol 6-fosforanu glikozy, 3,0 jednostek enzymatycznych dehydrogenazy 6-fosforanu glikozy /EC 1.1.1.49/ 50 mmol zredukowanego glutationu, 0,2 mmol /0,1 μCi / HMG-CoA /Clutaryl-3- ^{14}C / i 0,1 ml zawiesiny enzymu.

Zamrożoną pastylkę /enzym/ pozostawia się w temperaturze pokojowej w celu rozmrożenia w ciągu 5 minut, po czym dokładnie miesza się ją bagietką z 0,1 ml buforu fosforanowego /pH 7,2/ do uzyskania zawiesiny, którą rozcieńcza się buforem do objętości 2,0 ml. W probówkach inkubacyjnych umieszcza się po 0,1 ml zawiesiny enzymu. Badane związki rozcieńcza się do żądanego stężenia, po czym po 10 mikrolitrów umieszcza się w probówkach przed umieszczeniem w nich enzymu. Prowadzi się również "ślepe próbe".

Cały układ umieszcza się w probówkach do hodowli z zakręcanym wieczkiem, 16 x 125 mm i wytrząsa bez zakręcenia wieczka w łaźni wodnej o temperaturze 37°C w ciągu 40 minut /160 oscylacji na minutę/. Następnie reakcję zatrzymuje się przez dodanie 0,4 ml 8n HCl. Po dodaniu 3 mg mewelonolaktonu w 0,1 ml H_2O próbki wytrząsa się, jak poprzednio w temperaturze 37°C jeszcze w ciągu 30 minut dla upewnienia się, że zaszła laktonizacja biosyntetycznego mewelonianu.

Wyodrębnienie produktu. 2000 mikrolitrów mieszaniny reakcyjnej wprowadza się na kolumny Bio-Rex 5 /5 cm w pipiecie Pasteura/. Kolumnę eluuje się 3 razy stosując po 1 ml wody, odbierając eluat do próbki scyntylacyjnej. Po dodaniu 10 ml Aguesol-2 i wytrząśnięciu, prowadzi się zliczanie.

Bio-Rex jest żywicą jonowymiennej otrzymaną z żywicy Bio-Rad. W postaci chlorkowej jest sucha i stosuje się wyłącznie jej frakcję 0,074-0,104 mm. Żywica pęcznieje w wodzie w ciągu kilku godzin. Wszystkie drobne cząstki dekatuje się dla zapobiegnięcia pogorszenia prędkości przepływu. Uwodnioną żywicę należy przechowywać w temperaturze 4°C . Stwierdzono, że wartość IC_{50} dla badanego związku o wzorze 1 wynosi 9,2 nanomola.

P r z y k ł a d A: Wytwarzanie kwasu 7- $\text{[1,2,3,4,4a/S/5,6,7,8,8a/S/-dekahydro-2/S/6/S/-dwumetylo-8/S/-2,2-dwumetylbutyryloksy/-1/S/-naftylo]-3/R/5/R/-dwyhydrokeyheksanokarboksylowego}$.

W trakcie mieszania do zawiesiny 40 mg /0,095 mmol/ 6/R/- $\text{[-2-[1,2,3,4,4a/S/5,6,7,8,8a/S/-dekahydro-2/S/-6/S/-dwumetylo-8/S/-2,2-dwumetylbutyryloksy/-1/S/-naftylo]-etylo]}$ -4/R/-hydrokey-3,4,5,6-tetrahydro-2H-piranonu-2 w 0,25 ml metanolu dodaje się 0,2 ml 1n NaOH i 0,2 ml wody. Powstałą mieszaninę miesza się w temperaturze pokojowej do uzyskania przejrzystego roztworu. Roztwór chłodzi się na łaźni lodowej i dodaje doń kolejne 1 ml CDCl_3 , 0,15 ml 2n HCl i 0,5 ml wody. Mieszaninę miesza się w ciągu 15 minut, po czym odpipetowaną dolną jej warstwę suszy nad MgSO_4 i przesącza przez watę szklaną.

Widmo NMR / CDCl_3 -TMS/, 0,83 /3H, t, J=7 Hz/, 1,35 /H6, s/, 2,50 /2H, d, J=6 Hz/, 3,74 /H, m/, 4,24 /H, m/, 5,20 /H, m/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym / CH_2Cl_2 - CH_3COOH 8 : 1 objętościowo/: $R_f = 0,26$ / $R_f = 0,38$ dla związku wyjściowego/.

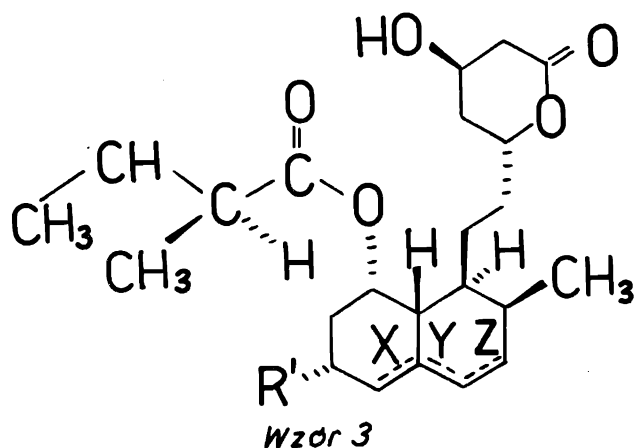
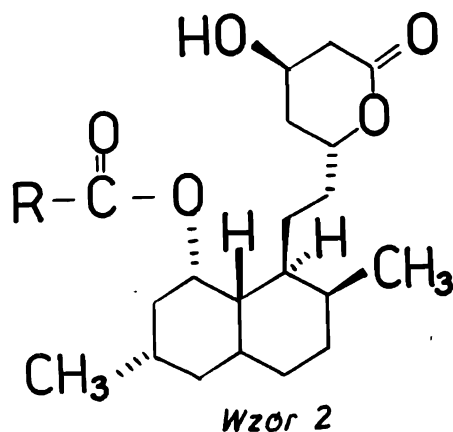
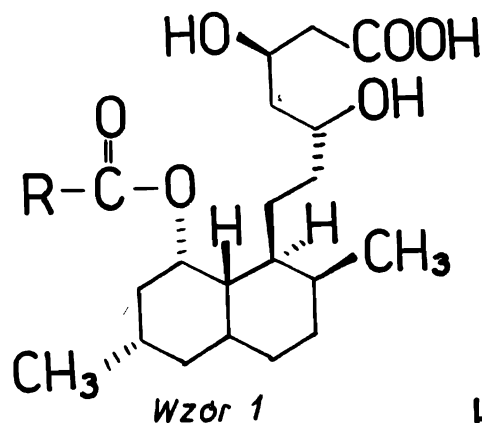
P r z y k ł a d B: Wytwarzanie soli amonowej kwasu z punktu A. W trakcie mieszania zawiesiny 0,3 g /0,71 mmol/ związku z punktu A w 2,1 ml metanolu dodaje się 1,47 ml 1n NaOH i 2,1 ml wody. Powstałą mieszaninę miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu 1 godziny, po czym metanol odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 25°C . Do pozostałości dodaje się 4 ml eteru, a następnie chłodząc powstałą mieszaninę na łaźni lodowo-acetonowej zakwasza się ją 3n HCl. Warstwę organiczną ekstrahuje się eterem /2 x 10 ml/, a połączone ekstrakty przenyma nasyconym roztworem NaCl i suszy nad MgSO_4 . Po odfiltrowaniu MgSO_4 , na przesącz działa się w ciągu 2 minut bezwodnym amoniakiem. Po upływie 1 godziny odcęca się 0,12 g /0,26 mmol/ soli amonowej w postaci białej substancji o temperaturze topnienia $140-142^\circ\text{C}$.

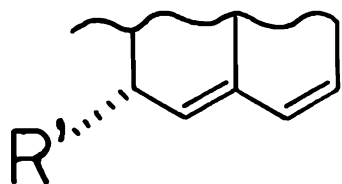
Analiza elementarna dla $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{NO}_6$:

Obliczono:	C 65,61,	H 10,35,	N 3,06
Stwierdzono:	C 65,20	H 10,76,	N 3,29

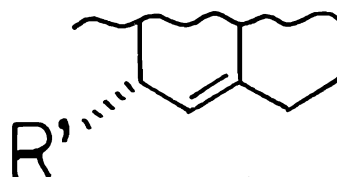
Z a s t r z e ż e n i e p a t e n t o w e

Sposób wytwarzania nowych pochodnych kwasu 7-[2/S/,6/S/-dwumetylo-1/S/-naftylo]-3/R/, 5/R/-dwyhydroksyheksanokarboksylowego o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza prostolącuchową lub rozgałęzioną grupę alkilową o 3-10 atomach węgla, z wyjątkiem grupy 2-/S/-butylowej, a także farmakologicznie dopuszczalnych soli tych związków, z n a m i e n n y t y m, że związek o ogólnym wzorze 2, w którym R ma wyżej podane znaczenie, poddaje się działaniu alkaliów, a powstały związek pośredni łagodnie zakwasza, po czym ewentualnie powstały związek przeprowadza się w jego farmakologicznie dopuszczalną sól.

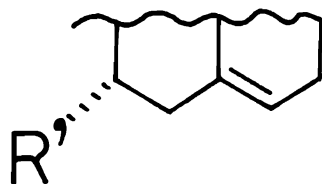




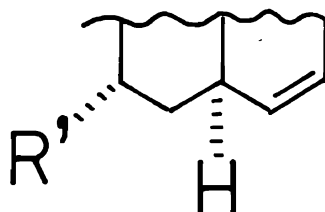
wzór 4



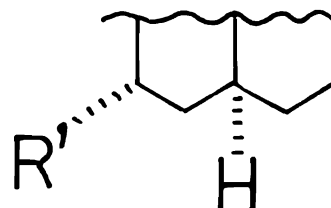
wzór 5



wzór 6



wzór 7



wzór 8