



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTELEGNINGSSKRIFT Nr. 150361

**(C) (45) PATENT MEDDELT
3. OKT. 1984**

(51) Int. Cl.³ C 07 D 471/04

(21) Patentsøknad nr. 781786

(22) Inngitt 23.05.78

(24) Løpedag 23.05.78

(41) Alment tilgjengelig fra 28.11.78
(44) Søknaden utlagt, utlegningskrift utgitt 25.06.84
(30) Prioritet begjært 25.05.77, USA, nr 800264

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte til fremstilling av terapeutisk aktive 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on-derivater.

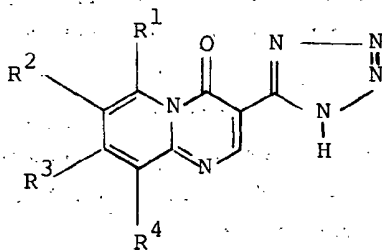
(71)(73) Søker/Patenthaver BRISTOL-MYERS COMPANY,
345 Park Avenue,
New York, NY 10022,
USA.

(72) Oppfinner PETER FREDERICK JUBY,
Jamesville, NY,
USA.

(74) Fullmektig A/S Bergen Patentkontor, Bergen.

(56) Anførte publikasjoner BRD (DE) patent nr 2630469.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en analogifremgangsmåte til fremstilling av terapeutisk aktive 3-(1H-tetrazol)-5-yl)-4H-(pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on-derivater med den generelle formel:



hvor R¹, R², R³ og R⁴, som kan være like eller forskjellige, hver er hydrogen, halogen, (lavere)alkyl, (lavere)alkoksy eller fenyl og farmatsøytisk akseptable salter av disse.

Forskjellige legemidler har vært anvendt i behandlingen av allergiske reaksjoner, såsom bronkial astma og allergisk rhinitis, som antas hovedsakelig å skyldes antigen-antistoffvekselvirkning. Når det gjelder bronkial astma, som er en av de mest alvorlige av disse allergiforårsakete sykdommer, anvendes det primært bronkodilatorer, såsom teofyllin, iroproterenol, epinefrin og atropin for å frembringe symptomatisk lindring. Disse midler har imidlertid uønskete bivirkninger, f.eks. kardialstimulering og mage- og tarmlidelser.

Med den seneste tids innføring av dinatriumkromoglykat, som er beskrevet av J.S.G. Cox et al. i Adv. in Drug Res., 5, 115-196 (1970) har legen fått et middel til rådighet, som ved administrering til astmapasienter innen inhaleringen av spesifikke antigener, hemmer frigjøringen av mediatorer, f.eks. his-

tamin og SRS-A (langsomt reagerende anafylaksistoff), som antas å være årsak til den astmatiske reaksjon. Selv om dinatriumkromoglykat muliggjør en profylaktisk behandling for bronkial astma uten kardiovaskulære bivirkninger og således representerer et betydelig fremskritt, har dette stoff også en meget vesentlig ulempe, idet det ikke absorberes oralt og således må administreres ved inhalering.

I forhold til de ifølge den foreliggende oppfinnelse fremstilte forbindelser er det i litteraturen ikke funnet eksempler på tetrazol-5-yl-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-oner, som særlig skulle oppvise antiallergisk aktivitet.

Ovennevnte substituenten R^1 , R^2 , R^3 og R^4 kan ytterligere defineres som følger:

(a) halogen omfatter klor, brom, fluor og jod,

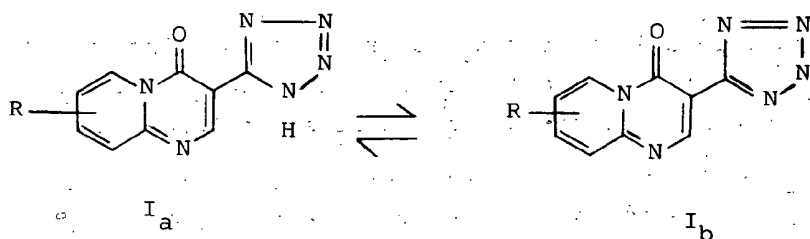
(b) (lavere)alkyl omfatter både uforgrenete og forgrenete, mettede alifatiske hydrokarbongrupper med fra 1 til 6 karbonatomer, f.eks. metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sek-butyl, tert-butyl, n-pentyl, isopentyl, n-heksyl, etc.,

(c) (lavere)alkoksy omfatter C_1 - C_6 -alkoksygrupper hvis alkylidel er definert som under (b). Eksempler er metoksy, etoksy, n-propoksy, isopropoksy, n-butoksy, isobutoksy, sek-butoksy, n-pentyloksy, isopentyloksy, n-heksyloksy, etc.

Idet de ovenfor anførte forbindelser er av amfoter natur kan de omdannes til salter av enten syrer eller baser ved behandling av vedkommende forbindelser med en stort sett ekvimolar mengde av en valgt syre eller base i en vandig oppløsning eller i et egnet organisk løsningsmiddel, såsom metanol eller etanol. Når slike salter skal anvendes for humant bruk, skal syrene eller basene som anvendes til fremstilling av de farmasøytisk akseptable salter, selvfølgelig være slike som nødvendigvis danner ikke-toksiske salter. Eksempler på egnete syrer er saltsyre, hydrobromsyre, hydrojodsyre, salpetersyre, svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre, melkesyre, citronsyre, vinsyre, oksalsyre, ravsyre, maleinsyre, glukonsyre, askorbinsyre og p-toluensulfonsyre. Farmasøytisk akseptable salter kan dannes ut fra baser, såsom ammoniakk, organiske aminer og metallsalter, f.eks. metallsalter som inneholder natrium-, kalium-, kalsium-, magnesium-, barium- og aluminiumkationer. Eksempler på slike baser er ammoniakk, primære aminer såsom n-propylamin, n-butylamin, etanolamin, etylendiamin, cykloheksylamin, benzylamin, etylamin,

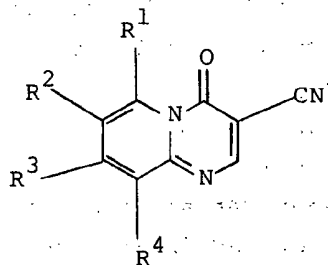
oktylamin eller tris-(hydroksymetyl)aminometan, sekundære aminer, såsom dietanolamin, tertiære aminer, såsom trietanolamin, N-metylpyrrolidin, N-metylmorfolin eller 1,5-diazabicyklo-[4,3,0]-5-nonen og metallforbindelser såsom natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, ammoniumhydroksyd, natriumetoksyd, kaliumetoksyd, magnesiumhydroksyd, kalsiumhydroksyd eller aluminiumhydroksyd.

Fagfolk vil innse at forbindelsene med de generelle form-
ler inneholder et tautomert hydrogenatom, og forbindelsene kan
derfor foreligge i 1H-tetrazol-5-yl-formen (se formel I_a neden-
for) og 2H-tetrazol-5-yl-formen (formel I_b nedenfor).

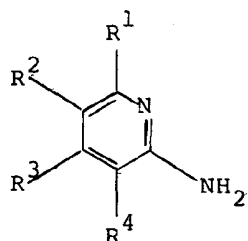


Oppfinnelsen omfatter fremstilling av begge disse former, men for letthets skyld er strukturen I_a vilkårlig valgt for beskrivelse av de foreliggende forbindelser.

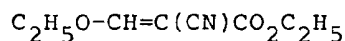
Analogifremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kjennetegnes ved a) at man omsetter et nitril som har formelen



hvor R¹, R², R³ og R⁴ har de ovenfor anførte betydninger, med hydrazosyre eller et azidsalt i form av ammonium-, substituert ammonium-, natrium-, litium- eller aluminiumazid i et inert organisk løsningsmiddel, eller b) at man omsetter et 2-amino-pyridin, som har formelen:

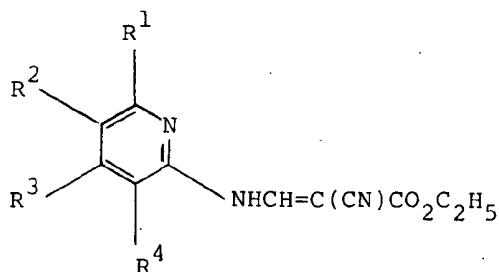


hvor R^1 , R^2 , R^3 og R^4 har de ovenfor anførte betydninger, med etyletoksymetylcianoacetat med formelen:



VIII

i nærvær av aluminiumazid i tetrahydrofuran til dannelselse av det ønskete produkt i ett trinn, eller om ønsket isolerer i fravær av aluminiumazid den resulterende forbindelse med formelen:



VI

og behandler denne forbindelse med aluminiumazid i tetrahydrofuran, utvinner den ønskete forbindelse ved syretilsetning, og om ønsket omdanner på i og for seg kjent måte forbindelsen til et farmasøytisk akseptabelt salt.

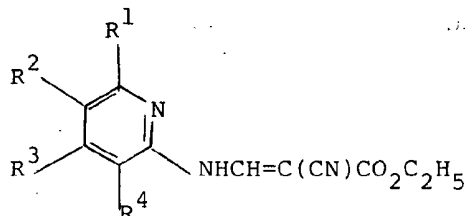
Nitrilet II og azidsaltet kan anvendes i omtrent ekvimolare mengder. Den generelle omdannelse av nitriler til tetrazoler er beskrevet av W.G. Finnegan, et al. i J. Am. Chem. Soc., 80, 3908 (1958). Eksempler på egnete azidsalter for denne fremgangsmåte er gitt av Finnegan i ovennevnte referanse og omfatter azider, såsom NaN_3 , LiN_3 , NH_4N_3 , $(n-C_4H_9)_2NH_2N_3$, $C_6H_5NH_3N_3$ og $(CH_3)_4NN_3$. Azidsaltet kan tilsettes direkte eller kan dannes in situ, f.eks. ved dobbelte spaltingsreaksjoner av natriumazid og et egnet kloridsalt, såsom $LiCl$, NH_4Cl , $(CH_3)_4NCl$, etc. Selv om kondensasjonsreaksjonen løper i et bredt temperaturintervall,

foretrekkes det å senke reaksjonstiden ved å anvende høyere temperaturer, f.eks. fra ca. 100°C opptil løsningsmiddelssystemets tilbakekjølingstemperatur. Det inerte organiske løsningsmiddel kan vanligvis være et løsningsmiddel som har god løsningssevne for azidsaltet og som er kjemisk inert. Eksempler på foretrukne løsningsmidler er dimetylformamid, dimetylacetamid, dimetylsulfoksyd og heksametylfosforamid. Det mest foretrukne løsningsmiddel er dimetylformamid. Kondensasjonsreaksjonen har vist seg å være generelt syrekatalysert, og utbyttet bedres ved tilsetning av reagenser, såsom hydrazosyre, aminhydroazider og Lewis-syrer, såsom BF_3 , til natriumazidet. Etter at reaksjonen er fullført kan tetrazolproduktet utvinnes av reaksjonsblandingen ved fjerning av løsningsmidlet, tynning av resten med vann og etterfølgende tilsetning av syre til blandingen til dannelselse av det ønskete produkt med formelen I. Produktet kan renses ytterligere ved omkrystallisasjon, og eventuelt omdannes til et farmasøytisk akseptabelt salt slik som beskrevet ovenfor. Etter kondensasjonen kan forbindelser med formelen I dersom det er ønskelig ytterligere omsettes på i og for seg kjent måte til omdannelse av én eller flere av substituentgruppene R^1 , R^2 , R^3 eller R^4 til andre substituentgrupper innenfor rammen av formelen I.

Det foretrekkes at man ved fremgangsmåte a) kondenserer nitril-utgangsmaterialet II med aluminiumazid i tetrahydrofuran, etterfulgt av et syretilsetnings-utvinningstrinn slik som beskrevet ovenfor. Reaksjonen kan hensiktsmessig utføres ved at man omsetter nitrilet II med aluminiumklorid og natriumazid i molare mengdeforhold på ca. 1:1,3. Selv om temperaturen for denne reaksjon ikke er kritisk, er fordelaktige resultater oppnådd ved løsningsmidlets tilbakekjølingstemperatur.

Ved anvendelse av hydrazosyre varmer man opp den ønskete nitrilforbindelse II med enten hydrazosyre i et inert organisk løsningsmiddel, såsom benzen, xylen eller toluen, eller med natriumazid og eddiksyre i butanol. Ved denne utførelsesform er et syretilsetningstrinn ikke nødvendig for utvinning av det ønskete sluttprodukt.

Ved fremgangsmåte b) omsettes akrylatmellomproduktet som har formelen:

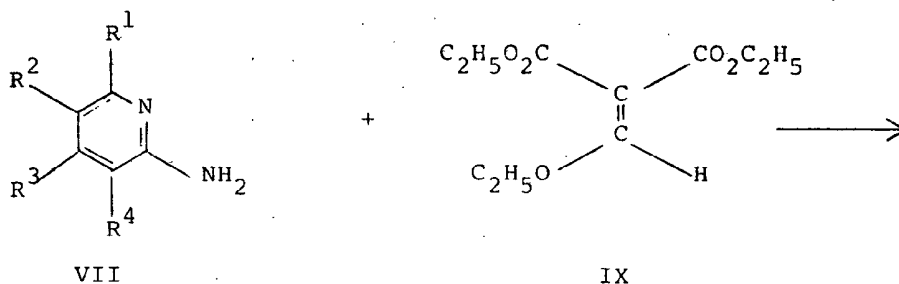


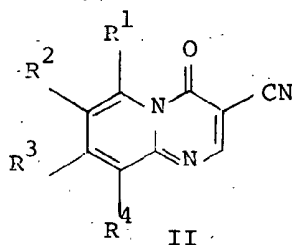
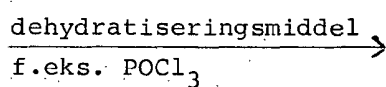
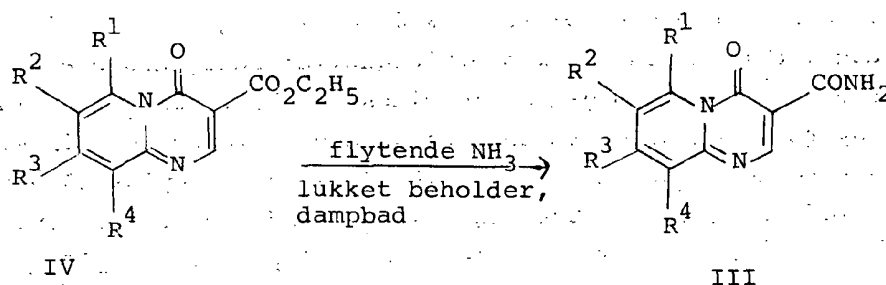
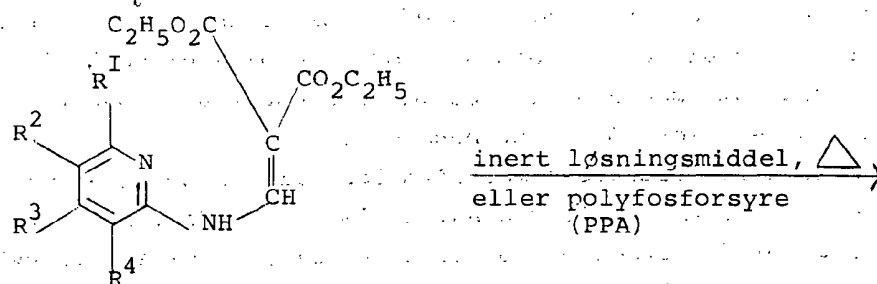
som nevnt ovenfor med aluminiumazid i tetrahydrofuran. De foretrukne reaksjonsbetingelser, dvs. molare forhold og temperaturintervaller, er som beskrevet ovenfor i forbindelse med omdannelsen av nitril til tetrazol med $\text{Al}(\text{N}_3)_3$. Produktet med formelen I kan hensiktsmessig utvinnes fra reaksjonsblandingen ved tilsetning av en tilstrekkelig mengde vann, etterfulgt av syretilsetning for å bevirke utfelling av den ønskete forbindelse I. Tetrazolproduktet I kan om ønsket deretter omdannes som diskutert ovenfor til et farmasøytisk akseptabelt salt eller til et annet produkt med formelen I med andre betydninger av substituentene R^1 , R^2 , R^3 eller R^4 .

Ved fremgangsmåte b) anvendes det omtrent ekvimolare mengder av de tre reaksjonsdeltakere, og aluminiumazidet kan hensiktsmessig fremstilles in situ ved omsetning av natriumazid og aluminiumklorid i molare mengdeforhold på ca. 3:1. For å oppnå de beste resultater utføres omsetningen ved løsningsmidlets tilbakelkjølingstemperatur. Når reaksjonen er fullført kan det ønskete produkt utvinnes ved tilsetning av en tilstrekkelig mengde vann, etterfulgt av syretilsetning for utfelling av forbindelsen I fra reaksjonsblandingen. Produktet kan som beskrevet ovenfor ytterligere omsettes til fremstilling av et farmasøytisk akseptabelt salt eller en annen forbindelse med formelen I med andre betydninger av R^1 , R^2 , R^3 eller R^4 .

Fremgangsmåte b) foretrekkes idet den muliggjør direkte fremstilling av forbindelsen I ut fra 2-aminopyridin- og etyletoksymetylcianoacetat-utgangsmaterialene uten at det er nødvendig først å fremstille og isolere ett eller flere mellomprodukter slik som nødvendig ved de ovenfor beskrevne alternative fremgangsmåter.

Nitrilutgangsmaterialene med formelen II kan fremstilles på kjent måte. Et reaksjonsskjema er vist nedenfor:





2-aminopyridinutgangsmaterialene med formelen VII er kjente forbindelser, eller de kan fremstilles ifølge i og for seg kjente fremgangsmåter.

Kondensasjon av 2-aminopyridiner (formel VII) med dietyl-
etoksymetylenmalonat (formel IX) til fremstilling av estre med
formelen IV er veldokumentert i litteraturen (se f.eks. US-patent-
skrift 3.585.198, J. Chem. Soc. (C), 2735 (1971), J. Org. Chem.,
33, 3015 (1968), Arzneim.-Forsch., 22, 815 (1972) og J. Amer. Chem.
Soc., 70, 3348 (1948) og de der anførte referanser).

Amidmellomproduktene med formelen III kan fremstilles ved
behandling av estre med formelen IV med flytende ammoniakk,
ammoniumhydroksyd eller en løsning av ammoniakk i en (lavere)-
alkanol (f.eks. metanol eller etanol), som eventuelt inneholder
natriummetoksyd som katalysator. Reaksjonen utføres hensikts-

messig i en forseglet beholder ved dampbadtemperatur. Når konsentrert ammoniakkvann anvendes er gode resultater også blitt oppnådd ved romtemperatur i løpet av 1-2 dager uten behov for hverken varme eller forseglet beholder.

Amidmellomproduktene med formelen III kan omdannes til nitrilene med formelen II ved anvendelse av et dehydratiseringsmiddel, såsom fosforpentoksyd, tionylklorid, p-toluensulfonylklorid:pyridin, eller mest foretrukket fosforoksyklorid. Dehydratisering utføres ved høyere temperaturer, helst under tilbakekjølingsbetingelser.

Akrylatutgangsmaterialene med formelen VI kan fremstilles ved at man kondenserer omtrent ekvimolare mengder av et 2-aminopyridin med formelen VII med etyletoksymetylcianoacetat med eller uten et inert organisk løsningsmiddel, f.eks. er aromatisk hydrokarbon såsom toluen. Reaksjonen utføres fortrinnsvis ved høyere temperaturer, f.eks. 100°C. Noen eksempler på akrylater med formelen VI (dvs. når pyridinringen er usubstituert eller substituert i 3-, 4- eller 6-stillingen med metyl) er omtalt av Antaki i J. Amer. Chem. Soc., 80, 3066 (1958) og av Nishigaki et al. i J. heterocycl. Chem. 8, 759 (1971).

Forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen kan anvendes til inhibering eller forebyggelse av symptomene på en allergisk reaksjon, såsom allergisk bronkial astma eller allergisk rhinitis i pattedyr, herunder i mennesker, som er utsatt for en slik reaksjon, idet det til ved-

kommande individ administreres en profylaktisk effektiv dose av en forbindelse med formelen I eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne.

Forbindelsene kan administreres enten som individuelle terapeutiske midler eller som blandinger med andre terapeutiske midler. De kan administreres alene, men administreres vanligvis i form av farmasøytiske preparater, dvs. blandinger av de aktive bestanddeler med egnete farmasøytiske bærere eller tynningsmidler. Eksempler på slike preparater er tabletter, pastiller, kapsler, pulver, aerosolspray, vandige eller oljeaktige suspensjoner, sirup, eliksirer og vandige løsninger. Forbindelsene administreres fortrinnsvis oralt, men kan også administreres ved inhalering, injeksjon, indrypping eller implantering for kontrollert frigivelse fra et fast bærerreservoar.

Arten av det farmasøytiske preparat og den farmasøytiske bærer eller tynningsmiddel vil selvfølgelig avhenge av den ønskete administreringsvei. F.eks. kan orale preparater være i form av tabletter eller kapsler og kan inneholde vanlige tilsetningsmidler, såsom bindemidler, f.eks. sirup, akasie, gelatin, sorbitol, tragant eller polyvinylpyrrolidon, fyllstoffer, f.eks. laktose, sukker, maisstivelse, kalsiumfosfat, sorbitol eller glykokol, smøremidler, f.eks. magnesiumstearat, talk, polyetylenglykol eller silisiumoksyd, desintegreringsmidler, f.eks. stivelse, eller fuktemidler, f.eks. natriumlaurylsulfat. Orale flytende preparater kan være i form av vandige eller oljeaktige suspensjoner, løsninger, emulsjoner, sirupper, eliksirer etc., eller kan foreligge som et tørt produkt for rekondisjonering med vann eller en annen egnet bærer før bruk. Slike flytende preparater kan inneholde konvensjonelle tilsetningsmidler, såsom suspensjonsmidler, smaksstoffer, tynnings- eller emulgeringsmidler. Til parenteral administrering, inhalering eller indrypping kan det anvendes løsninger eller suspensjoner av en forbindelse med formelen I med konvensjonelle farmasøytiske bærere, f.eks. som en aerosolspray for inhalering, som en vandig løsning til intravenøs injeksjon eller indrypping eller som en oljeaktig suspensjon til intramuskulær injeksjon. Forbindelsene kan også administreres ved hjelp av inhalatorer eller andre anordninger som gjør det mulig at de aktive forbindelser i form av tørre pulvere kan komme i direkte berøring med lungene.

Forbindelsene eller de farmasøytiske preparater av disse kan administreres til humane, allergiske pasienter i orale enkelt-

doser på 0,05-500 mg aktiv bestanddel og multiple orale doser på i alt inntil ca. 1000 mg/dag av den aktive bestanddel. Ved administrering ved inhalering eller inndrypping anvendes det vanligvis lavere doser, nemlig av størrelsesorden ca. 0,1 av den normale orale dosering for vedkommende forbindelse. Disse verdier er imidlertid bare veiledende, og legen må selvfølgelig i siste instans bestemme den dose som er mest egnet for en pasient på basis av faktorer såsom alder, vekt, alvor av symptomene og det spesielle middel som skal administreres.

De etterfølgende in vivo dyremodellforsøk viser at forbindelsene med formelen I er kraftigvirkende antiallergiske midler.

Biologiske aktivitetsdata

fremstilt

Til undersøkelse av forbindelsene ifølge oppfinnelsen ble det anvendt den reaginfrembrakte, passive kutane anafylaksiut-silinsprøve på rotter, som generelt betraktes om en av de beste dyremodeller til bruk for forutsigelse av den antiallergiske aktivitet av en prøveforbindelse i mennesker. I korte trekk går denne fremgangsmåte ut på passiv sensibilisering av hudområder på prøvedyrene med reagin-antistoffer, etterfulgt av 24 timers forløp av administrering av prøveforbindelsen og antigenet. Den allergiske reaksjon måles ved anvendelse av Evans' blå fargestoff og vurderes ved flekkdiameteren på injeksjonsstedet. Detaljer vedrørende prøven er angitt nedenfor.

Materialer

Ovalbumin (5 ganger krystallinsk)
Dinitrobenzensulfonsyre, Na⁺-salt
Bordetella pertussis vaksine - fase I
10-20 x 10⁹ drepte organismer/ml
Aluminiumhydroksydgel - 10 mg/ml
Kaliumkarbonat
Sprague-Dawley (S/D) hannrotter - 200 g
Sprague-Dawley hunnrotter - 100 g
Tris puffer saltløsning (TBS) - 0,02 M 2-amino-2-hydroksymetyl-1,3-propandiol (Tris), 0,15 M NaCl, pH 8,2

Antigenfremstilling - DNP-d EA

Et substituert ovalbuminantigen anvendes både som immunogen og angrepsantigen. Antigenet fremstilles på følgende måte: 500 mg

ovalbumin (EA) og 500 mg K_2CO_3 løses i 25 ml vann og omrøres ved romtemperatur i 5 minutter. 500 mg dinitrobenzensulfonsyre, Na^+ -salt (på forhånd omkrystallisert fra varm absolutt etanol) tilsettes deretter langsomt under fortsatt omrøring. Reaksjonsblandingen anbringes deretter straks i mørket, og reaksjonen fortsetter i 2 timer under stadig omrøring. Etter 2 timer anbringes blandingen i passende dialyseslanger og dialyseres overfor 5 porsjoner (hver på 4 liter) destillert H_2O ved $5^\circ C$. Etter dialyse lyofiliseres produktet og oppbevares ved romtemperatur i en brun eller brungul beholder. Det oppnådde antigen vil fremtre som et lysegult, amorft, fast stoff som er meget løselig i vann eller saltvann. Det betegnes DNP denaturert ovalbumin (DNP-d EA).

Immuniseringsmetode for IgE-fremstilling

Voksne Sprague-Dawley hannrotter anvendes som kilde for reaginrike antisera for den passive kutane anafylaksiutsilingsmodell. Immuniseringen foregår ved en kombinasjon av DNP-d EA på $Al(OH)_3$ -gel og B. pertussis vaksine. Fremstilling av DNP-d EA-gel-immunogenet foregår på følgende måte: DNP-d EA løses i TBS til en konsentrasjon på 10 mg/ml. Det tilsettes langsomt 1 ml av denne løsning til 10 ml $Al(OH)_3$ -gel (10 mg tørrstoff/ml) under konstant omrøring ved romtemperatur. Blandingen omrøres i ytterligere 30 minutter for å sikre en jevn adsorpsjon av antigen på gel.

Det resulterende preparat anvendes deretter i kombinasjon med fase I B. pertussis vaksine for immunisering av S/D-hannrotter på følgende måte: Til hver rotte administreres 0,1 ml DNP-d EA-gelsuspensjon intramuskulært i begge bakben (totaldose 200 μg DNP-d EA og 2 mg gel). Disse injeksjoner etterfølges av intraperitoneal administrering av 1,0 ml B. pertussis vaksine ($10-20 \times 10^9$ organismer). Anvendelse av lett eteranestesi under denne prosedyre anbefales for å sikre gode intramuskulære og intraperitoneale injeksjoner. 9 dager etter immuniseringen (men høyst 10) tappes blodet av dyrene ved kardial punktur eller kanyleanbringelse i bukaorta under eter- eller pentobarbitalanestesi. Det oppsamlete helblod tillates å størkne, serumet fraskilles ved sentrifugering, og de individuelle serumprøver oppbevares i frossen tilstand inntil de undersøkes for IgE-innhold.

Utvelgelse av høytiter serumprøver til forråd.

De individuelle serumprøver bør utsiles vedrørende reagin-antistoffkonsentrasjon før de blandes med andre sera, idet ikke alle rotter reagerer på immunisering ved reaginproduksjon. En 1:50 saltvannsfortynning av serum fra hver immunisert rotte anvendes til dette formål. Intradermale injeksjoner på 0,05 ml av de fortynnete sera frembringes i den avbarberte rygg på to små hunnrecipientrotter, 100-120 g. Atskillige serumprøver kan prøves samtidig i resipientdyr. Etter en hvileperiode på 24 - 48 timer foretas antigenangrep ved intravenøs administrering i hver rotte av 1 mg DNP-d EA i 0,5 ml 0,5 prosentig Evans' blå fargestoff i saltvann. Sera som oppviser positive passive kutane anafylaksireaksjoner ved 1:50 fortynning, målt 20-30 minutter etter angrepet, blandes, fordeles i små porsjoner og oppbevares ved -70°C eller lavere inntil de skal anvendes. Negative sera kan kasseres.

IgE-titeren for antiserablandingen skal deretter bestemmes. To serier av fortynninger (1:5-1:60) av henholdsvis uoppvarmet serum og serum som er oppvarmet til 56°C i 1 time, fremstilles i saltvann, og 0,05 ml av hver fortynning injiseres intradermalt i ryggen på hunnrecipientrottene. Minst 4 dyr bør anvendes for titreringen med både oppvarmet og uoppvarmet serum. Etter en 24 timers hvileperiode angripes hver gruppe med 1 ml DNP-d EA i 0,5 ml 0,5 prosentig Evans' blå fargestoff. Reaksjonene avleses ved å iaktta huden 20-30 minutter etter angrepet. Intensiteten (blåfargingen) og flekkdiameteren måles og noteres. Blandingen titerdefineres som den resiproke verdi av den største fortynning av uoppvarmet serum som gir en målbar passiv kutan anafylaksireaksjon (>6 mm diameter) i minst halvdelen av resipientdyrene. Antiserumblandinger med en titer på 50 eller mer er akseptable for passiv kutan anafylaksiutsiling. Disse blandinger sterilfiltreres og oppbevares ved -70°C eller lavere inntil de skal anvendes. Lyofilisering i små porsjoner kan benyttes som alternativ.

Passiv kutan anafylaksiutsilingsmetode

1. Dyr, unge Sprague-Dawley-hunnrotter, 90-110 g, bør anvendes. Rottene bør kondisjoneres (akklimeres) i minst 5 dager før bruken med mat og vann etter behag.

2. Passiv sensibilisering. Prøvedyrene prepareres for passiv sensibilisering ved omhyggelig barbering av områder på

hver side av ryggen med en fintannet maskinsaks. Anvendelsen av en ca. 1,6 mm nål nr. 27 anbrakt på en 1 ml tuberkulinsprøyte gir intradermale injeksjoner av saltvannsoppløsninger av antiserumblanding. 4 fortynninger (2 på hver side) av antiserum anvendes. De nøyaktige fortynninger som anvendes avhenger av blandingens titer. Dersom f.eks. antiserumblandingen har en titer på 50, anvendes det fortynninger på 1:10, 1:20, 1:30 og 1:40, dersom blandingens titer er 100 vil fortynningene være 1:20, 1:40, 1:60 og 1:80. Rekkefølgen av anbringelsen av hver fortynning bør være enten med eller mot urviserretningen for å lette vurderingen av resultatet. Hvileperioden bør være minst 24 timer, men høyst 48 timer.

3. Legemiddeladministrering, standard og ukjente. Det anvendes 4 dyr for hver prøveforbindelse. Dinatriumkromoglykat (DSCG) oppløst i saltvann administreres intravenøst (i.v.) på tidspunktet for antigenangrepet. Tetrazolprøveforbindelsene oppløses i vandig natriumdikarbonat. Prøveforbindelsene administreres intravenøst eller per os (p.o.) enten 1-5 eller 10 minutter før antigenangrepet.

4. Antigenangrep og reaksjonsvurdering. Frembringelse av den passive kutane anafylaksireaksjon foregår ved intravenøs administrering av 1 mg DNP-d EA i 0,5 ml 0,5 prosentig Evans' blå fargestoff i saltvann til hver prøverotte. Reaksjonene er maksimale 20-30 minutter etter angrepet. Reaksjonene vurderes visuelt med hensyn til fargeintensitet, og flekkenes gjennomsnittlige diameter måles på hvert injeksjonssted. Begge operasjoner bør foretas ved refleksjon av huden. Til sammenlikningsformål bør antallet i kontrollgruppen (ubehandlet) være minst 5% og vanligvis 10% av det totale antall dyr som er prøvet en bestemt dag.

Den for en aktiv forbindelse iaktatt inhibering angis som prosent reduksjon i effektiv antiserumtiter i behandlede grupper overfor kontrollgrupper.

Resultater

Prøveresultater for visse av de foretrukne forbindelser som fremstilles ifølge oppfinnelsen ved administrering intravenøst og per os er vist i tabell I nedenfor sammen med data for DSCG. Resultatene er anført som ID_{50} -verdier, dvs. den dose av forbindelse som inhiberer 50% av reaksjonen.

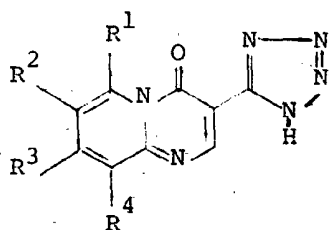
150361

14

Tabell I.

Data for passiv kutan anafylaksi for rotter for 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-oner

Forbindelse



Eksempel nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	ID ₅₀ i mg/kg	
					i.v.	p.o.
1,2,3	H	H	H	H	0,06	~0,1
4	H	CH ₃	H	H		~0,1
5	H	H	CH ₃	H		2,4
6	H	CH ₃ CH ₂	H	H		0,04
7	H	CH ₃ (CH ₂) ₃	H	H		~0,1
8	H	C ₆ H ₅	H	H		0,05
9	H	Cl	H	H		~0,07
10	H	H	H	CH ₃		0,0066
11	H	CH ₃	H	CH ₃		0,014
12	H	H	H	C ₂ H ₅		~0,0033
13	H	H	H	CH ₃ (CH ₂) ₂		0,004
14	H	H	H	CH ₃ (CH ₂) ₃		0,007
15	H	H	H	Cl		0,05
16	H	H	H	CH ₃ O		0,07
17	CH ₃	H	H	H		0,02
DSCG					~0,6	»30

Oppfinnelsen vil bli nærmere belyst i de følgende utførelseseksempler. "Skellysolve B" er en petroleumseterfraksjon med kokepunkt 60-68°C, som hovedsakelig består av n-heksan.

Fremstilling av utgangsmaterialerA. 2-aminopyridiner (generell formel VII)Forberedelse A1: 2-amino-5-etylpyridina. Benzyl-(5-etyl-2-pyridyl)-karbamat.

4,04 g (14,7 mmol) difenylfosforylazid ble tilsatt til en oppløsning av 2,22 g (14,7 mmol) 5-etylpyridin-2-karboksylsyre, 1,485 g (14,7 mmol) trietylamin og 1,75 g (16,17 mmol) benzylalkohol i 23,5 ml 1,4-dioksan, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 1 time. 1,4-dioksanen ble fjernet under senket trykk. En oppløsning av resten i toluen ble vasket i rekkefølge med vann, vandig natriumbikarbonat og saltvann, og deretter tørket over natriumsulfat. Toluenen ble fjernet og resten omkrystallisert fra 2-propanol, hvorved det ble oppnådd 1,9 g (50,5%) benzyl-(5-etyl-2-pyridyl)-karbamat, smeltepunkt 125-127°C. En analytisk prøve hadde smeltepunkt 127-130°C.

Analyse, beregnet for $C_{15}H_{16}N_2O_2$: C: 70,29; H: 6,29; N: 10,93.

Funnet: C: 70,01; H: 6,32; N: 10,72.

b. 2-amino-5-etylpyridin

En suspensjon av 1,9 g (7,43 mmol) benzyl-(5-etyl-2-pyridyl)-karbamat og 0,4 g 10% palladium-på-karbon i 100 ml etanol ble rystet med hydrogen ved et trykk på 3,5 kg/cm² i 2 timer. Katalysatoren ble fjernet ved filtrering, og filtratet ble konsentrert hvorved det ble oppnådd 0,9 g (99,4%) 2-amino-5-etylpyridin som en fargeløs olje.

Forberedelse A2: 2-amino-5-n-butylpyridina. Benzyl-(5-n-butyl-2-pyridyl)-karbamat

1,5 g (5,58 mmol) difenylfosforylazid ble tilsatt til en oppløsning av 1,0 g (5,58 mmol) 5-n-butylpyridin-2-karboksylsyre, 0,565 g (5,58 mmol) trietylamin og 0,663 g (6,12 mmol) benzylalkohol i 9,0 ml 1,4-dioksan ved 25°C. Den omrørte oppløsning ble oppvarmet inntil en eksoterm reaksjon begynte. Etter at den eksoterme reaksjon var stilnet av, ble oppløsningen oppvarmet med tilbakekjøling i 1,5 time. Reaksjonsblandingen ble konsentrert, og resten ble oppløst i toluen. Denne oppløsning ble vasket i rekkefølge med vann, 10 prosentig vandig natriumbikarbonat og saltvann og deretter tørket over natriumsulfat. Oppløsningen ble konsentrert og resten omkrystallisert fra 2-propanol, hvorved det ble oppnådd 0,91 g (57%) av forbindelsen, smeltepunkt

150361

16

142-143°C.

Analyse, beregnet for $C_{17}H_{20}N_2O_2$: C: 71,80; H: 7,09; N: 9,85.

Funnet: C: 71,72; H: 6,85; N: 9,87.

b. 2-amino-5-n-butylpyridin

En blanding av 6,5 g (22,86 mmol) benzyl-(5-n-butyl-2-pyridyl)-karbamat og 2,7 g 10% palladium-på-karbon i 400 ml etanol ble rystet ved romtemperatur i 2 timer i en hydrogenatmosfære ved et begynnelsestrykk på 3,52 kg/cm². Blandingen ble filtrert, og filtratet minsket til tørr tilstand, hvorved det ble etterlatt 3,42 g (99,7%) 2-amino-5-n-butylpyridin, smeltepunkt 30-33°C (litteraturen angir smeltepunkt 35-36°C i Helv. Chim. Acta, 39, 505 (1956)).

Forberedelse A3: 2-amino-5-fenylpyridin

En oppløsning av 4,0 g (0,021 mol) 2-klor-5-fenylpyridin i 160 ml tørr dietyleter ble dråpevis tilsatt til en oppløsning av 3,39 g (0,15 g-atom) natrium i 160 ml flytende ammoniakk som inneholdt 0,095 g jern-II-nitratheksahydrat. Den resulterende oppslemming ble tilbakekjølt i 4 timer. Ammoniumklorid ble tilsatt, og ammoniakken fikk avdampe. Resten ble behandlet med 5 ml 5 prosentig vandig natriumhydroksyd. Blandingen ble filtrert. Det vandige sjikt ble ekstrahert med eter (2 x 100 ml). De kombinerte etersjikt ble vasket med saltvann og tørket over natriumsulfat. Oppløsningen ble konsentrert, og resten ble omkrystallisert fra metylcykloheksan. Produktet ble fildelt med 100 ml kloroform. Blandingen ble filtrert, og filtratet ble inn-dampet, hvorved det ble oppnådd 1,3 g (36%) 2-amino-5-fenylpyridin, smeltepunkt 133-135°C (litteraturen angir smeltepunkt 133°C i Chem. Ber., 91, 247 (1958)).

Forberedelse A4: 2-amino-3,5-dimetylpyridin

60 mg jern-II-nitratheksahydrat etterfulgt av 4,5 g natrium (0,196 g-atom) ble tilsatt til flytende ammoniakk. Til denne blanding ble det tilsatt en oppløsning av 10,0 g (0,093 mol) 3,5-dimetylpyridin i 21 ml N,N-dimetylanilin i løpet av et tidsrom på 5 minutter. Ammoniakken fikk avdampe, og resten ble oppvarmet under nitrogen ved hjelp av et oljebad som ble holdt på 180°C i 18 timer. Den avkjølte rest ble behandlet med 50 g is, etterfulgt av 50 ml 2N natriumhydroksyd. Blandingen ble findelt

i 2 timer og deretter filtrert. Det oppsamlete faste stoff ble vasket med kokende toluen (2 x 100 ml). Toluensjiktet ble atskilt fra det kombinerte filtrat og vaskevæskene, konsentrert til ca. 50 ml og ekstrahert med 5 prosentig vandig eddiksyre (5 x 20 ml). De kombinerte ekstrakter ble filtrert og minsket til tørr tilstand. Resten ble omkrystallisert fra metylcykloheksan, hvorved det ble oppnådd 4,9 g (29%) 2-amino-3,5-dimetylpyridinacetat, smeltepunkt 85-95°C.

2,5 g (1,37 mmol) av acetatet ble suspendert kortvarig i 50 ml 1N natriumhydroksyd. Blandingen ble ekstrahert med metylenklorid. Ekstrakten ble vasket med vann, tørket og konsentrert hvorved 2-amino-3,5-dimetylpyridin ble oppnådd som en olje.

Forberedelse A5: 2-amino-3-n-propylpyridin

Denne forbindelse ble fremstilt ved direkte aminering av 3-n-propylpyridin ved en fremgangsmåte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av 2-amino-3-etylpyridin.¹ Utgangsblandingen av 2-amino-3-n-propylpyridin og 2-amino-5-n-propylpyridin ble atskilt ved høytrykksvæskeskromatografi. 2-amino-3-n-propylpyridin ble omkrystallisert fra n-heptan, og forbindelsen hadde et smeltepunkt på 25-27°C.

B. Karboksamidmellomprodukter (generell formel III)

Forberedelse B1: 4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karboksamid

En stålautoklav som inneholdt 14,0 g (0,064 mol) etyl-4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karboksylat og ca 55 ml flytende ammoniakk ble oppvarmet på et dampbad i 2 timer og deretter oppbevart ved 25°C i 18 timer. Ammoniakken ble fjernet, hvorved det ble etterlatt et fast stoff som ble omkrystallisert fra 2-metoksyetanol, hvorved det ble oppnådd 4,2 g (34,6%) av forbindelsen, smeltepunkt 266-268°C (litteraturen angir smeltepunkt 264-268°C i J. Chem. Soc. (C), 2735 (1971)).

Forberedelse B2: 7-klor-4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karboksamid

En suspensjon av 9,7 g (0,038 mol) etyl-7-klor-4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karboksylat i 75 ml ammoniumhydroksyd (densitet 0,9) ble findelt ved romtemperatur i 18 timer. Blandingen ble filtrert, og det oppsamlete faste stoff ble findelt igjen ved romtemperatur i 100 ml ammoniumhydroksyd (densitet 0,9) i ytterligere 18 timer. Det faste stoff ble opp-

150361

18

samlet ved filtrering, vasket med kaldt vann og tørket, hvorved det ble oppnådd 7,7 g (90%) av forbindelsen, smeltepunkt 281-285°C. En liten prøve ble omkrystallisert fra 2-metoksyetanol hvorved det ble oppnådd et analytisk materiale med smeltepunkt 285-287°C.

Analyse, beregnet for $C_9H_6ClN_3O_2$:

C: 48,34; H: 2,70; Cl: 15,86; N: 18,79.

Funnet: C: 48,54; H: 2,73; Cl: 15,46; N: 19,17.

C. Nitriler (generell formel II)

Forberedelse C1: 4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karbonitril

En blanding av 3,6 g (0,019 mol) 4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karboksamid og 50 ml fosforoksyklorid ble oppvarmet med tilbakekjøling i 2 timer. Blandingen ble konsentrert, og den faste rest ble delt mellom metylenklorid og vandig natriumkarbonat. Metylenkloridsjiktet ble vasket med vann, tørket og konsentrert. Resten ble omkrystallisert fra toluen, hvorved det ble oppnådd 2,5 g (76,8%) av forbindelsen, smeltepunkt 219-221°C. Omkrystallisasjon fra etanol ga analytisk materiale, smeltepunkt 219-220°C (litteraturen angir smeltepunkt 208°C i J. Amer. Chem. Soc., 80, 3066 (1958)).

Forberedelse C2: 7-klor-4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karbonitril

En suspensjon av 7,55 g (33,8 mmol) 7-klor-4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karboksamid i 200 ml fosforoksyklorid ble oppvarmet med tilbakekjøling i 3 ½ time. Oppløsningen ble konsentrert. En oppløsning av det tilbakeblevne faste stoff i metylenklorid ble tilsatt til isvann. Metylenkloridsjiktet ble konsentrert, og resten ble omkrystallisert fra 2-metoksymetanol, hvorved det ble oppnådd 4,0 g (57,6%) av forbindelsen, smeltepunkt 239-241°C.

Analyse, beregnet for $C_9H_5ClN_3O$: C: 52,57; H: 1,96; Cl: 17,25; N: 20,44.

Funnet: C: 52,52; H: 2,08; Cl: 16,60; N: 20,32.

D. Akrylater (generell formel VI)

Forberedelse D1: Etyl-2-cyano-3-(5-metyl-2-pyridylamino)-akrylat

En blanding av 5,0 g (46,2 mmol) 2-amino-5-metylpyridin og 7,82 g (46,2 mmol) etyletoksymetylenocynoacetat ble oppvarmet ved hjelp av et oljebad, som ble holdt på 100°C i 15 minutter.

Blandingen ble avkjølt, og det resulterende faste stoff ble omkrystallisert fra acetonitril, hvorved det ble oppnådd 5,4 g (50,5%) av forbindelsen, smeltepunkt 170-171,5°C.

Analyse, beregnet for $C_{12}H_{13}N_3O_2$:

C: 62,32; H: 5,67; N: 18,17,

Funnet:

C: 62,44; H: 5,74; N: 18,05.

Forberedelse D2: Etyl-2-cyano-3-(5-etyl-2-pyridylamino)-akrylat

Denne forbindelse (smeltepunkt 155-156°C, 25,4% utbytte) ble fremstilt ut fra 2-amino-5-etylpyridin og etyletoksymetylen-cyanoacetat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av etyl-2-cyano-3-(5-metyl-2-pyridylamino)-akrylat under forberedelse D1.

Analyse, beregnet for $C_{13}H_{15}N_3O_2$: C: 63,66; H: 6,16; N: 17,13

Funnet:

C: 63,54; H: 6,09; N: 17,02.

Forberedelse D3: Etyl-2-cyano-3-(5-n-butyl-2-pyridylamino)-akrylat

En oppløsning av 3,72 g (23,43 mmol) 2-amino-5-n-butylpyridin og 3,96 g (23,43 mmol) etyletoksymetylen-cyanoacetat i toluen ble oppvarmet i 10 minutter ved hjelp av et oljebad som ble holdt på 100°C. Oppløsningen ble avkjølt og behandlet med 200 ml "Skellysolve B". Blandingen ble fildelt i 18 timer ved romtemperatur og deretter filtrert. Den oppsamlete forbindelse (4,3 g, 67,2%) hadde smeltepunkt på 69-73°C.

Forberedelse D4: Etyl-2-cyano-3-(5-fenyl-2-pyridylamino)-akrylat

En blanding av 1,19 g (6,99 mmol) 2-amino-5-fenylpyridin og 1,18 g (6,99 mmol) etyletoksymetylen-cyanoacetat ble smeltet ved en oljebadstemperatur på 100°C i 15 minutter. Produktet ble omkrystallisert fra toluen, hvorved det ble oppnådd 1,3 g av forbindelsen som hadde et smeltepunkt på 126-134°C. En ytterligere mengde av produktet (0,3 g), smeltepunkt 119-126°C, ble oppnådd fra moderlutene. Totalutbytte av produktet var 1,6 g (78%).

Forberedelse D5: Etyl-2-cyano-3-(3-metyl-2-pyridylamino)-akrylat

En oppløsning av 5,0 g (0,0462 mol) 2-amino-3-metylpyridin og 7,82 g (0,0462 mol) etyletoksymetylen-cyanoacetat i 4 ml toluen ble oppvarmet i 15 minutter ved hjelp av et oljebad som ble holdt på 100°C. Oppløsningen ble avkjølt, og 9,1 g (85%) av forbindelsen

150361

20

ble oppsamlet ved filtrering. Produktet som hadde et smeltepunkt på 139-143°C, ble omkrystallisert fra 2-propanol, hvorved det ble oppnådd en analytisk prøve med smeltepunkt 144-146°C.

Analyse, beregnet for $C_{12}H_{13}N_3O_2$: C: 62,32; H: 5,67; N: 18,17.

Funnet: C: 61,87; H: 5,63; N: 18,42.

Forberedelse D6: Etyl-2-cyano-3-(3,5-dimetyl-2-pyridylamino)-akrylat.

Denne forbindelse (79% utbytte), smeltepunkt 156-159°C fra metylcykloheksan, ble fremstilt på tilsvarende måte som den som er beskrevet for fremstillingen av etyl-2-cyano-3-(3-metyl-2-pyridylamino)-akrylat under fremstilling D5.

Analyse, beregnet for $C_{13}H_{15}N_3O_2$: C: 63,66; H: 6,16; N: 17,13.

Funnet: C: 63,94; H: 6,24; N: 16,78.

Forberedelse D7: Etyl-2-cyano-3-(3-etyl-2-pyridylamino)-akrylat

En oppløsning av 13,0 g (0,1063 mol) 2-amino-3-etylpyridin og 18,0 g (0,1063 mol) etyletoksymetylcianoacetat i 50 ml toluen ble oppvarmet på dampbad i 20 minutter. Oppløsningen ble avkjølt og blandingen tynnet med "Skellysolve B". Blandingene ble filtrert hvorved det ble oppnådd 19,0 g av forbindelsen, smeltepunkt 122-125°C. Filtratet ble minsket til tørr tilstand, og resten ble omkrystallisert fra cykloheksan hvorved det ble oppnådd ytterligere 7,0 g av produktet, smeltepunkt 122-125°C (totalutbytte 99,6%). En porsjon av den andre mengde ble omkrystallisert to ganger fra metanol, hvorved det ble oppnådd et analytisk materiale med smeltepunkt 123-125°C.

Analyse, beregnet for $C_{13}H_{15}N_3O_2$: C: 63,66; H: 6,16; N: 17,13.

Funnet: C: 63,49; H: 6,18; N: 17,13.

Forberedelse D8: Etyl-2-cyano-3-(3-n-propyl-2-pyridylamino)-akrylat.

Denne forbindelse (smeltepunkt 99-100°C, 60% utbytte) ble fremstilt ut fra 2-amino-3-n-propylpyridin og etyletoksymetylcianoacetat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av etyl-2-cyano-3-(5-n-butyl-2-pyridylamino)-akrylat under forberedelse D3.

Analyse, beregnet for $C_{14}H_{17}N_3O_2$: C: 64,84; H: 6,61; N: 16,21.

Funnet: C: 64,83; H: 6,61; N: 16,07.

Forberedelse D9: Etyl-2-cyano-3-(3-n-butyl-2-pyridylamino)-akrylat.

Denne forbindelse (smeltepunkt 98,5-99,5°C, 84% utbytte) ble fremstilt ut fra 2-amino-3-n-butylpyridin og etyletoksymetylen-cyanoacetat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av etyl-2-cyano-3-(5-n-butyl-pyridylamino)-akrylat under forberedelse D3.

Analyse, beregnet for $C_{15}H_{19}N_3O_2$: C: 65,91; H: 7,01; N: 15,37.

Funnet: C: 65,73; H: 6,95; N: 15,32.

Forberedelse D10: Etyl-2-cyano-3-(3-klor-2-pyridylamino)-akrylat.

Denne forbindelse (smeltepunkt 139,5-141,5°C, 44% utbytte) ble fremstilt ut fra 2-amino-3-klorpyridin og etyletoksymetylen-cyanoacetat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av etyl-2-cyano-3-(5-n-butyl-2-pyridylamino)-akrylat under forberedelse D3.

Analyse, beregnet for $C_{11}H_{10}ClN_3O_2$:

C: 52,50; H: 4,01; Cl: 14,09; N: 16,7.

Funnet: C: 52,22; H: 3,98; Cl: 13,93; N: 17,0.

Forberedelse D11: Etyl-2-cyano-3-(3-metoksy-2-pyridylamino)-akrylat.

Denne forbindelse (smeltepunkt 187-188°C, 43% utbytte) ble fremstilt ut fra 2-amino-3-metoksy-pyridin og etyletoksymetylen-cyanoacetat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av etyl-2-cyano-3-(5-n-butyl-2-pyridylamino)-akrylat under forberedelse D3.

Analyse, beregnet for $C_{12}H_{13}N_3O_3$: C: 58,29; H: 5,30; N: 17,00.

Funnet: C: 58,01; H: 5,34; N: 17,14.

Eksempel 1

3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on (via nitril II).

En omrørt blanding av 2,17 g (0,0127 mol) 4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karbonitril, 0,911 g (0,014 mol) natriumazid og 0,75 g (0,014 mol) ammoniumklorid i 20 ml N,N-dimetylformamid ble oppvarmet ved hjelp av et oljebad, som ble holdt på 120°C i 19 timer. Løsningsmidlet ble fjernet, og resten ble behandlet med varmt, vandig natriumbikarbonat. Blandingen ble filtrert. Filtratet ble surgjort med eddiksyre. Bunnfallet ble oppsamlet og omkrystallisert fra eddiksyre, hvorved det ble oppnådd 0,52 g (19%) av forbindelsen, smeltepunkt 308-309°C

150361

22

(under spalting). Omkrystallisasjon fra eddiksyre med trekullbehandling ga analytisk materiale, smeltepunkt 311-312°C (under spalting).

Analyse, beregnet for $C_9H_6N_6O$: C: 50,46; H: 2,82; N: 39,24.

Funnet. C: 50,16; H: 2,81; N: 39,18.

Eksempel 2

3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on (via akrylat VI).

0,74 g (5,56 mmol) aluminiumklorid ble forsiktig tilsatt til 33 ml tetrahydrofuran ved -20°C . Deretter ble det tilsatt 1,0 g (16,6 mmol) natriumazid, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 30 minutter. Etter tilsetning av 1,0 g (4,6 mmol) etyl-2-cyano-3-(2-pyridylamino)-akrylat ble blandingen oppvarmet igjen med tilbakekjøling i 18 timer. Blandingene ble avkjølt på et isbad, behandlet med 170 ml vann og surgjort til pH-verdi 2 med 6N saltsyre. Den resulterende oppslemming ble omrørt under avkjøling i 2 timer og deretter filtrert. Det oppsamlete faste stoff ble omkrystallisert fra N,N-dimetylformamid, hvorved det ble oppnådd 0,38 g (38,5%) av forbindelsen, smeltepunkt 308-309°C (under spalting).

Eksempel 3

3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on (via 2-aminopyridin + etoksymetylcyanacetat + $\text{Al}(\text{N}_3)_3$ uten isolering av mellomprodukter).

1,73 g (12,96 mmol) aluminiumklorid ble tilsatt til 45 ml tetrahydrofuran ved -20°C . Deretter ble det tilsatt 2,52 g (38,71 mmol) natriumazid, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 40 minutter. Til denne blanding ble det tilsatt 1,0 g (10,62 mmol) 2-aminopyridin og 1,8 g (10,62 mmol) etyletoksymetylcyanacetat. Blandingene ble oppvarmet med tilbakekjøling i 18 timer. Blandingene ble konsentrert, resten ble behandlet med 50 ml vann. Blandingene ble surgjort til pH-verdi 3 med 6N saltsyre. Det faste stoff ble oppsamlet og oppslemmet i 3 prosentig, vandig natriumbikarbonat. Blandingene ble oppvarmet med tilbakekjøling i 5 minutter, filtrert, og filtratet ble surgjort til pH-verdi 4 med 6N saltsyre. Bunnfallet ble omkrystallisert fra N,N-dimetylformamid, hvorved det ble oppnådd 0,35 g (15,4%) av forbindelsen, smeltepunkt 312-313°C (under spalting).

Eksempel 47-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

På tilsvarende måte som den som er beskrevet for fremstilling av 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 2 ble denne forbindelse fremstilt ut fra etyl-2-cyano-3-(5-metyl-2-pyridylamino)-akrylat. Forbindelsen (42,8% utbytte) hadde smeltepunkt på 321-322°C (under spalting) etter omkrystallisasjon fra iseddik.

Analyse, beregnet for $C_{10}H_8N_6O$: C: 52,63; H: 3,53; N: 36,83,
 Funnet: C: 52,26; H: 3,40; N: 36,47.

Eksempel 58-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

Denne forbindelse (16% utbytte, smeltepunkt 307°C under spalting) ble fremstilt ut fra etyl-2-cyano-3-(4-metyl-2-pyridylamino)-akrylat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 2.

Analyse, beregnet for $C_{10}H_8N_6O$: C: 52,63; H: 3,53; N: 36,83.
 Funnet: C: 52,57; H: 3,27; N: 36,92 (korrigert for 2,7% H_2O)

Fremstilling av utgangsmaterialeakrylatet er beskrevet i J. Heterocycl. Chem. 8, 759 (1971).

Eksempel 67-etyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

Denne forbindelse (28% utbytte, smeltepunkt 289-290,5°C under spalting) ble fremstilt ut fra etyl-2-cyano-3-(5-etyl-2-pyridylamino)-akrylat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 2.

Analyse, beregnet for $C_{11}H_{10}N_6O$: C: 54,54; H: 4,16; N: 34,70.
 Funnet: C: 54,31; H: 4,09; N: 34,52.

Eksempel 77-n-butyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

0,89 g (6,67 mmol) aluminiumklorid ble forsiktig tilsatt til 42 ml kald (-30°C) tetrahydrofuran. Deretter ble det tilsatt 1,3 g (20,0 mmol) natriumazid, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 40 minutter. 1,50 g (5,49 mmol) etyl-2-cyano-3-(5-n-butyl-2-pyridylamino)-akrylat ble tilsatt, og bland-

150361

24

ingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 18 timer. Den avkjølte blanding ble konsentrert, og resten ble behandlet med 50 ml isvann. Blandingen ble surgjort til pH-verdi 3 med 6N saltsyre. Blandingen ble filtrert, og det oppsamlete faste stoff ble behandlet med kokende, 3 prosentig vandig natriumbikarbonat i 10 minutter. Blandingen ble filtrert og filtratet surgjort til pH-verdi 4 med 6N saltsyre. Bunnfallet ble omkrystallisert fra N,N-dimetylformamid, hvorved det ble oppnådd 0,45 g (30,4%) av forbindelsen, smeltepunkt 284-285°C (under spalting).

Analyse, beregnet for $C_{13}H_{14}N_6O$: C: 57,76; H: 5,22; N: 31,10.

Funnet: C: 57,37; H: 5,23; N: 31,21.

Eksempel 8

7-fenyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

På en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstilling av 7-n-betyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 7 ble denne forbindelse fremstilt (smeltepunkt 308-309°C under spalting) med 31% utbytte ut fra etyl-2-cyano-3-(5-fenyl-2-pyridylamino)-akrylat.

Analyse, beregnet for $C_{15}H_{10}N_6O$: C: 62,06; H: 3,47; N: 28,95.

Funnet: C: 61,93; H: 3,37; N: 28,67.

Eksempel 9

7-klor-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

0,72 g (5,45 mmol) aluminiumklorid ble forsiktig tilsatt til 29 ml kald (-30°C) tetrahydrofuran. 1,06 g (16,27 mmol) natriumazid ble deretter tilsatt, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 30 minutter. Deretter ble det tilsatt 1,0 g (4,47 mmol) 7-klor-4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karbonitril, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 18 timer. Den avkjølte blanding ble helt i 500 ml isvann, og den resulterende blanding ble surgjort til pH-verdi 2 med 6N saltsyre. Bunnfallet ble oppsamlet og omkrystallisert fra N,N-dimetylformamid, hvorved det ble oppnådd 0,55 g (49,5%) av forbindelsen, smeltepunkt 300-301°C (under spalting).

Analyse, beregnet for $C_9H_5ClN_6O$:

C: 43,47; H: 2,03; Cl: 14,26; N: 33,80.

Funnet: C: 43,63; H: 2,19; Cl: 13,74; N: 33,62.

Eksempel 109-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

3,51 g (0,0263 mol) aluminiumklorid ble tilsatt til 180 ml kald (-30°C) tetrahydrofuran. Deretter ble det tilsatt 5,12 g (0,0788 mol) natriumazid, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 30 minutter. Blandingen ble avkjølt til 5°C. 5,0 g (0,0216 mol) etyl-2-cyano-3-(3-metyl-2-pyridylamino)-akrylat ble tilsatt, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 18 timer. Tetrahydrofuranet ble fjernet under senket trykk. Resten ble behandlet med 100 ml isvann og surgjort til pH-verdi 3 med 6N saltsyre. Blandingen ble filtrert, og det oppsamlete faste stoff ble omkrystallisert fra N,N-dimetylformamid, hvorved det ble oppnådd 2,5 g (50,7%) av forbindelsen, smeltepunkt 310-311°C (under spalting).

Analyse, beregnet for $C_{10}H_8N_6O$: C: 52,63; H: 3,53; N: 36,83.

Funnet: C: 52,03; H: 3,51; N: 37,08.

Eksempel 117,9-dimetyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

Denne forbindelse (37,6% utbytte), smeltepunkt 308-309°C (under spalting), ble fremstilt ut fra 2-metoksyetanol på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstilling av 9-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 10.

Analyse, beregnet for $C_{11}H_{10}N_6O$: C: 54,54; H: 4,16; N: 34,70.

Funnet: C: 54,09; H: 4,10; N: 35,29.

Eksempel 129-etyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

10,0 g (0,0408 mol) etyl-2-cyano-3-(3-etyl-2-pyridylamino)-akrylat ble tilsatt til en omrørt blanding av aluminiumazid i tetrahydrofuran ved 0°C. Aluminiumazidet var blitt fremstilt in situ på vanlig måte utfra aluminiumklorid (6,5 g, 0,0488 mol) og natriumazid (9,5 g, 0,1464 mol) i tetrahydrofuran (100 ml). Blandingen ble omrørt ved 0°C i 15 minutter og deretter oppvarmet med tilbakekjøling i 19 timer. Blandingen ble avkjølt, tynnet med vann og surgjort med 20 ml konsentrert saltsyre. Blandingen ble filtrert, hvorved det ble oppnådd 2,7 g (27%) av forbindelsen, smeltepunkt 285-288°C. Produktet ble omkrystallisert fra N,N-dimetylformamid med trekullbehandling, noe som ga analytisk

150361

26

materiale med smeltepunkt 288-290°C (under spalting).

Analyse, beregnet for $C_{11}H_{10}N_6O$: C: 54,54; H: 4,16; N: 34,70.

Funnet: C: 54,70; H: 4,17; N: 35,27.

Eksempel 13

9-n-propyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimido-4-on

Denne forbindelse (smeltepunkt 269-272°C Under spalting, utbytte 27,6%) ble fremstilt ut fra etyl-2-cyano-3-(3-n-propyl-2-pyridylamino)-akrylat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 2.

Analyse, beregnet for $C_{12}H_{12}N_6O$: C: 56,24; H: 4,72; N: 32,80.

Funnet: C: 56,15; H: 4,64; N: 32,99.

Eksempel 14

9-n-butyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

Denne forbindelse (smeltepunkt 255,5-257,5°C under spalting, utbytte 30%) ble fremstilt ut fra etyl-2-cyano-3-(3-n-butyl-2-pyridylamino)-akrylat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 2.

Analyse, beregnet for $C_{13}H_{14}N_6O$: C: 57,76; H: 5,22; N: 31,10.

Funnet: C: 57,71; H: 5,32; N: 31,07.

Eksempel 15

9-klor-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

Denne forbindelse (smeltepunkt 313-315°C under spalting, utbytte 44%) ble fremstilt ut fra etyl-2-cyano-3-(3-klor-2-pyridylamino)-akrylat på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstillingen av 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 2.

Eksempel 16

9-metoksy-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

0,79 g (5,94 mmol) aluminiumklorid ble tilsatt til 35 ml avkjølt tetrahydrofuran. 1,16 g (17,82 mmol) natriumazid ble tilsatt, og blandingen ble oppvarmet med tilbakekjøling i 30 minutter. Etter tilsetning av 1,21 g (4,89 mmol) etyl-2-cyano-3-(3-metoksy-2-pyridylamino)-akrylat ble blandingen oppvarmet igjen med tilbakekjøling i 18 timer. Blandingene ble avkjølt og

behandlet med 6N saltsyre og vann (100 ml). Bunnfallet ble ekstrahert med 3 prosentig vandig natriumbikarbonat. Ekstrakten ble filtrert mens den var varm. Filtratet ble avkjølt og surgjort med saltsyre. Bunnfallet ble oppsamlet og tørket, hvorved det ble oppnådd 0,21 g av mellomproduktet etyl-2-(1H-tetrazol-5-yl)-3-(3-metoksy-2-pyridylamino)-akrylat, smeltepunkt 275-278°C under spalting. Omkrystallisasjon av dette mellomprodukt fra N,N-dimetylformamid ga 95 ml (8%) av forbindelsen, smeltepunkt 298-299°C under spalting.

Eksempel 17

6-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on.

Denne forbindelse (smeltepunkt 295-296°C under spalting, 21% utbytte) ble fremstilt ut fra 6-metyl-4-okso-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-3-karbonitril² på en måte som svarer til den som er beskrevet for fremstilling av 7-klør-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i eksempel 9.

Analyse, beregnet for $C_{19}H_8N_6O$: C: 52,63; H: 3,53; N: 36,83.

Funnet: C: 52,62; H: 3,40; N: 36,63.

Referanse nr. 2.I. Hermez er al., J. Chem. Soc., Perkin I, 789 (1977).

Eksempel 18

9-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on natriumsalt

26,5 ml 1,0 N natriumhydroksyd ble dråpevis tilsatt til 6,0 g (0,02625 mol) 9-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on i 150 ml vann. Blandingen ble tynnet med vann til et volum på ca. 300 ml og deretter oppvarmet til en temperatur på 50°C i løpet av 2 minutter. Blandingen ble filtrert, og vannet ble fjernet fra filtratet ved lyofilisering. Resten ble omkrystallisert fra vann:etanol, hvorved det ble oppnådd 5,4 g av forbindelsen, smeltepunkt 346°C (under spalting). Elementæranalyser ble foretatt på produktet etter at dette hadde vært oppbevart ved 22°C i 66 timer ved en relativ fuktighet på 50-55%.

Analyse, beregnet for $C_{10}H_7NaN_6O$: C: 48,01; H: 2,82.

Funnet: C: 47,91; H: 2,78 (korrigert for 9,01% H_2O).

Erstatning av 9-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-onen i ovennevnte fremgangsmåte ved en ekvimolar mengde av andre 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on-forbindelser fremstilt ifølge eksemplene 1-13 ovenfor gir de tilsvarende natriumsalter for hver av de angitte forbindelser.

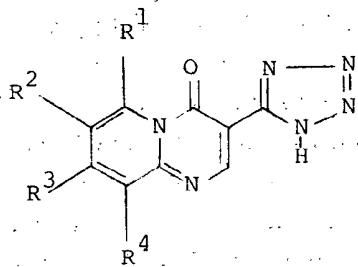
Erstatning av natriumhydroksyd i ovennevnte fremgangsmåte med andre baser, f.eks. KOH, Ca(OH)₂, Mg(OH)₂ eller NH₄OH gir de tilsvarende baseaddisjonssalter.

Omsetning av 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on-forbindelsene ifølge eksemplene 1-13 med en ekvivalent mengde etanolamin, etyldiamin, dietanolamin, trietanolamin eller tris-(hydroksymetyl)-aminometan gir de tilsvarende aminsalter for hver av de angitte forbindelser.

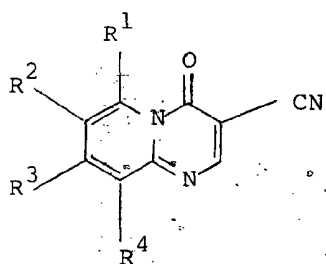
3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on-forbindelsene ifølge eksemplene 1-13 kan omdannes til syreaddisjonssaltene ved tilsetning av en støkiometrisk ekvivalent av en passende organisk eller uorganisk syre, f.eks. HCl, HBr, KI, H₃PO₄ eller CH₃COOH.

P A T E N T K R A V

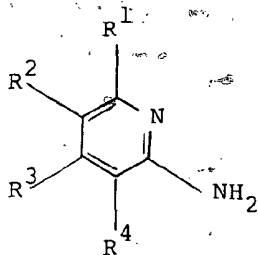
1. Analogifremgangsmåte til fremstilling av terapeutisk aktive 3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-(pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on-derivater med den generelle formel:



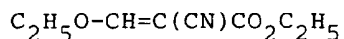
hvor R^1 , R^2 , R^3 og R^4 , som kan være like eller forskjellige, hver er hydrogen, halogen, (lavere)alkyl, (lavere)alkoksy eller fenyl og farmasøytisk akseptable salter av disse, karakterisert ved a) at man omsetter et nitril som har formelen



hvor R^1 , R^2 , R^3 og R^4 har de ovenfor anførte betydninger, med hydrazosyre eller et azidsalt i form av ammonium-, substituert ammonium-, natrium-, litium- eller aluminiumazid i et inert organisk løsningsmiddel, eller b) at man omsetter et 2-amino-pyridin, som har formelen:

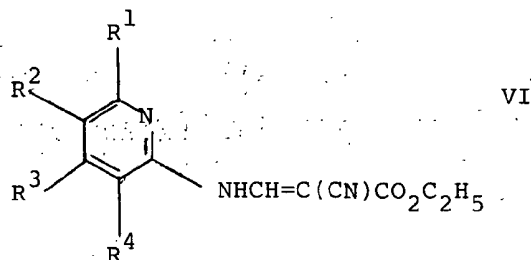


hvor R^1 , R^2 , R^3 og R^4 har de ovenfor anførte betydninger, med etyletoksymetylcyanacetat med formelen:



VIII

i nærvær av aluminiumazid i tetrahydrofuran til dannelselse av det ønskete produkt i ett trinn, eller om ønsket isolerer i fravær av aluminiumazid den resulterende forbindelse med formelen:



og behandler denne forbindelse med aluminiumazid i tetrahydrofuran, utvinner den ønskete forbindelse ved syretilsetning, og om ønsket omdanner på i og for seg kjent måte forbindelsen til et farmasøytisk akseptabelt salt.

2. Analogifremgangsmåte i samsvar med krav 1 til fremstilling av forbindelsen 9-metyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido-[1,2-a]-pyrimidin-4-on eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, karakterisert ved at det anvendes et utgangsmateriale hvor R^1 - R^3 er hydrogen og R^4 er metyl.