

19



Octroiraad
Nederland

11 192618

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 8200582

22 Ingediend: 16.02.82

51 Int.Cl.⁶
C07D401/02, C07D401/04,
C07D215/56, C07D471/04, A61K31/47,
A61K31/435

30 Voorrang:
06.03.81 JP 0032274/81

43 Ter inzage gelegd:
01.10.82 I.E. 82/19

44 Openbaargemaakt:
01.07.97 I.E. 97/07

47 Dagtekening:
04.11.97

45 Uitgegeven:
05.01.98 I.E. 98/01

73 Octrooihouder(s):
Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd. te Tokio, Japan
(JP).

74 Gemachtigde:
Ir. J.J.H. Van kan c.s. te 5600 AP Eindhoven.

54 Chinolinecarbonzuurderivaat en toepassing als anti-bacterieel middel.

Cholinecarbonzuurderivaat en toepassing als anti-bacterieel middel

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een cholinecarbonzuurderivaat met fluor op de 6-plaats.

Uit de Franse octrooiaanvraag nr. 2.437.406 is een cholinecarbonzuurderivaat, met name 1-ethyl-1,4-dihydro-6-fluor-7-(1-piperaziny)-4-oxo-1,8-naftilidene-3-carbonzuur, bekend. Het bekende derivaat heeft een antibacteriële werking tegen zowel gram-negatieve als gram-positieve bacteriën.

Het cholinecarbonzuurderivaat volgens de uitvinding werkt onverwacht beter dan het bekende 6-fluorderivaat. Zo is de minimale inhibitorische concentratie (de zogenaamde MIC-waarde) van het derivaat volgens de uitvinding ten opzichte van Staphylococcus- en Streptococcussoorten veel lager dan die van het bekende derivaat, en is de werkzame dosis voor 50% van het maximale effect (de zogenaamde ED₅₀-waarde) ten opzichte van Staphylococcus aureus Smith lager dan die van het bekende derivaat.

Het cholinecarbonzuurderivaat volgens de onderhavige uitvinding is gekenmerkt doordat het derivaat een 6,8-difluorderivaat is en overeenkomt met Formule 1, vermeld op het formuleblad, en de zouten hiervan.

Uit Chemical Abstracts 93-22077 (1980) is als cholinecarbonzuurderivaat het in de onderhavige Tabel A vermelde 1-ethyl-6,8-difluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperaziny)chinoline-3-carbonzuur ("metaboliet") met een antibacteriële werking tegen zowel gram-negatieve als gram-positieve bacteriën bekend.

Uit U.S. Patent nr. 4.125.615 is de met de onderhavige verbinding overeenkomende pyrimidineverbinding bekend, welke verbinding eveneens werkt tegen gram-positieve en gram-negatieve bacteriën.

Antibacteriële stoffen zoals nalidixinezuur, pipemidinezuur en pipemidinezuur zijn zeer werkzaam gebleken bij de therapie van infecties door gram-negatieve bacteriën, maar dergelijke stoffen hebben het ernstige nadeel dat ze tegen de meeste gram-positieve bacteriën slechts geringe activiteiten vertonen. De verbinding volgens de onderhavige uitvinding is in het bijzonder geschikt doordat zij zowel tegen gram-positieve als gram-negatieve bacteriën potente antibacteriële activiteiten heeft. Bovendien is gebleken dat de verbinding met Formule 1 gedeeltelijk wordt gemetaboliseerd tot 1-ethyl-6,8-difluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperaziny)chinoline-3-carbonzuur, dat bij toediening aan dieren een goede activiteit heeft tegen gram-negatieve bacteriën.

De onderhavige uitvinding heeft tenslotte ook betrekking op een werkwijze voor het bereiden van een geneesmiddel met een antibacteriële werking, waarbij het onderhavige derivaat in een voor geneeskundige doeleinden geschikte toedieningsvorm wordt gebracht.

De gunstige werkingen van het derivaat volgens de uitvinding worden bevestigd door de resultaten van de hiernavolgende experimenten.

Experiment 1

Antibacteriële activiteit (in vitro).

De minimale inhibitorische concentratie (MIC) van de verbinding met Formule 1 werd bepaald onder toepassing van een agarverdundingstechniek (de standaardmethode van de Japan Society of Chemotherapy) ten opzichte van standaardstammen van gram-positieve en gram-negatieve bacteriën.

Zoals blijkt uit Tabel A, hadden nalidixinezuur en pipemidinezuur in hoofdzaak een antibacteriële activiteit ten opzichte van gram-negatieve bacteriën, en waren ze inactief ten opzichte van verschillende stammen van gram-positieve bacteriën.

Anderzijds is de verbinding, met formule 1 actiever dan nalidixinezuur en pipemidinezuur ten opzichte van zowel gram-positieve als gram-negatieve bacteriën. Met name is de antibacteriële activiteit van de verbinding met formule 1 sterker tegen gram-positieve bacteriën die Streptococcus spp. omvatten, die niet gevoelig waren voor nalidixinezuur en pipemidinezuur.

Experiment 2 – Antibacteriële activiteit (in vivo).

De in vivo antibacteriële activiteit van de verbinding met formule 1 werd bepaald door een systematische infectie bij muizen. De systematische infecties werden bij mannelijke ICR-muizen (lichaamsgewicht 19 ± 2 g) bewerkstelligd door intraperitoneale enting met Staphylococcus aureus Smith en E. coli ML4707.

De verbindingen werden oraal toegediend in verschillende doseringen op een tijdstip van 0 en 4 uren na de infectie. De therapeutische werking van de geneesmiddelen werd beoordeeld aan de hand van het aantal muizen dat na 7 dagen van observatie nog leefde. Een vergelijking van de in vivo antibacteriële activiteit werd gemaakt op basis van de gemiddelde effectieve dosering (ED₅₀), berekend volgens de methode van Lichtfield en Wilcoxon.

Zoals blijkt uit tabel B was de in vivo-antibacteriële activiteit van de verbinding met formule 1 significant effectiever dan die van nalidixinezuur en pipemidinezuur ten opzichte van Staphylococcus aureus Smith. De potentie van de verbinding met formule 1 was 172 keer sterker dan die van nalidixinezuur en 62 keer sterker dan die van pipemidinezuur.

Experiment 3 – Weefselgehalten van de verbinding met formule 1 na één enkelvoudige orale toediening van 50 mg/kg bij muizen en ratten.

Het weefselgehalte van de verbinding met formule 1 werd bepaald door een microbiologische bepaling waarbij een dunne laag-cup-methode werd toegepast onder gebruikmaking van Bacillus subtilis ATCC6633 als het te onderzoeken organisme.

Het gehalte van de verbinding met formule 1 in serum en in weefsels werd berekend met de standaard-curve respectievelijk afgeleid uit normaal serum van de te onderzoeken diersoort en M/15 fosfaatbuffer (pH 7,5). De hierbij verkregen resultaten zijn samengevat in tabel C.

Na de enkelvoudige orale toediening van 50 mg/kg van de verbinding met formule 1 aan muizen en ratten werd binnen 30-60 minuten een piek-serumgehalte gevonden van respectievelijk 8,6 en 5,3 µg/ml.

Het gehalte van de verbinding met formule 1 in de longen, lever en nieren was bij beide soorten hoger dan in serum.

De overdraagbaarheid van de verbinding met formule 1 in weefsels was zeer goed.

Experiment 4 – Acute toxiciteit van de verbinding met formule 1.

De acute toxiciteit van de verbinding met formule 1 werd onderzocht bij muizen (ICR-stam, 7 weken oud). De waarneming werd uitgevoerd over een periode van 7 dagen na één enkelvoudige orale en intraveneuze toediening. Zoals blijkt uit de gegevens van tabel D heeft de verbinding met formule 1 een lage toxiciteit.

In tabel A is de antibacteriële activiteit in vitro van onderzochte verbinding vermeld (enting: 10^8 cellen/ml).

In tabel B is de antibacteriële activiteit in vivo van de verbinding volgens de uitvinding vermeld.

In tabel C zijn de weefselgehalten van de verbinding volgens de uitvinding vermeld, en

in tabel D is de acute toxiciteit van de onderhavige verbinding in mannelijke muizen vermeld.

TABEL A

organisme	M I C (g/ml)				
	gram	verbinding volgens de uitvinding	Metabolië ¹	N A ²	PRA ³
<u>Bacillus subtilis</u> PCI 219	+	0,1	0,2	6,25	6,25
<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	+	0,1	0,78	100	25
<u>Staphylococcus aureus</u> IID670 (Terajima)	+	0,2	0,78	> 100	25
<u>Staphylococcus epidermidis</u> IID866	+	0,2	0,78		
<u>Streptococcus pyogenes</u> IID692	+	0,78	3,13	> 100	> 100
<u>Streptococcus pyogenes</u> S-8	+	0,78	12,5	> 100	> 100
<u>Streptococcus pneumoniae</u> IID552	+	0,39	6,25	> 100	> 100
<u>Streptococcus faecalis</u> IID682	+	0,78	3,13	> 100	> 100
<u>E. coli</u> NIHJ JC-2	-	0,20	0,05	3,13	1,56
<u>E. coli</u> ATCC 10536	-	0,39	0,05	3,13	1,56
<u>Haemophilus influenzae</u> IID986	-	0,20	0,025	1,56	3,13
<u>Klebsiella pneumoniae</u> IF03512	-	0,1	0,05	1,56	1,56
<u>Proteus vulgaris</u> IF03167	-	0,1	0,05	3,13	3,13
<u>Proteus mirabilis</u> IID994	-	1,56	0,05		
<u>Proteus morgani</u> IID602	-	1,56	0,1		
<u>Enterobacter cloacae</u> IID977	-	1,56	0,1		
<u>Citrobacter freundii</u> IID976	-	1,56	0,1		

TABEL A (vervolg)

5 organisme	gram	verbinding volgens de uitvinding	M I C (g/ml)		
			Metabo-liet ¹	N A ²	PRA ³
10 <u>Shigella sonnei</u> IID969	—	0,39	0,05	1,56	1,56
<u>Salmonella enteritidis</u> IID604	—	1,56	0,1	12,5	12,5
<u>Yersinia enterocolitica</u> IID981	—	1,56	0,1		
<u>Serratia marcescens</u> IID618	—	3,13	0,1		
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	—	12,5	0,78	100	12,5
15 V-1					
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> IF012689	—	25	1,56	> 100	25
<u>Acinetobacter enitratus</u> IID876	—	0,78	0,78		
20 <u>Acaligenes faecalis</u> 0104002	—	3,13	0,78		

1 1-ethyl 6,8-difluor 1,4-dihydro 4-oxo 7-(1-piperaziny)chinoline 3-carbonzuur.

2 nalidixezuur.

3 pipemidinezuur.

25

TABEL B

stam	dosering (cellen/dier)	verbinding	MIC (g/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
30 <u>Staphylococcus aureus</u>	2,4 x 10 ⁵ (in BHI ¹ met mucine)	onderhavige N A ^{*2}	0,05	3,7
			25	635
		PPA ^{*3}	12,5	231
35 <u>E. coli</u> ML 4707	1,2 x 10 ⁷ (in zoutoplossing)	onderhavige N.A. ^{*2}	0,39	13,8
			3,13	38,3
		PPA ^{*3}	1,56	38,9

Opmerkingen:

40 ¹ infusie in hersenen, hart.

² nalidixezuur.

³ pipemidinezuur.

TABEL C

45 dier	weefsel	concentratie (µg/ml)				
		tijd na toediening (uren)				
		0,5	1,0	2,0	4,0	6,0
50						
	muis	8,6	6,5	5,0	2,7	1,8
	long	12,8	9,5	5,5	4,3	2,8
	lever	22,5	17,5	12,0	9,0	5,8
55	rat	13,0	13,0	7,8	4,6	4,6
	serum	4,8	5,3	1,2	0,2	0,2

TABEL C (vervolg)

dier	weefsel	concentratie ($\mu\text{g/ml}$)				
		tijd na toediening (uren)				
		0,5	1,0	2,0	4,0	6,0
5						
10	long	6,0	8,6	2,1	0,6	ND ¹
	lever	14,0	15,4	6,2	2,2	0,8
	nier	6,6	6,8	2,7	1,0	0,3

Opmerking:¹ niet bepaald.

15 TABEL D

wijze van toediening	LD ₅₀ (mg/kg)
iv	250 – 300
20 po	> 4000

De verbindingen met formule 1 kunnen worden bereid door reductie van een verbinding met formule 2, vermeld op het formuleblad, waarbij R¹ waterstof of een lagere alkylgroep is, en indien nodig gevold door hydrolyse door het toepassen van een hiervoor gebruikelijke werkwijze. De reductie werd bewerkstelligd door katalytische hydrogenering onder toepassing van palladium op kool, Ranney-nikkel, platinaoxide of dergelijke als katalysator in een inert oplosmiddel, zoals alcoholen, ethers of organische zuren, of door de reactie met een metaal zoals ijzer, tin of zink of het hologenide of sulfaat in aanwezigheid van een zuur zoals bijvoorbeeld zoutzuur, zwavelzuur of azijnzuur.

Ook kunnen de verbindingen met formule 1 worden verkregen door aminering van de verbinding met formule 3, vermeld op het formuleblad, waarbij R¹ dezelfde betekenis heeft als boven aangegeven en X een groep is die wordt afgestoten zoals halogeen of een sulfonyloxigroep, met een piperazinederivaat met formule 4, vermeld op het formuleblad, waarbij R² en R³ waterstof of een beschermende groep zoals een acylgroep zijn, in een inert oplosmiddel zoals water, alcohol, ether, amine, nitrile, dimethylformamide of dimethylsulfoxide, bij voorkeur in aanwezigheid van een organische of anorganische base, bij een temperatuur gelegen tussen kamertemperatuur en 170°C, desgewenst gevolgd door hydrolyse met zuren of alkalische stoffen volgens een hierbij gebruikelijke methode.

De uitgangsstoffen met formule 2, werden verkregen door de reactie van een verbinding met formule 3 met N-(p-nitrobenzyl)piperazine of door een reactie van een verbinding met formule 5, waarbij R¹ dezelfde betekenis heeft als boven is aangegeven, met een verbinding met formule 6, waarbij X' halogeen is.

De zouten zoals methaansulfonaat, benzeensulfonaat, acetaat, maleaat, citraat, malaat, lactaat, hydrochloride, sulfaat, fosfaat, natruimzout, kaliumzout en aminezouten of dergelijke van de verbinding met formule 1 worden verkregen volgens een gebruikelijke wijze.

De verbindingen met formule 1 of de zouten hiervan worden aan de mens of aan dieren toegediend in een hoeveelheid die in het algemeen ligt tussen 1 en 100 mg/kg/dag via orale of parenterale weg. De verbinding met formule 1 of het zout hiervan kan worden gebruikt in de vorm van farmaceutische preparaten zoals tabletten, capsules, stroop, injecties, granules, poeder, zetpillen en emulsies. De farmaceutische preparaten kunnen de verbinding volgens de uitvinding bevatten samen met hulpstoffen en worden gevormd volgens op zich bekende werkwijzen.

De bereiding van de actieve stof zal nader worden toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden.

Voorbeeld

(a) Een mengsel van 6,7 g 1-ethyl-6,8-difluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperaziny)chinoline-3-carbonzuurhydrochloride, 5,45 g triethylamine, 5,8 g p-nitrobenzylbromide en 200 ml dimethylformamide, werd gedurende 10,5 uren geroerd bij een temperatuur van 90°C. Het oplosmiddel werd afgedampt en het residu gemengd met water. De vaste stof werd afgefiltreerd, gewassen met water, gedroogd en herkristalliseerd uit een mengsel van dimethylformamide en ethanol ter verkrijging van 6,9 g 1-ethyl-6,8-difluor-1,4-

dihydro-7-[4-(p-nitrobenzyl)-1-piperaziny]-4-oxochinoline-3-carbonzuur. Deze stof heeft een smeltpunt van 241-242°C.

De gegevens met betrekking tot de element-analyse voor de verbinding met formule $C_{23}H_{22}F_2N_4O_5$ zijn:

	C(%)	H(%)	N(%)
5 berekend:	58,47	4,69	11,86
gevonden:	58,50	4,59	11,95

- 10 (b) Een mengsel van 6,0 g 1-ethyl-6,8 difluor-1,4-dihydro-7-[4-(p-nitrobenzyl)-1-piperaziny]-4-oxochinoline-3-carbonzuur, 150 ml azijnzuur en 1,0 g 5% palladium op kool werd gehydrogeneerd. De slurry werd afgefilterd en het filtraat geconcentreerd tot droog. Het residu werd behandeld met water, geneutraliseerd met een oplossing van natriumhydroxide in water en geëxtraheerd met dichloormethaan. De organische laag werd gedroogd en ingedampt. Het residu werd chromatografisch gezuiverd over silicagel. Elueren met een mengsel van chloroform en ethanol (20:1) en herkristallisatie uit een mengsel van chloroform en ethanol
- 15 gaf 7-[4-(p-aminobenzyl)-1-piperaziny]-1-ethyl-6,8-difluor-1,4-dihydro-4-oxochinoline-3-carbonzuur. Het smeltpunt van deze stof was 220-221°C.

De gegevens met betrekking tot de elementanalyse voor de verbinding met formule $C_{23}H_{22}F_2N_4O_3$ zijn:

	C(%)	H(%)	N(%)
20 berekend:	62,43	5,47	12,66
gevonden:	62,53	5,36	12,68

Conclusies

- 25 1. Cholinecarbonzuurderivaat met fluor op de 6-plaats, met het kenmerk, dat het derivaat een 6,8-difluorderivaat is en overeenkomt met Formule 1, vermeld op het formuleblad, en de zouten hiervan.
2. Werkwijze voor het bereiden van een geneesmiddel met een antibacteriële werking, met het kenmerk, dat
- 30 hiertoe een derivaat volgens conclusie 1 in een voor geneeskundige doeleinden geschikte toedieningsvorm wordt gebracht.

Hierbij 1 blad tekening

FORMULEBLAD

