FI0001049678

(12) **PATENTTIJULKAISU**
**PATENTSKRIFT**

(10) **FI 104967 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **15.05.2000**

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

**C07D 211/60**, 401/12

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **934925**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **08.11.1993**

(24) Alkupäiva - Löpdag **11.05.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **08.11.1993**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/US92/03913**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

09.05.1991 US 697785 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS**
**PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN**

(73) Haltija - Innehavare

1 •**Vertex Pharmaceuticals Incorporated**, 40 Allston Street, Cambridge, MA 02139-4211, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •**Armistead,David M.**, 5 Cutting Drive, Maynard, MA 01754, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä uusien immunosuppressiivisten yhdisteiden valmistamiseksi**
**Förfarande för framställning av nya immunosuppressiva föreningar**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 85979 (C07D 498/18), FI C 90550 (C07D 498/18), FI C 87803 (C12P 17/18)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee uutta immunosuppressiivisten yhdisteiden ryhmää, jolla on affiniteettia FK-506:ta sitovaa proteiinia (FKBP) kohtaan. Sitouduttuaan kyseiseen proteiiniin immunosuppressiiviset yhdisteet inhiboivat FKBP:n prolyyli-peptidyyli-cis-trans-isomeraasiaktiivisuutta (rotamaasiaktiivisuutta) ja inhiboivat T-solujen aktivoitumista. Sellaisina tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää immunosuppressiivisina lääkkeinä siirteen hylkimisen estämiseksi tai vähentämiseksi merkittävästi luuydin- tai elinsiirroissa sekä monien erilaisten autoimmuunisairauksien hoidossa ihmisillä ja muilla nisäkkäillä.

Uppfinningen avser en ny grupp immunosuppressiva föreningar med affinitet gentemot det FK-506 bindande proteinet (FKBP). I och med att de bundits vid detta protein, hämmar de immunosuppressiva föreningarna propylpeptidyl-cis-trans-isomeras-(rotamas)-aktiviteten i FKBP:et och hämmar T-cell-aktivering. Föreningarna enligt uppfinningen kan användas som sådana som immunosuppressiva läkemedel för att förebygga eller märkbart reducera implantationsbortstötning i benmärgs och organtransplantationer och för behandlingen av en mångfald olika autoimmuna sjukdomar hos människor och andra däggdjur.

**Menetelmä uusien immunosuppressiivisten yhdisteiden valmistamiseksi**

**Keksinnön tausta**

Leikkausten jälkeiset siirteen hylkimiset ovat tärkein luuydin- ja elinsiirtojen onnistumiseen vaikuttava komplikaatio. Siirteen hylkimistä elinsiirrossa voidaan kuitenkin vähentää merkittävästi immunosuppressiivisen lääkehoidon käytöllä.

Monia erilaisia sairauksia voidaan luonnehtia "autoimmuunisairauksiksi". Sellaiset sairaudet ovat samanlaisia kuin siirteen hylkiminen, paitsi että hylkiminen kohdistuu omaan kudokseen. Immunosuppressiivisesta hoidosta voi olla hyötyä myös tämän epäasianmukaisen oman kudoksen hylkimisen estämisessä.

Yksi yleisesti hyväksytty immunosuppressiivinen aine siirteen hylkimisen estoon on syklosporiini A (CsA). Se on sienten metabolian luonnollinen tuote, ja sillä on osoitettu olevan voimakas immuunisuppressiivinen vaikutus kliinisissä elinsiirroissa. R. Y. Calne *et al.*, Br. Med. J. 282 (1981) 934 - 936; D. J. C. White, Drugs 24 (1982) 322 - 334. Vaikka CsA:ta käytetään laajasti immunosuppressiivisessa hoidossa, sen käyttöön (erityisesti suurina annoksina) liittyy usein sivuvaikutuksia, joihin kuuluvat nefrotoksisuus, hepatotoksisuus ja muut keskushermoston häiriöt.

Seuraavia sairauksia on hoidettu syklosporiini A:lla positiivisin tuloksin, mikä vahvistaa autoimmuunikomponentin tärkeyden näissä sairauksissa ja niiden tehokkaan hoidon yhdisteillä, jotka vaikuttavat samankaltaisen selektiivisen T-solujen immunosuppression kautta kuin syklosporiini A.

1) Oftalmologia: Silmän keskikalvon tulehdus, Behcetin tauti ja Graven silmäsairaus.

A. P. Weetman *et al.*, Lancet 1982, 486 - 489. Graven silmäsairaus.

R. B. Nussenblatt *et al.*, Lancet 1983, 235 - 238. Silmän keskikalvon tulehdus.

C. French-Constant *et al.*, Lancet 1983, 454. Behcetin tauti.

M. Sanders *et al.*, Lancet 1983, 454 - 455. Behcetin tauti.

Huomautus: Syklosporiini A hyväksytään nykyisin Japanissa Behcetin taudin hoitoon, mikä on ensimmäinen autoimmuunisairausindikaatio tälle yhdisteelle.

2) Dermatologia: Erilaiset autoimmuuni-ihosairaudet, mukaan luettuna psoriasis.

P. Zabel *et al.*, Lancet 1984, 343. Akuutti dermatomyosiitti.

T. van Joost *et al.*, Arch. Dermatol. 123 (1987) 166 - 167. Atooppinen ihosairaus.

T. Appleboom *et al.*, Amer. J. Med. 82 (1987) 866 - 867. Skleroderma.

R. A. Logan ja R. D. R. Camo, J. Roy. Soc. Med. 81 (1988) 417 - 418. Ekseema.

C. E. M. Griffiths *et al.*, Brit. Med. J. 293 (1986) 731 - 732. Psoriasis.

C. N. Ellis *et al.*, J. Amer. Med. Assoc. 256 (1986) 3110 - 3116. Psoriasis.

3) Hematologia: Erilaiset sairaudet, mukaan luettuna anemia.

T. H. Toetterman *et al.*, Lancet 1984, 693. Puhdas punasoluaplasia.

P. A. Stryckmans *et al.*, New Engl. J. Med. 310 (1984) 655 - 656. Aplastinen anemia.

E. Gluckman *et al.*, Bone Marrow Transplant 3 (1988), Suppl. 1, 241. Aplastinen anemia.

4) Gastroenterologia/hepatologia: Primaarinen kirroosi, autoimmuunihepatiitti, haavaumia muodostava paksu-

suolentulehdus, regionaalinen enteriitti (Crohnin tauti) ja muut gastrointestinaaliset autoimmuunisairaudet.

R. H. Wiesner *et al.*, Hepatology 7 (1987) 1025, Abstract #9. Primaarinen sappikirroosi.

J. S. Hyams *et al.*, Gastroenterology 93 (1987) 890 - 893. Autoimmuunihepatiitti.

M. C. Allison *et al.*, Lancet 1984, 902 - 903. Regionaalinen enteriitti.

J. Brynskov *et al.*, Gastroenterology 92 (1987) 1330. Regionaalinen enteriitti.

G. B. Porro *et al.*, Ital. J. Gastroenterol. 19 (1987) 40 - 41. Haavaumia muodostava paksusuolentulehdus.

5) Neurologia: Liikeratakovettumatauti (ALS, "Lou Gehrigin tauti"), *myasthenia gravis* ja multippeliskleroosi.

S. H. Appel *et al.*, Arch. Neurol. 45 (1988) 381 - 386. ALS.

R. S. A. Tindall *et al.*, New Engl. J. Med. 316 (1987) 719 - 724. *Myasthenia gravis*. Ann. Neurol. 24 (1988), nro 1, 169, m Abstract P174. Multippeliskleroosi.

D. Dommasch *et al.*, Neurology 38 (1988), Suppl. 2, 28 - 29. Multippeliskleroosi.

6) Nefroottinen oireyhtymä: Nefroottinen oireyhtymä, membranoproliferatiivinen munuaiskerästulehdus (MPGN) ja niiden sukulaissairaudet.

A. R. Watzon *et al.* Clin. Nephrol. 25 (1986) 273 - 274. Nefroottinen oireyhtymä.

A. Tejani *et al.*, Kidney Int. 33 (1988) 729 - 734. Nefroottinen oireyhtymä.

A. Meyrier *et al.*, Transplant Proc. 20 (1988), Suppl. 4 (osa III), 259 - 261. Nefroottinen oireyhtymä.

G. LaGrue *et al.*, Nephron. 44 (1986) 382 - 382. MPGN.

7) Nivelreuma (RA).

J. I. Harper *et al.*, Lancet 1984, 981 - 982. RA.

A. W. van Rijthoven *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 45 (1986) 726 - 731. RA.

M. Dougados *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 47 (1988) 127 - 133. RA.

8) Insuliinista riippuvainen sokeritauti (IDDM).

C. R. Stiller *et al.*, Science 223 (1984) 1362 - 1367. IDDM.

R. Assan *et al.*, Lancet 1985, 67 - 71. IDDM.

P. F. Bougneres *et al.*, New Engl. J. Med. Chem. 318 (1988) 663 - 670. IDDM.

Diabetes 37 (1988) 1574 - 1582. IDDM.

Myös monia eläinten sairauksia luonnehditaan autoimmuunisairauksiksi. Autoimmuunisairauksia, kuten esimerkiksi edellä lueteltuja, on havaittu nisäkkäillä. F. O. Papa *et al.*, Equine Vet. J. 22 (1990) 145 - 146 (autoimmunisaatioperäinen hedelmättömyys oriilla); N. T. Gorman ja L. L. Werner, Brit. J. Vet. 403 - 410, 491 - 497 ja 498 - 505 (immuunijärjestelmävälitteiset taudit kissoilla ja koirilla); L. W. George ja S. L. White, Vet. Clin. North Amer. 6 (1984) 203 - 213 (ihon autoimmuunisairaudet suurilla nisäkkäillä); D. Bennett, In. Pract. 6 (1984) 74 - 86 (autoimuunisairaudet koirilla); R. E. Halliwell, J. Mer. Vet. Assoc. 181 (1982) 1088 - 1096 (autoimuunisairaudet kotieläimillä).

Mekanismi, jolla CsA aiheuttaa immunosuppression, on vahvistettu. CsA inhiboi *in vitro* lymfokiinien, kuten esimerkiksi interleukiini 2:n (IL-2), vapautumista [D. Bunjes *et al.*, Eur. J. Immunol. 11 (1981) 657 - 661] ja estää auttaja- ja sytotoksisten T-solujen kloonilaajenemisen [E. Larsson, J. Immunol. 124 (1980) 2828 - 2833]. CsA:n on osoitettu sitoutuvan sytosoliproteiiniin, syklofiliiniin, ja inhiboi kyseisen proteiinin prolyyli-peptidyyli-cis-trans-isomeraasiaktiivisuutta (PPIaasiaktiivisuutta). G. Fischer *et al.*, Nature 337 (1989) 476 - 478; N. Takahashi *et al.*, Nature 337 (1989) 473 - 475. PPIaasit

voivat toimia välittäjinä T-solujen aktivoinnissa katalysoimalla prolyyliryhmien peptidisidosten rotomerisaatiota.

Erään toisen luonnon tuotteen, joka on eristetty *Streptomyces*-suvusta ja jota kutsutaan FK-506:ksi, on hiljattain osoitettu olevan voimakas immunosuppressiivinen aine. H. Tanaka *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 109 (1987) 5031 - 5033. FK-506 inhiboi IL-2:n tuotantoa, inhiboi lymfosyyttisekaviljelmän vastetta ja inhiboi sytotoksisten T-solujen kehittymistä *in vitro* 100 kertaa pienempänä pitoisuutena kuin syklosporiini A. T. Kino *et al.*, J. Antibiot. 15 (1987) 1256 - 1265. FK-506 inhiboi myös PPIaasiaktiivisuutta, mutta on rakenteeltaan erilainen kuin CsA ja sitoutuu sitovaan proteiiniin (FKBP), joka on erilainen kuin syklofiliini. M. W. Harding *et al.*, Nature 341 (1989) 758 - 760; J. J. Siekierka, Nature 341 (1989) 755 - 758.

Suomalaisesta patenttijulkaisusta 90 550 tunnetaan menetelmä terapeuttisesti aktiviisen makrosyklisen johdannaisen valmistamiseksi ja suomalaisista patenttijulkaisuista 87 703 ja 85 977 menetelmä farmaseuttisesti arvokkaiden trisyklisten yhdisteiden valmistamiseksi. Esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet eroavat rakenteeltaan mainituista suomalaisista patenteista tunnetuista yhdisteistä.

**Yhteenveto keksinnöstä**

Tämä keksintö koskee menetelmää uusien immunosuppressiivisten yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on affiniteettia FK-506:ta sitovaa proteiinia (FKBP) kohtaan. Sitouduttuaan kyseiseen proteiiniin immunosuppressiiviset yhdisteet inhiboivat FKBP:n prolyyli-peptidyyli-cis-trans-isomeraasiaktiivisuutta (rotamaasiaktiivisuutta) ja johtavat T-solujen aktivoitumisen inhibitioon. Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavia yhdisteitä voidaan käyttää immunosuppressiivisina lääkkeinä siirteen hylkimisen estämiseksi tai vähentämiseksi merkittävästi luuydin- tai elin-

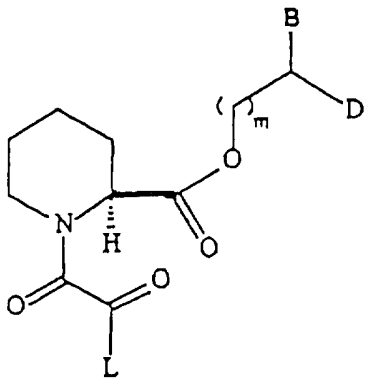
siirroissa sekä autoimmuunisairauksien hoidossa ihmisillä ja muilla nisäkkäillä.

**Lyhyt kuvaus piirroksista**

Kuviot 1A - 1I valaisevat eräitä edullisia kaavan I mukaisia yhdisteitä. Kunkin edullisen yhdisteen valmistusta kuvataan yksityiskohtaisesti esimerkkiosassa.

**Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus**

Tämä keksintö koskee menetelmää immunosuppressiivisten yhdisteiden ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, joita yhdisteitä kuvaa kaava I,




(I)

jossa

B on Ar, $C_{5-7}$-sykloalkyylisubstituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{1-6}$-alkyyliryhmä, $C_{5-7}$-sykloalkyylisubstituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{2-6}$-alkenyyliryhmä, $C_{5-7}$-sykloalkenyylisubstituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{1-6}$-alkyyliryhmä, $C_{5-7}$-sykloalkenyylisubstituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{2-6}$-alkenyyliryhmä, Ar-substituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{1-6}$-alkyyliryhmä tai Ar-substituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{2-6}$-alkenyyliryhmä, jolloin

Ar on fenyyli, 2-tienyyli, 3-tienyyli, 2-pyridyyli, 3-pyridyyli, 4-pyridyyli, N-purinyyli, 3-pyridyyli-N-oksidi, bentsimidatsolyyli tai 7-atsaindolyyli, ja Ar voi sisältää 1 - 3 substituenttia, joka on itsenäisesti halogeeni, hydroksimetyyli, hydroksyyli, nitro, suoraketjuinen

tai haarautunut O-$C_{1-4}$-alkyyli, suoraketjuinen tai haarautunut O-$C_{2-4}$-alkenyyli, O-bentsyyli, O-fenyyli, amino, karboksyyli tai fenyyli;

D on fenyylisubstituoitu $C_{1-6}$-alkyyli, fenoksisubstituoitu fenyyli tai metoksifenyyli;

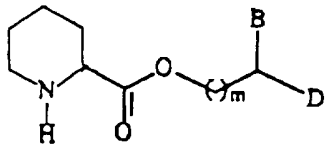
L on suoraketjuinen tai haarautunut $C_{1-6}$-alkyyli, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{2-6}$-alkenyyli, $C_{5-7}$-sykloalkyyli, O-bentsyyli tai fenyyli, joka on mahdollisesti substituoitu suoraketjuisella tai haarautuneella O-$C_{1-6}$-alkyylillä tai suoraketjuisella tai haarautuneella O-$C_{2-6}$-alkenyylillä, ja

m on 0 tai 1;

jolloin stereokemia asemissa 1 ja 2 on toisistaan riippumattomasti R tai S.

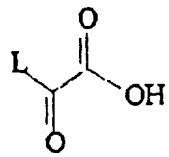
Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että

(a) vapaa aminoryhmä aminoesterissä, jolla on kaava



(XIII)

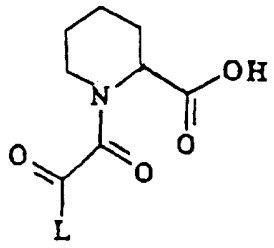
jossa B, D ja n ovat edellä määriteltyjä, asyloidaan yhdisteellä, jolla on kaava



(XIV)

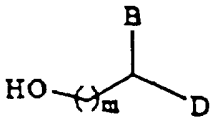
jossa L on edellä määritelty, tai sen aktivoidulla johdannaisella, tai

(b) karboksyylihappo, jolla on kaava



(A)

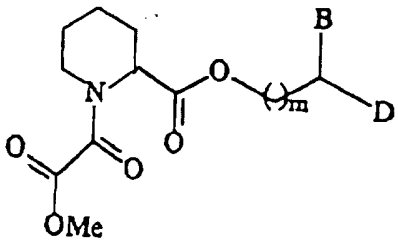
jossa L on edellä määritelty, saatetaan reagoimaan alkoholin kanssa, jolla on kaava



(B)

jossa B, D ja m ovat edellä määriteltyjä, tai

(c) pipekolaattijohdannainen, jolla on kaava



(C)

jossa B, D ja m ovat edellä määriteltyjä, saatetaan reagoimaan litiumsuolan kanssa, jolla on kaava

$L^-Li^+$

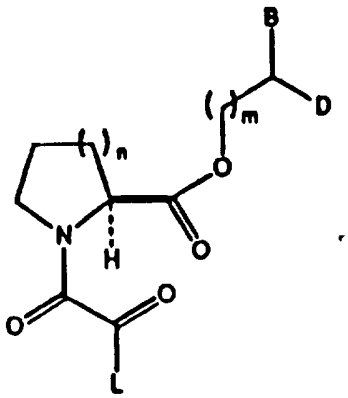
jossa L on edellä määritelty,

minkä jälkeen haluttaessa muutetaan saatu yhdiste farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolakseen.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettuja yhdisteitä voidaan käyttää epäorgaanisista tai orgaanisista hapoista ja emäksistä saatavien suolojen muodossa. Sellaisiin happosuoloihin kuuluvat seuraavat: asetaatti, adipaatti, alginaatti, aspartaatti, bentsoaatti, bentseenisulfonaatti, vetysulfaatti, butyraatti, sitraatti, kamferaatti, kamferisulfonaatti, syklopentaanipropionaatti, diglukonaatti, dodekyylisulfaatti, etaanisulfonaatti, fumaraatti, glukoheptanoaatti, glyserofosfaatti, hemisulfaatti, heptanoaatti, heksanoaatti, hydrokloridi, hydrobromidi, hydrojodidi, 2-hydroksietaanisulfonaatti, laktaatti, maleaatti, oksalaatti, pamoaatti, pektinaatti, persulfaatti, 3-fenyylipropionaatti, pikraatti, pivalaatti, propionaatti, sukkinaatti, tartraatti, tiosyanaatti, tosylaatti ja undekanoaatti. Emässuoloihin kuuluvat ammoniumsuolat, alkalimetallisuolat, kuten esimerkiksi natrium- ja kaliumsuolat, maa-alkalimetallisuolat, kuten esimerkiksi kalsium- ja magnesiumsuolat, suolat orgaanisten emästen kanssa, kuten esimerkiksi disykloheksyyliamiini- ja N-metyyli-D-glukamiinisuolat, sekä suolat aminohappojen kanssa, kuten esimerkiksi arginiinin, lysiinin jne. kanssa. Emäksiset typpeä sisältävät ryhmät voidaan myös kvaternisoida sellaisilla aineilla kuin alemmat alkyylihalogenidit, kuten esimerkiksi metyyli-, etyyli-, propyyli- ja butyylikloridi, -bromidi ja -jodidi; dialkyylisulfaatit, kuten esimerkiksi dimetyyli-, dietyyli-, dibutyyli- ja dipentyylisulfaatti; pitkäketjuiset halogenidit, kuten esimerkiksi dekyyli-, lauryyli-, myristyyli- ja stearyylikloridi, -bromidi ja jodidi; aryylialkyylihalogenidit, kuten esimerkiksi bentsyyli- ja fenyylietyylibromidi, jne. Siten saadaan aikaan veteen tai öljyyn liukenevia tai dispergoituvia tuotteita.

Yhdisteiden moolimassa on edullisesti pienempi kuin noin 750 atomimassayksikköä (u) ja edullisimmin pienempi kuin noin 500 u. Esimerkkejä yhdisteistä on esitetty taulukossa 1 ja kuviossa 1.

**Taulukko 1: Yhdisteet**




| Nro | n | m | B | D | L |
|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 2 | 0 | 3-fenyyli-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 4 | 2 | 0 | 3-fenoksifenyyli propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 5 | 2 | 0 | Fenyyli | 2-fenoksi-fenyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 6 | 2 | 0 | Fenyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 7 | 2 | 0 | 2-(3-pyridyyli)-etyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 8 | 2 | 0 | E-3-[trans-(4-hydroksisyklo-heksyyli)]-2-metyyliprop-2-enyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 9 | 2 | 0 | 3-(3-pyridyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 10 | 2 | 0 | Bentsyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 11 | 2 | 0 | Bentsyyli | 3-(3-indo-lyyli)pro-pyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 12 | 2 | 0 | 2-fenyylietyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 13 | 2 | 0 | 2-(4-metoksi-fenyyli)etyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 14 | 2 | 0 | 2-(4-metoksi-fenyyli)etyyli | 3-fenyyli-propyyli | Fenyyli |
| 15 | 2 | 0 | 3-(N-bentsimidatsolyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 16 | 2 | 1 | Bentsyyli | 2-fenyyli-etyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 17 | 2 | 0 | 3-(4-metoksi-fenyyli)propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 18 | 2 | 0 | 3-(3-pyridyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | Fenyyli |
| 19 | 2 | 0 | 3-(2-pyridyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | Fenyyli |
| 20 | 2 | 0 | 3-(2-pyridyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 21 | 2 | 0 | 3-(2-pyridyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | t-butyyli |
| 22 | 2 | 0 | 3-(2-pyridyyli)-N-oksidi | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 23 | 2 | 0 | 3-[N-(7-atsaindolyyli)propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 24 | 2 | 0 | 3-(3-pyridyyli)-propyyli | 3-(4-metoksifenyyli)-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 25 | 2 | 0 | 3-(N-purinyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 26 | 2 | 0 | 3-(4-hydroksimetyylifenyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| 27 | 2 | 0 | 3-(3-pyridyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3-bentsyylioksi-fenyyli |
| 28 | 2 | 0 | 3-(3-pyridyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3-allyylioksi-fenyyli |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 29 | 2 | 0 | 3-(3-pyridyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3-isopropoksi-fenyyli |
| | 30 | 2 | 0 | 3-(2-tienyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 31 | 2 | 0 | 3-(4-karboksifenyyli)propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 32 | 2 | 0 | 4-fenyylibutyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 33 | 2 | 0 | 2-hydroksimetyylifenyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 34 | 2 | 0 | 2-allyylioksifenyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 35 | 2 | 0 | 3-(3-hydroksimetyylifenyyli)-propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 36 | 2 | 0 | 3-(3-karboksifenyyli)propyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 37 | 2 | 0 | 3-hydroksimetyylifenyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 38 | 2 | 0 | 2-hydroksifenyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 39 | 2 | 0 | 3-pyridyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 40 | 2 | 0 | 3-(2-tienyyli)-propyyli | 4-fenyyli-butyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |
| | 41 | 2 | 0 | 5-fenyylipentyyli | 3-fenyyli-propyyli | 3,4,5-trimetoksi-fenyyli |

Taulukko 2: Testitulokset

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 1,0 | 20 | >8 | 2,25 | 10 | 8,5 | 8,0 |
| 4 | 220 | ND | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 |
| 5 | 4000 | ND | >10 | >10 | >10 | >10 | 8,0 |
| 6 | 80 | 40 | 8,0 | 8,0 | 10 | 9,0 | 5,0 |
| 7 | 3,0 | 29 | 2,0 | 2,0 | 5,0 | 5,0 | 2,0 |
| 8 | 27 | 30 | 4,0 | 5,0 | 10 | 10 | 4,0 |
| 9 | 1,0 | 4,0 | 1,8 | 1,2 | 6,0 | 6,0 | 2,5 |
| 10 | 32 | ND | 5,5 | 4,0 | 5,5 | 8,0 | 6,0 |
| 11 | 24 | ND | 2,7 | 2,0 | 3,5 | 6,5 | 10 |
| 12 | 83 | ND | 7,0 | 5,0 | 10 | 10 | 8,1 |
| 13 | 4,0 | 27 | 8,0 | 10 | >10 | >10 | 9,0 |
| 14 | 270 | ND | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 |
| 15 | ND | ND | 3,0 | 3,0 | 6,0 | 8,0 | 5,0 |
| 16 | 57 | ND | 5,0 | 7,0 | 9,0 | >10 | 6,0 |
| 17 | 3,0 | 68 | 4,5 | 2,5 | 5,5 | 7,0 | >10 |
| 18 | 56 | ND | 5,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 7,0 |
| 19 | 50 | ND | 6,0 | 8,0 | 10 | 10 | 5,0 |
| 20 | 1,0 | 4,0 | 1,7 | 2,0 | 2,0 | 2,5 | 2,0 |
| 21 | 36 | ND | 7,0 | 3,0 | 6,0 | 7,0 | 4,0 |
| 22 | ND | ND | 1,5 | 1,6 | 2,2 | 2,5 | 2,3 |
| 23 | ND | ND | 5,0 | 7,0 | 7,0 | 6,0 | 3,5 |
| 24 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

**Taulukko 2 (jatkoa)**

| Nro | $K_i$ (nmol/l) | $K_d$ (nmol/l) | PMA (µmol/l) | OKT3 (µmol/l) | LB (µmol/l) | JVM (µmol/l) | CTLL (µmol/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 25 | 9,0 | ND | ND | 2,0 | 2,5 | 2,0 | 3,0 |
| 26 | 4,0 | 19 | 3,0 | 1,0 | 3,0 | 2,5 | 4,0 |
| 27 | 15 | ND | 6,0 | 4,0 | 10 | 6,0 | 5,0 |
| 28 | 11 | ND | 5,0 | 6,0 | 8,0 | 9,0 | 3,0 |
| 29 | 2,0 | 3,0 | 10 | 8,0 | >10 | >10 | 4,0 |
| 30 | 4,0 | 90 | 5,0 | 2,5 | 8,0 | 6,0 | 7,0 |
| 31 | 2,0 | 8,0 | 5,0 | 7,0 | 6,0 | 6,0 | 7,0 |
| 32 | 20 | ND | 9,0 | 8,0 | >10 | >10 | 7,5 |
| 33 | 89 | ND | 5,0 | 5,0 | 2,0 | 4,5 | 3,0 |
| 34 | >150 | ND | 3,0 | 9,0 | 4,0 | 3,0 | 10 |
| 35 | 1,0 | 40 | 2,7 | 6,5 | 2,5 | 3,0 | 2,5 |
| 36 | 4,0 | 20 | >10 | >10 | >10 | 9,0 | >10 |
| 37 | 7,0 | 140 | 2,0 | 5,0 | 1,2 | 2,2 | 1,2 |
| 38 | ND | ND | >10 | 5,0 | >10 | >10 | >10 |
| 39 | 10 | ND | 6,0 | 5,5 | ND | 5,0 | 2,5 |
| 40 | 1100 | ND | >10 | >10 | >10 | >10 | 10 |
| 41 | 45 | ND | 7,0 | >10 | >10 | 10 | >10 |

Kaikilla taulukossa 2 esitetyillä yhdisteillä ilmeni toksisuutta suuremmilla pitoisuuksilla niiden immunosuppressiivinen aktiivisuus, ja ne olivat tyypillisesti suurempia pitoisuuksia kuin 10 µmol/l.

$K_i$ - FKBP:n rotamaasiaktiivisuus

$K_d$ - sitoutuminen FKBP:hen

PMA ja OKT3 - mitogeeneja, joita käytetään ihmisen ääreisveren lymfosyyttien (PBC) proliferaation stimulointiin. Yhdisteet arvostellaan sen perusteella, miten ne kykenevät estämään proliferaatiota.

LB ja JVM - viruksella transformoituja ihmisen B-lymfoblastoidisolulinjoja, jotka stimuloidaan proliferoimaan sekalymfosyyttireaktiossa. Yhdisteet arvostellaan sen perusteella, miten ne kykenevät estämään tätä proliferaatiota.

CTLL - IL-2:lla stimuloidun sytotoksisten T-solujen proliferaation inhibitio

ND - ei määritetty.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavilla immunosuppressiivisilla yhdisteillä on affiniteettia FK-506:ta sitovaa proteiinia kohtaan, jota on lymfosyyttien, erityisesti T-lymfosyyttien, sytosolissa. Sitouduttuaan FKBP:hen immunosuppressiiviset yhdisteet inhiboivat sitovan proteiinin prolyyli-peptidyyli-cis-trans-isomeraasiaktiivisuutta ja inhiboivat lymfosyyttien FKBP-välitteistä aktivoitumista. Yhden nimenomaisen FK-506:ta sitovan proteiinin ovat identifioineet M. W. Harding *et al.*, Nature 341 (1989) 758 - 760, ja sitä voidaan käyttää standardina, jonka avulla arvioidaan yhdisteiden sitoutumisaffiniteettia FKBP:tä kohtaan. Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavilla yhdisteillä voi kuitenkin olla affiniteettia muitakin FK-506:ta sitovia proteiineja kohtaan. Prolyyli-peptidyyli-cis-trans-isomeraasin inhibitio voi lisäksi olla osoitus sitoutumisesta FK-506:ta sitovaan proteiiniin.

Ihmisen FK-506:ta sitova proteiini voidaan saada aikaan M. W. Hardingin *et al.*, Nature 341 (1989) 758 - 760, kuvaamalla tavalla. Arvot näennäiselle $K_d$:lle voidaan määrittää Hardingin *et al.* kuvaamalla tavalla toteutettavalla kompetitiivisella LH-20-sitoutumistestillä käyttäen

ilmaisevana ligandina 32-[1-$^{14}$C]-bentsoyyli-FK-506:ta tai käyttämällä [$^{3}$H]dihydro-FK-506:ta, kuten J. J. Siekierka *et al.*, Nature 341 (1989) 755 - 757, ovat esittäneet. Taulukossa 2 on ilmoitettu sitoutumisaffinitteetit FKBP:tä kohtaan useille tämän keksinnön mukaisesti valmistettaville yhdisteille. Tiedot saatiin jälkimmäistä menetelmää käyttäen, jossa mitattiin leimaamattoman yhdisteen kyky kilpailla [$^{3}$H]dihydro-FK-506:n kanssa sitoutumisesta FK-506:ta sitovaan proteiiniin.

FKBP:n PPIaasientsyymiaktiivisuuden (rotamaasiaktiivisuuden) inhibitiota (näennäiset "$K_i$"-arvot) voidaan mitata myös joko M. W. Hardingin *et al.*, Nature 341 (1989) 758 - 760, tai J. J. Siekierkan *et al.*, Nature 341 (1989) 755 - 757, esittämän menetelmän mukaisesti. Proliini-alaniinipeptidisidoksen cis-trans-isomeroitumista mallisubstraatissa, N-sukkinyyli-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidissa, seurataan spektrofotometrisesti testillä, johon on liitetty mukaan kymotrypsiini, joka vapauttaa 4-nitroanilidin substraatin trans-muodosta. G. Fischer *et al.*, Nature 337 (1989) 476 - 478. Määritetään erilaisten inhibiittoripitoisuuksien lisäyksen inhiboiva vaikutus reaktioasteeseen, ja ensimmäisen kertaluvun nopeusvakiossa inhibiittorin pitoisuuden funktiona tapahtuvan muutoksen analysointi antaa arvion näennäisestä $K_i$-arvosta. Eräiden edullisten yhdisteiden aikaansaaman entsyymi-inhibition suuruus ($K_i$) on esitetty taulukossa 2.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavia yhdisteitä voidaan karakterisoida edelleen solubiologisilla kokeilla *in vitro*, joissa niiden toiminnallinen ja käyttöön liittyvä samankaltaisuus syklosporiini A:n ja FK-506:n kanssa on ilmeinen. (Tutustukaa taulukkoon 3)

Taulukko 3

| Testit ja lääkeaineiden $IC_{50\text{-}arvo}$t | Syklosporiini A | Rapamysiini | FK-506 |
|---|---|---|---|
| 1) Ihminen PBL + OKT3 | <1 µg/ml | <1 µg/ml | <1 µg/ml |
| 2) T-soluhybridoma + TCR/CD2 | <1 µg/ml | <1 µg/ml | <1 µg/ml |
| 3) Apoptoosi | Salpaa pitoisuutena 1 µg/ml | Tehoton pitoisuutena 1 µg/ml | Salpaa pitoisuutena 1 µg/ml |
| 4) CTLL-solujen proliferaatio + IL-2 | >>1 µg/ml | ≈0,01 µg/ml | >>1 µg/ml |

1) Samanlainen testi kuin N. Yoshimuran *et al.*, Transplantation 47 (1989) 356 - 359, esittämä. Testissä käytetään tuoreita ihmisen ääreisveren lymfosyyttejä, jotka eristetään Ficoll-Hypaque-tiheyssentrifugoinnilla ja joita stimuloidaan OKT3-vasta-aineella (anti-CD3), joka stimuloi CD3:n kanssa tapahtuvan vuorovaikutuksen kautta. Stimulaatiota mitataan sisällyttämällä proliferoiviin soluihin radioaktiivista tymidiiniä ($^3$H-TdR) inhiboimattoman vertailusignaalin ollessa 48 000 - 75 000 $min^{-1}$. $IC_{50}$-arvot arvioidaan erilaisilla lääkeainepitoisuuksilla havaitun proliferaation inhibition perustella.

2) Samanlainen testi kuin edellä, mutta käytetään T-solukloonia, jota stimuloidaan T-solureseptorin (TCR) vasta-aineella ja CD2:n vasta-aineella. Stimulaatiota mitataan sisällyttämällä proliferoiviin soluihin radioaktiivista tymidiiniä ($^3$H-TdR) inhiboimattoman vertailusignaalin ollessa 23 000 $min^{-1}$. $IC_{50}$-arvot arvioidaan erilaisilla lääkeainepitoisuuksilla havaitun proliferaation inhibition perusteella.

3) Artikkelin Y. Shi *et al.*, Nature 339 (1989) 625 - 626 mukainen testi. Testissä käytetään kuvatun kaltaista T-soluhybridomaa. Testi mittaa aktivoimalla indusoitua (anti-CD3) solukuolemaa (joka arvioidaan laskemalla elävät solut kuvatun kaltaisen värjäyksen jälkeen) T-soluhybridomassa, mikä jäljittelee epäkypsissä tymosyyteissa ilmenevää vaikutusta. Syklosporiini A:n ja FK-506:n kyky inhiboida tätä solukuolemaa on tässä käytettynä sellaisten yhdisteiden herkkä osoitin, joilla on syklosporiini A:n kaltainen ja/tai FK-506:n kaltainen vaikutusmekanismi. Huomatkaa, että kemiallisesti sukua oleva, mutta mekanismiltaan erilainen immunosuppressiivinen aine rapamysiini on tässä testissä tehoton.

4) Artikkelin F. DuMont *et al.*, J. Immunol. 144 (1990) 251 - 258 mukainen testi. Testi mittaa CTLL-solujen stimulaatiota reaktiona IL-2:een. Proliferaatiota mitataan sisällyttämällä mukaan $^{3}$H-TdR:ää. Immunosuppressiiviset aineet, jotka toimivat samanlaisella mekanismilla kuin syklosporiini A ja FK-506, eivät aiheuta inhibitiota tässä IL-2-käyttöisessä prosessissa, koska ne vaikuttavat inhiboimalla endogeenisen IL-2:n tuotantoa. Tässä testissä tarjotaan eksogeenista IL-2:ta tämän esteen voittamiseksi. Huomatkaa, että kemiallisesti sukua oleva, mutta mekanismiltaan erilainen immunosuppressiivinen aine rapamysiini on aktiivinen tässä testissä.

Edellä mainittuja sekä esimerkkiosassa esitettyjä testejä voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisesti valmistettavien yhdisteiden vaikutuksen soluihin havainnollistamiseen. Näiden tulosten perusteella on siis selvää, että nämä yhdisteet muistuttavat sekä syklosporiini A:ta että FK-506:ta soluihin kohdistuvan vaikutuksensa osalta, immunosuppressio mukaan luettuna, päinvastoin kuin mekanismiltaan erilainen immunosuppressiivinen aine rapamysiini. Lisäksi havaittu soluvaikutus on suuruudeltaan vastaava kuin havaittu aktiivisuus, mitä tulee sitoutumiseen FKBP:hen ja PPIaasiaktiivisuuden (rotamaasiaktiivisuuden)

inhibitioon, joka aktiivisuus on esitetty taulukossa 2. Yhdisteitä voidaan siten käyttää immunosuppressiivisina aineina elimen hylkimisen ennalta ehkäisemiseksi tai siirteen kroonisen hylkimisen hoitamiseksi sekä autoimmuunisairauksien hoitamiseksi.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavia immunosuppressiivisia yhdisteitä voidaan antaa määräajoin potilaalle, jolle tehdään luuydin- tai elinsiirto, tai muusta syystä, jonka vuoksi on toivottavaa pienentää potilaan immuunivastetta olennaisesti tai estää se, kuten esimerkiksi erilaisissa autoimmuunisairauksissa. Yhdisteitä voidaan antaa myös muille nisäkkäille kuin ihmisille nisäkkäiden erilaisten autoimmuunisairauksien hoitamiseksi.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavilla uusilla yhdisteillä on erinomainen vaikutusaste antigeenin stimuloiman T-solujen kasvun ja kloonilaajenemisen leviämisen estämisessä, erityisesti sellaisten T-solujen, joita luonnehditaan "auttaja"-T-soluiksi. Tätä vaikutusta voidaan käyttää hyväksi elinsiirteiden hylkimisen primaarisessa estossa, siirrettyjen elinten pelastamisessa hylkimisvaiheen aikana ja minkä tahansa niistä monista autoimmuunisairauksista hoidossa, joiden tiedetään liittyvän epäasianmukaisiin autoimmuunivasteisiin. Kyseisiin autoimmuunisairauksiin kuuluvat silmän keskikalvon tulehdus, Behcetin tauti, Graven silmäsairaus, psoriasis, akuutti dermatomyosiitti, atooppinen ihosairaus, slkeroderma, ekseema, puhdas punasoluaplasia, aplastinen anemia, primaarinen kirroosi, autoimmuunihepatiitti, haavaumia muodostava paksusuolentulehdus, regionaalinen enteriitti, liikeratakovettumatauti, *myasthenia gravis*, multippeliskleroosi, nefroottinen oireyhtymä, membranoproliferatiivinen munuaiskerästulehdus, nivelreuma ja insuliinista riippuvainen sokeritauti. Kaikissa edellä luetelluissa autoimmuunisairauksissa hoito vähentää tehokkaasti taudin oireita ja hidastaa tehokkaasti taudin etenemistä. Insuliinista

riippuvaisen sokeritaudin tapauksessa edellä kuvattu hoito on tehokkainta, kun se käynnistetään ennen insuliinin luonnollisen tuotannon täydellistä lakkaamista ja siirtymistä täydelliseen riippuvuuteen ulkopuolisesta insuliinista.

Keksinnön mukaisesti valmistettavia yhdisteitä voidaan antaa näihin tarkoituksiin suun kautta, parenteraalisesti, inhalaatiosuihkeena, paikallisesti, peräsuolen kautta, nenän kautta, bukkaalisesti, emättimen kautta tai implantoitavan säiliön kautta annostusformuloina, jotka sisältävät tavanomaisia, myrkyttömiä, farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantaja-aineita, apuaineita ja väliaineita ja jotka on valmistettu alalla tunnetuin menetelmin. Termi "parenteraalinen" sulkee tässä käytettynä piiriinsä ihonalaisen, laskimonsisäisen, lihaksensisäisen, rintalastansisäisen ja kallonsisäisen injektointi- tai infusointitekniikan.

Yhdisteitä voidaan antaa myös steroidien ja muiden immunosuppressiivisten lääkeaineiden kanssa, kuten esimerkiksi rapamysiinin, atsatiopriinin, 15-deoksispergualiinin, syklosporiinin, FK-506:n tai niiden yhdistelmien kanssa, immunosuppressiivisen vaikutuksen lisäämiseksi.

Myös OKT3:a, joka on hiiren monoklonaalinen vasta-aine ihmisen T-lymfosyyttien CD3-pinta-antigeenille, voidaan antaa laskimonsisäisesti tämän keksinnön mukaisesti valmistettavien yhdisteiden kanssa samanaikaisesti vieraan siirteen akuutin hylkimisen kääntämiseksi ja siirteen pelastamiseksi, erityisesti munuaissiirroissa.

Keksintöä valaistaan tarkemmin seuraavin esimerkein, joiden ei ole tarkoitus olla millään tavalla rajoittavia.

**Esimerkit**

**Yleistä**

Protonimagneettiset resonanssispektrit ($^1$H-NMR-spektrit) rekisteröitiin Bruker AMX 500 -laitteella taajuudella 500 MHz. Kemialliset siirtymät protonien resonansseille ilmoitetaan miljoonasosina (δ) suhteessa $Me_4Si$:iin (δ 0,0). Analyyttinen suuren erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) toteutettiin joko Waters 600E tai Hewlett Packard 1050 -nestekromatografilla.

Alla kuvattuja yhdisteitä valaistaan kuviossa 1.

**Esimerkki 1**

**(S)-1,7-difenyyli-4-heptyyli-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatin (3) valmistus**

**4-fenyyli-1-butyraldehydi (26)**

Liuokseen, joka sisälsi 4-fenyyli-1-butanolia (3,2 ml, 20,8 mmol; Aldrich Chemical Co.) $CH_2Cl_2$:ssa (20 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin jauhettuja 0,3 nm:n (3 Å) molekyyliseuloja (3,2 g) ja sen jälkeen pyridiniumkloorikromaattia (PCC; 5,37 g, 24,9 mmol). Tulokseksi saatua suspensiota sekoitettiin 1 tunti lämpötilassa 0 °C, jonka jälkeen lisättiin lisää PCC:tä (2,16 g, 10,0 mmol) ja reaktioseos lämmitettiin huoneenlämpötilaan. Ympäristön lämpötilassa suoritetun 0,5 h:n sekoituksen jälkeen reaktioseos laimennettiin eetterillä ja suodatettiin piimaan läpi, jolloin saatiin 2,5 g raakatuotetta. Flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 5 % etyyliasetaattia) tuotti tulokseksi 700 mg aldehydiä 26. $^1$H-NMR-spektri vastasi tuotetta.

**3-fenyyli-1-propyylimagnesiumkloridi (27)**

Suspensioon, joka sisälsi magnesiumlastuja (737 mg, 30,3 mmol) THF:ssa (50 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin 1,2-dibromietaania (50 µl) ja sen jälkeen pisaroittain 1-bromi-3-fenyylipropaania (5,5 g, 25,1 mmol; Aldrich Chemical Co.). Huoneenlämpötilassa suoritetun 0,5 h:n sekoituksen jälkeen supernatantti siirret-

tiin putken kautta 100 ml:n varastointiastiaan ja käytettiin myöhemmin Grignard-reagenssin 27 THF-liuoksena (0,5 mol/l).

**1,7-difenyyli-4-heptanoli (28)**

Liuokseen, joka sisälsi 4-fenyyli-1-butanaalia 26 (700 mg, 4,7 mmol) THF:ssa (5,0 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin 3-fenyyli-1-propyylimagnesiumkloridia 27 (10,0 ml, 5,0 mmol) ja tulokseksi saatua seosta sekoitettiin 0,5 h lämpötilassa 0 °C. Reaktioseokseen lisättiin sitten reaktion tukahduttamiseksi pisaroittain kylläistä $NH_4Cl$:a ja se laimennettiin eetterillä. Faasit erotettiin ja orgaaninen kerros pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella ja kuivattiin sitten $MgSO_4$:lla. Väkevöinti tuotti tulokseksi 1,12 g alkoholia 28 öljynä. Tämän yhdisteen $^1$H-NMR-spektri vastasi sen rakennetta.

**(S)-Boc-pipekolyyli-1,7-difenyyli-4-heptyyliesteri (29)**

Liuokseen, joka sisälsi (S)-Boc-pipekoliinihappoa (164,2 mg, 0,72 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (5,0 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin alkoholia 28 (174,7 mg, 0,65 mmol), 1-(3-dimetyyliaminopropyyli)-3-etyylikarbodiimidihydrokloridia (EDC; 140,8 mg, 0,72 mmol) ja katalyyttinen määrä N,N-dimetyyliaminopyridiiniä (DMAP). Reaktioseosta sekoitettiin ympäristön lämpötilassa 0,5 tuntia ja se siirrettiin sitten suoraan silikageelipylvääseen. Eluointi heksaanilla, joka sisälsi 10 % etyyliasetaattia, tuotti tulokseksi 76,2 mg esteriä 29 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi tuotetta.

**(S)-1,7-difenyyli-4-heptyylipipekolaatti (30)**

Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 29 (47 mg, 0,10 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (1,0 ml) ja jota pidettin ympäristön lämpötilassa, lisättiin trifluorietikkahappoa (1,0 ml). Huoneenlämpötilassa suoritetun 0,5 tunnin sekoituksen jälkeen tulokseksi saatu liuos neutraloitiin lisäämällä siihen pisaroittain kylläistä $K_2CO_3$:a. Kerrokset erotettiin

ja orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin sitten $MgSO_4$:llä ja väkevöitiin, jolloin saatiin 23 mg amiinia 30 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**3,4,5-trimetoksibentsoyylimuurahaishappo (31)**

Liuokseen, joka sisälsi 3,4,5-trimetoksiasetofenonia (9,2 g, 43,4 mmol; Aldrich Chemical Co.) pyridiinissä (35 ml), lisättiin seleenidioksidia (6,3 g, 56,7 mmol) ja tulokseksi saatua liuosta kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa yön yli. Reaktioseos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, suodatettiin piimaan läpi ja väkevöitiin, jolloin saatiin tummanruskea öljy, joka liuotettiin etyyliasetaattiin ja pestiin 1,0 N HCl:llä ja sen jälkeen kylläisellä $NaHCO_3$:lla. Emäksinen vesikerros laimennettiin eetterillä ja tehtiin happamaksi väkevällä HCl:lla. Kerrokset erotettiin ja orgaaninen faasi pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella ja kuivattiin sitten $Na_2SO_4$:lla, jolloin saatiin 8,4 g tummankeltaista kiinteätä ainetta. Tämän aineen uudelleenkiteytys etyyliasetaatti-heksaaniseoksesta tuotti sitten tulokseksi 6,8 g happoa 31 vaaleankeltaisena kiinteänä aineena. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-1,7-difenyyli-4-heptyyli-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti (3)**

Liuokseen, joka sisälsi amiinia 30 (23 mg, 0,06 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (1,0 ml) ja jota pidettin huoneenlämpötilassa, lisättiin happoa 31 (21,8 mg, 0,09 mmol) ja sen jälkeen EDC:tä (17,9 mg, 0,09 mmol), tulokseksi saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 0,5 h ja se siirrettiin suoraan silikageelipylvääseen. Eluointi heksaanilla, joka sisälsi 15 % etyyliasetaattia, tuotti tulokseksi 8,4 mg amidia 3 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,35 - 7,06 (m), 5,32 (leveä s), 5,00 (leveä s), 4,88 (leveä s), 4,58 (d), 4,31 (leveä s), 3,95 (s), 3,90 (s), 3,89 (s), 3,85 (s), 3,44 (d), 3,21 (t), 3,04 (t), 2,54 (leveä s), 2,51 (leveä s), 2,42 (leveä s), 2,30 (d), 2,15 (d), 1,83 - 1,21 (m).

**Esimerkki 2**

**(R- ja S)-1-(3-fenoksifenyyli)-4-fenyyli-1-butyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatin (4) valmistus**

**3-fenoksibentsaldehydi (32)**

Liuokseen, joka sisälsi 3-fenoksibentsyylialkoholia (1,8 ml, 10,3 mmol; Aldrich Chemical Co.) $CH_2Cl_2$:ssa (20 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin jauhettuja 0,4 nm:n (4 Å) molekyyliseuloja (1,5 g) ja aktivoitua $MnO_2$:a (2,5 g). Tulokseksi saatua suspensiota sekoitettiin huoneenlämpötilassa 0,5 tuntia, jonka jälkeen lisättiin lisää $MnO_2$:a (2,5 g). Huoneenlämpötilassa suoritetun 0,5 tunnin sekoituksen jälkeen reaktioseos suodatettiin piimaan läpi, jolloin saatiin 1,84 g aldehydiä 32 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-(3-fenoksifenyyli)-4-fenyyli-1-butanoli (33)**

Alkoholi 33 valmistettiin aldehydistä 32 (190 mg, 0,96 mmol) ja yhdisteestä 27 (2,0 ml, 1,0 mmol) THF:ssa (2,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 28 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 10 % etyyliasetaattia) tuotti tulokseksi 108 mg raseemista alkoholia 33. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekoliinihappo (34)**

Lietteeseen, joka sisälsi (S)-pipekoliinihapon tartraattisuolaa [953,3 mg, 3,4 mmol; M. Egbertson ja S. J. Danishefsky, J. Org. Chem. 54 (1989) 11] $CH_2Cl_2$:ssa (7,0 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin di-isopropyylietyyliamiinia (3,9 ml, 22,4 mmol) ja klooritrimetyylisilaania (2,4 ml, 18,9 mmol) ja tulokseksi saatua liuosta sekoitettiin 0,5 h lämpötilassa 0 °C. Erillisessä reaktiopullossa lisättiin liuokseen, joka sisälsi happoa 31 (820 mg, 3,4 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (7,0 ml), oksalyylikloridia

(450 µl, 5,2 mmol) ja kolme pisaraa DMF:a. Kaasun kehittymisen lakattua toisen pullon koko sisältö lisättiin ensimmäiseen reaktioastiaan, ja tulokseksi saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 h. Reaktioseos väkevöitiin, liuotettiin eetteriin ja pestiin 0,5 N HCl:lla ja sen jälkeen kylläisellä $NaHCO_3$:lla. Emäksinen vesifaasi tehtiin happamaksi väkevällä HCl:lla ja uutettiin eetterillä. Eeteriuuttoliuokset pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin, jolloin saatiin 490 mg happoa 34. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R- ja S)-1-(3-fenoksifenyyli)-4-fenyyli-1-butyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti (4)**

Liuokseen, joka sisälsi happoa 34 (29,4 mg, 0,08 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (2,0 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin oksalyylikloridia (11 µl, 0,13 mmol) ja kolme pisaraa DMF:a, reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 0,5 tuntia ja sitten se väkevöitiin ja suspendoitiin bentseeniin (1,0 ml). Tähän suspensioon lisättiin alkoholia 33 (32,0 mg, 0,1 mmol) ja hopeasyanidia (13,4 mg, 0,1 mmol). Tulokseksi saatua seosta kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa yön yli ja se jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 10 % etyyliasetaattia) tuotti tulokseksi 8,8 mg esteriä 4 diastereomeerien seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,34 - 7,19 (m), 7,18 - 7,03 (m), 7,02 - 6,84 (m), 6,83 - 6,72 (m), 5,73 (q), 5,69 - 5,55 (m) 5,38 (t), 4,55 (leveä d), 4,35 (dd), 3,94 (s), 3,92 (s), 3,89 (s), 3,83 (s), 3,73 (s), 3,63 (s), 3,48 - 3,35 (m), 3,20 (t), 3,10 (t), 2,60 (q), 2,40 (dd), 1,95 - 1,91 (m), 1,90 - 1,45 (m).

**Esimerkki 3**

**(R- ja S)-6-fenyyli-1-(3-pyridyyli)-3-heksyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatin (7) valmistus**

**3-(3-pyridyyli)-1-propyylialdehydi (35)**

Liuokseen, joka sisälsi Dess-Martin-perjodinaania [2,3 g, 5,46 mmol; D. B. Dess ja J. C. Martin, J. Org. Chem. 48 (1983) 4155] $CH_2Cl_2$:ssa (10 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin 3-(3-pyridyyli)-1-propanolia (470 µl, 3,65 mmol) ja tulokseksi saadun seoksen annettiin lämmetä 1,5 tunnin aikana lämpötilasta 0 °C ympäristön lämpötilaan. Tähän liuokseen lisättiin $Na_2S_2O_3$:a (6,0 g, 38,22 mmol) kylläisessä $NaHCO_3$:ssa ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 15 min. Reaktioseos uutettiin $CH_2Cl_2$:lla, kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi heksaani-asetoniseoksella, 3:1) antoi tuotteeksi aldehydiä 35 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R- ja S)-6-fenyyli-1-(3-pyridyyli)-3-heksanoli (36)**

Alkoholi 36 valmistettiin aldehydistä 35 (125 mg, 0,92 mmol) ja yhdisteestä 27 (2,0 ml, 1,0 mmol) THF:ssa (2,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 28 valmistamiseksi, jolloin saatiin 221 mg puhdistamatonta alkoholia 36. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-Boc-pipekolyyli-(R ja S)-6-fenyyli-1-(3-pyridyyli)-3-heksyyliesteri (37)**

Esteri 37 valmistettiin alkoholista 36 (125 mg, 0,49 mmol), (S)-Boc-pipekoliinihaposta (93 mg, 0,41 mmol), EDC:stä (94 mg, 0,49 mmol) ja katalyyttisestä määrästä DMAP:tä $CH_2Cl_2$:ssa (1,0 ml) ja DMF:ssa (1,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 29 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi heksaani-etyyliasetaattiseoksella, 2:1) tuotti tulokseksi 105 mg diaste-

reomeerista esteriä 37 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-6-fenyyli-1-(3-pyridyyli)-3-heksyyli-(S)-pipekolaatti (38)**

Amiini 38 valmistettiin käsittelemällä esteri 37 (95 mg, 0,20 mmol) trifluorietikkahapolla (1,0 ml) $CH_2Cl_2$:ssa (3,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 30, jolloin saatiin 58 mg diastereomeerista amiinia 38 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-6-fenyyli-1-(3-pyridyyli)-3-heksyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksiglyoksyyli)pipekolaatti (7)**

Esteri 7 valmistettiin amiinista 38 (54 mg, 0,15 mmol), haposta 31 (50 mg, 0,22 mmol) ja EDC:stä (42 mg, 0,22 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (3,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 esterin 3 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi etyyliasetaatti-heksaaniseoksella, 1:1) tuotti tulokseksi 73 mg diastereomeerista esteriä 7 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8,48 - 8,42 (m), 7,50 - 7,41 (m), 7,32 (d), 7,27 - 7,03 (m), 5,38 (d) 5,31 (d), 5,06 - 5,01 (m), 4,97 - 4,93 (m), 4,60 (leveä d), 3,92 (s), 3,88 (s), 3,86 (s), 3,84 (s), 3,82 (s), 3,79 (s), 3,46 (leveä d), 3,27 (leveä t), 2,73 - 2,68 (m), 2,38 - 2,29 (m), 1,98 - 1,76 (m).

**Esimerkki 4**

**(R- ja S)-(E)-1-[trans-(4-hydroksisykloheksyyli)]-2-metyyli-6-fenyyli-3-heks-1-enyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatin (8) valmistus**

**Cis- ja trans-4-(t-butyylidimetyylisilyylioksi)sykloheksan-1-oli (39 ja 40)**

Liuokseen, joka sisälsi cis- ja trans-metyyli-4-hydroksisykloheksaanikarboksylaattia [3,43 g, 21,7 mmol; D. S. Noyce ja D. B. Denney, J. Am. Chem. Soc. 74 (1952) 5912] dikloorimetaanissa (45 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin 2,6-lutidiinia (3,0 ml, 26,0 mmol) ja sen

jälkeen t-butyylidimetyylisilyylitrifluorimetaanisulfonaattia (5,5 ml, 23,8 mmol). Jäähaude poistettiin ja reaktioseosta sekoitettiin 2 tuntia lämpötilassa 25 °C, jonka jälkeen liuos kaadettiin kylläiseen natriumvetykarbonaattiin. Kerrokset erotettiin ja orgaaninen kerros pestiin kylläisellä kuparisulfaatilla ja vedellä ja kuivattiin sitten $MgSO_4$:lla, jolloin saatiin 5,9 g puhdistamattomia metyyliestereitä. Liuos, joka sisälsi tätä seosta (5,72 g, 21,0 mmol) vedettömässä THF:ssa (45 ml), käsiteltiin litiumalumiinihydridillä (400 mg, 10,5 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 0,5 tuntia lämpötilassa 25 °C, ja sen jälkeen siihen lisättiin reaktion tukahduttamiseksi hitaasti kylläistä Rochellen suolan liuosta. Seos laimennettiin eetterillä, kerrokset erotettiin ja vesikerros pestiin kahdesti etyyliasetaatilla. Yhdistetyt orgaaniset uuttoliuokset kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin, jolloin saatiin 4,9 g diastereomeerisia alkoholeja. Flash-kromatografia (eluointi etyyliasetaatti-heksaaniseoksella, 1:5) tuotti tulokseksi 650 mg yhdistettä 39, 1,10 g yhdistettä 40 ja 2,40 g niiden seosta. Yhdistettä 39 koskevat tiedot. $^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3,99 - 3,92 (m), 3,46 (d), 1,72 - 1,58 (m), 1,57 - 1,36 (m), 0,86 (s), 0,08 (s). Yhdistettä 40 koskevat tiedot. $^1$H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3,47 (dddd), 3,38 (d), 1,86 - 1,67 (m), 1,47 - 1,16 (m), 1,05 - 0,77 (m), 0,72 (s), 0,02 (s).

**(E)-etyyli-3-[trans-(4-t-butyylidimetyylisilyylioksisykloheksyyli)]-2-metyyliprop-2-enoaatti (41)**

Liuokseen, joka sisälsi oksalyylikloridia (785 µl, 9,0 mmol) dikloorimetaanissa (10 ml) ja jonka lämpötila oli -78 °C,, lisättiin dimetyylisulfoksidia (1,3 ml, 18,0 mmol). Tulokseksi saatua liuosta sekoitettiin 5 min, ja sen jälkeen lisättiin alkoholia 40 (1,1 g, 4,5 mmol) dikloorimetaanissa (10 ml). Reaktioseosta sekoitettiin 45 min lämpötilassa -78 °C, jonka jälkeen lisättiin trietyyliamiinia (3,8 ml, 27,0 mmol) ja liuoksen annettiin

lämmetä ympäristön lämpötilaan. Reaktio tukahdutettiin 1,0 N HCl:lla ja vesikerros uutettiin kolmella dikloorimetaanierällä. Yhdistetyt orgaaniset uuttoliuokset kuivattiin $MgSO_4$:lla ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin 1,0 g aldehydivälituotetta. Tämän aldehydin (450 mg, 1,86 mmol) liuos käsiteltiin suoraan (karbetoksietylideeni)trifenyylifosforaanilla (710 mg, 1,95 mmol) dikloorimetaanissa (5,0 ml). Tulokseksi saatua reaktioseosta sekoitettiin ympäristön lämpötilassa yön yli ja sitten se kaadettiin veteen. Kerrokset erotettiin ja vesikerros uutettiin kahdesti dikloorimetaanilla. Yhdistetyt orgaaniset kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin, jolloin saatiin enoaattia 41, joka sisälsi pienen määrän Z-isomeeria. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(E)-3-[trans-(4-t-butyylidimetyylisilyylioksisykloheksyyli)]-2-metyyliprop-2-en-1-oli (42)**

Liuokseen, joka sisälsi enoaattia 41 (860 mg, 2,6 mmol) vedettömässä tetrahydrofuraanissa (5,0 ml) ja jonka lämpötila oli 25 °C, lisättiin litiumalumiinihydridiä (50 mg, 1,3 mmol) ja tulokseksi saatua seosta sekoitettiin 30 min. Reaktio tukahdutettiin lisäämällä hitaasti kylläistä Rochellen suolaa ja reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla. Kerrokset erotettiin ja vesikerros uutettiin kahdella etyyliasetaattierällä. Yhdistetyt orgaaniset uuttoliuokset pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella ja kuivattiin sitten $MgSO_4$:lla. Haihdutus ja flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 15 % etyyliasetaattia) tuottivat tulokseksi 370 mg allyylialkoholia 42. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(E)-3-[trans-(4-t-butyylidimetyylisilyylioksisykloheksyyli)]-2-metyyliprop-2-en-1-oli (43)**

Liuokseen, joka sisälsi oksalyylikloridia (105 µl, 1,2 mmol) dikloorimetaanissa (1,0 ml) ja jonka lämpötila oli -78 °C,, lisättiin dimetyylisulfoksidia (170 µl, 2,4 mmol). Tulokseksi saatua liuosta sekoitettiin 5 min,

ja sen jälkeen lisättiin alkoholia 42 (170 mg, 0,6 mmol) dikloorimetaanissa (1,0 ml). Reaktioseosta sekoitettiin 45 min lämpötilassa -78 °C, jonka jälkeen lisättiin trietyyliamiinia (500 µl, 3,6 mmol) ja liuoksen annettiin lämmetä ympäristön lämpötilaan. Reaktio tukahdutettiin 1,0 N HCl:lla ja vesikerros uutettiin kolmella dikloorimetaanierällä. Yhdistetyt orgaaniset uuttoliuokset kuivattiin $MgSO_4$:lla ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin puhdistamatonta aldehydiä 43, joka käytettiin suoraan seuraavassa reaktiossa. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-(E)-1-[trans-(4-t-butyylidimetyylisilyyli-oksisykloheksyyli)]-2-metyyli-6-fenyyli-3-heks-1-en-3-oli (44)**

Alkoholi 44 valmistettiin aldehydiraakatuotteesta 43 ja yhdisteestä 27 (1,5 ml, 0,075 mmol) THF:ssa (2,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 28 valmistamiseksi, jolloin saatiin 220 mg puhdistamatonta diastereomeerista alkoholia 44. Flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 20 % etyyliasetaattia) tuotti tulokseksi 146 mg alkoholia 42 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-(E)-1-[trans-(4-t-butyylidimetyylisilyyli-oksisykloheksyyli)]-2-metyyli-6-fenyyli-3-heks-1-enyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti (45)**

Liuokseen, joka sisälsi happoa 34 (75,7 mg, 0,22 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (2,5 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin oksalyylikloridia (30 µl, 0,34 mmol) ja kolme pisaraa DMF:a, reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 0,5 tuntia ja sitten se väkevöitiin ja suspendoitiin bentseeniin (1,0 ml). Tähän suspensioon lisättiin alkoholia 44 (43,4 mg, 0,11 mmol) ja hopeasyanidia (28,8 mg, 0,22 mmol). Tulokseksi saatua seosta kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa yön yli ja se jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja väkevöitiin. Flash-kromato-

grafia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 4 % asetonia) tuotti tulokseksi 17,5 mg esteriä 45 diastereomeerien seoksena. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-(E)-1-[trans-(4-hydroksisykloheksyyli)]-2-metyyli-6-fenyyli-3-heks-1-enyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti (8)**

Liuokseen, joka sisälsi esteriä 45 (17,5 mg, 0,02 mmol) $CH_3CN$:ssä (1,0 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin 10 pisaraa liuosta, joka sisälsi $CH_3CN$:ä ja 5-%:ista HF:a suhteessa 95:5, ja tulokseksi saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 0,5 tuntia. Reaktioseos neutraloitiin kylläisellä $K_2CO_3$:lla ja uutettiin eetterillä. Eetterikerrokset pestiin vedellä, kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin, jolloin saatiin 7,2 mg puhdistamatonta ainetta. Flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 15 % asetonia) tuotti tulokseksi 4,9 mg diastereomeerista alkoholia 8 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,38 - 7,02 (m), 5,35 - 5,01 (m), 4,62 - 4,53 (m), 4,28 (t), 3,95 (s), 3,89 (s), 3,87 (s), 3,86 (s), 3,85 (s), 3,81 (s), 3,55 (m), 3,45 (m), 3,20 (m), 3,10 - 2,90 (m), 2,60 - 2,45 (m), 2,32 (t), 2,10 (t), 1,95 (d), 1,85 - 1,40 (m), 1,39 - 1,02 (m).

**Esimerkki 5**

**(R ja S)-5-(3-indolyyli)fenyyli-2-pentyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatin (11) valmistus**

**N-metyyli-N-metoksi-4-(3-indolyyli)butyramidi (46)**

Lietteeseen, joka sisälsi 3-indolivoihappoa (1,75 g, 8,61 mmol; Aldrich Chemical Co.) asetonitriilissä ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiinia (7,0 ml, 40,2 mmol), N,N-dimetyylihydroksyyliamiinihydrokloridia (1,0 g, 10,3 mmol) ja bentsotriatsol-1-yylioksitris(dimetyyliamino)fosfoniumheksafluorifosfaattia (BOP-reagenssi; 4,19 g, 9,5 mmol), tulokseksi saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa

yön yli ja sitten se haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin, pestiin vedellä, 0,5 N HCl:lla, kylläisellä $NaHCO_3$:lla ja kylläisellä NaCl:lla ja sen jälkeen kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi käyttäen gradienttia 2 - 10 % eetteriä dikloorimetaanissa) antoi tulokseksi 2,0 g amidia 46. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**Bentsyyli-3-(3-indolyyli)propyyliketoni (47)**

Liuokseen, joka sisälsi amidia 46 (147 mg, 0,60 mmol) THF:ssa (4,0 ml) ja jonka lämpötila oli -78 °C, lisättiin bentsyylimagnesiumkloridia (1,0 mol/l $Et_2O$:ssä), reaktioseoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin 3 tuntia. Reaktio tukahdutettiin 5-%:isella $KHSO_4$:lla ja reaktioseos uutettiin eetterillä. Yhdistetyt eetterikerrokset pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella ja kuivattiin $MgSO_4$:lla. Flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 25 % eetteriä) tuotti tulokseksi 108 mg ketonia 47. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-5-(3-indolyyli)-1-fenyyli-2-pentanoli (48)**

Lietteeseen, joka sisälsi ketonia 47 (105 mg, 0,38 mmol) MeOH:ssa (3,0 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin kiinteätä $NaBH_4$:ä (30 mg, 0,79 mmol) ja tulokseksi saatua suspensiota sekoitettiin 3 tuntia. Reaktioseokseen lisättiin reaktion tukahduttamiseksi 5-%:ista $KHSO_4$:a ja seos uutettiin etyyliasetaatilla. Yhdistetyt orgaaniset uuttoliuokset pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella ja kuivattiin $MgSO_4$:lla. Flash-kromatografia (eluointi dikloorimetaanilla, joka sisälsi 4 % eetteriä) tuotti tulokseksi 81 mg alkoholia 48 valkeana kiinteänä aineena. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-Boc-pipekolyyli-(R ja S)-5-(3-indolyyli)-1-fenyyli-2-pentyyliesteri (49)**

Esteri 49 valmistettiin alkoholista 48 (80 mg, 0,29 mmol), (S)-Boc-pipekoliinihaposta (82 mg, 0,36 mmol),

EDC:stä (66 mg, 0,34 mmol) ja katalyyttisestä määrästä 4-pyrrolidinopyridiiniä $CH_2Cl_2$:ssa (2,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 29 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi eetteri-dikloorimetaani-heksaaniseoksella, 4:10:26) tuotti tulokseksi 108 mg diastereomeerista esteriä 49 valkeana vaahtona. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-5-(3-indolyyli)-1-fenyyli-2-pentyyli-(S)-pipekolaatin hydrokloridisuola (50)**

Liuokseen, joka sisälsi esteriä 49 (103 mg, 0,21 mmol) EtOAc:ssa (10 ml) ja jonka lämpötila oli -20 °C, puhallettiin vedetöntä HCl:a 10 min ja sen jälkeen reaktioseos huuhdottiin $N_2$:llä. Väkevöinti tuotti tulokseksi 108 mg puhdistamatonta amiinia 50 hydrokloridisuolana. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-5-(3-indolyyli)-1-fenyyli-2-pentyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti (11)**

Lietteeseen, joka sisälsi puhdistamatonta amiinihydrokloridia 50 (108 mg) $CH_3CN$:ssä ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiinia (91 µl, 0,52 mmol), happoa 31 (76 mg, 0,31 mmol) ja BOP-reagenssia (111 g, 0,25 mmol), tulokseksi saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 vuorokautta ja sitten se haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (75 ml), pestiin sen jälkeen perätysten vedellä, 5-%:isella $KHSO_4$:lla, kylläisellä $NaHCO_3$:lla ja kylläisellä NaCl:lla ja sitten kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi dikloorimetaanilla, joka sisälsi 4 % eetteriä) antoi tulokseksi 56,7 mg diastereomeerista amidia 11 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,98 (d), 7,56 (t), 7,38 - 6,73 (m), 5,38 - 5,14 (m), 3,90 (m), 3,38 (leveä t), 3,10 (leveä t), 2,97 - 2,60 (m), 2,31 (d), 2,10 (d), 1,98 - 1,17 (m), 0,8 (m). $R_f$ = 0,51 (10 % eetteriä sisältävä dikloorimetaani).

**Esimerkki 6**

**(R ja S)-2-bentsyyli-4-fenyyli-1-butyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatin (16) valmistus**

**(R ja R)-2-bentsyyli-4-fenyyli-1-voihappo (51)**

Liuokseen, joka sisälsi 4-fenyylivoihappoa (1,06 g, 6,43 mmol) THF:ssa (20 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin kiinteätä NaH:ä (193 mg, 6,43 mmol; 80 % mineraaliöljyssä). Lämpötilassa 0 °C suoritetun 0,5 tunnin sekoituksen jälkeen lisättiin litiumdi-isopropyyliamidi-THF-kompleksia (2,0 mol/l; 3,2 ml, 6,43 mmol) ja tulokseksi saatua punaista liuosta sekoitettiin 45 min lämpötilassa 0 °C. Tähän seokseen lisättiin bentsyylibromidia (765 µl, 6,43 mmol) ja liuosta sekoitettiin sen jälkeen huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseokseen lisättiin reaktion tukahduttamiseksi hitaasti kylläistä $NaHCO_3$:a ja se pestiin sitten eetterillä. Emäksiset uuttoliuokset tehtiin happamiksi kiinteällä $KHSO_4$:llä ja suoritettiin partitio etyyliasetaatin avulla. Yhdistetyt orgaaniset uuttoliuokset pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivattiin $MgSO_4$:llä ja väkevöitiin, jolloin saatiin 484 mg happoa 51. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-2-bentsyyli-4-fenyyli-1-butanoli (52)**

Liuokseen, joka sisälsi happoa 51 (469 mg, 1,84 mmol) THF:ssa (3,0 ml) ja jonka lämpötila oli -78 °C, alisättiin litiumalumiinihydridiä (1,0 mol/l THF:ssa; 2,03 ml, 2,3 mmol), tulokseksi saadun liuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin yön yli. Reaktioseokseen lisättiin reaktion tukahduttamiseksi hitaasti Rochellen suolaa ja suoritettiin partitio eetterin avulla. Yhdistetyt eetteriuuttoliuokset pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivattiin $MgSO_4$:llä ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi dikloorimetaanilla, joka sisälsi 2 % eetteriä) tuotti tulokseksi 264 mg alkoholia 52. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-Boc-pipekolyyli-(R ja S)-2-bentsyyli-4-fenyyli-1-butyyliesteri (53)**

Esteri 53 valmistettiin alkoholista 52 (264 mg, 1,10 mmol), (S)-Boc-pipekoliinihaposta (253 mg, 1,32 mmol), EDC:stä (253 mg, 1,32 mmol) ja katalyyttisestä määrästä 4-pyrrolidinopyridiiniä $CH_2Cl_2$:ssa (2,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 29 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi eetteri-dikloorimetaani-heksaaniseoksella, 1:5:14) tuotti tulokseksi 375 mg diastereomeerista esteriä 53. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-2-bentsyyli-4-fenyyli-1-butyyli-(S)-pipekolaatin hydrokloridisuola (54)**

Liuoksen sisään, joka sisälsi esteriä 53 (375 mg, 0,83 mmol) EtOAc:ssa (10 ml) ja jonka lämpötila oli -20 °C, puhallettiin vedetöntä HCl:a 10 min ja sen jälkeen reaktioseos huuhdottiin $N_2$:llä. Väkevöinti tuotti tulokseksi 352 mg puhdistamatonta amiinia 54 hydrokloridisuolana. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-2-bentsyyli-4-fenyyli-1-butyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti (16)**

Lietteeseen, joka sisälsi puhdistamatonta amiinihydrokloridia 54 (54 mg, 0,14 mmol) $CH_3CN$:ssä (2,0 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin N,N-diisopropyylietyyliamiinia (60 µl, 0,35 mmol), happoa 31 (50 mg, 0,21 mmol) ja BOP-reagenssia (73 g, 0,16 mmol), tulokseksi saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja sitten se haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (75 ml), pestiin sen jälkeen perätysten vedellä, 5-%:isella $KHSO_4$:lla, kylläisellä $NaHCO_3$:lla ja kylläisellä NaCl:lla ja sitten kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi dikloorimetaanilla, joka sisälsi 4 % eetteriä) antoi tulokseksi 52,7 mg diastereomeerista amidia 16 rotameerien

seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,21 - 7,01 (m), 5,41 (leveä s), 4,21 (dd), 4,08 (dd), 3,88 (d), 3,95 (s), 3,49 (d), 3,39 (dt), 2,80 - 2,62 (m), 2,38 (leveä t), 2,09 (leveä s), 1,87 - 1,20 (m). $R_f$ = 0,9 (metanoli-eetteri-dikloorimetaaniseos, 1:3:26).

**Esimerkki 7**

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(2-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-N-(t-butyyliglyoksyyli)pipekolaatin (21) valmistus**

**(E ja Z)-3-(1,3-dioksan-2-yyli)-1-(2-pyridyyli)-1-propeeni (55 ja 56)**

Suspensioon, joka sisälsi [2-(1,3-dioksan-2-yyli)-etyyli]trifenyylifosfoniumbromidia (4,6 g, 10,2 mmol; Aldrich Chemical Co.) THF:ssa (50 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin butyylilitiumia (1,6 mol/l heksaanissa; 6,4 ml, 10,2 mmol) ja tulokseksi saatua punaista liuosta sekoitettiin 0,5 tuntia lämpötilassa 0 °C. Tähän liuokseen lisättiin 2-pyridiinikarboksaldehydiä (880 µl, 9,3 mmol; Aldrich Chemical Co.), reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunti ja sen jälkeen se kaadettiin veteen ja suoritettiin partitio eetterin avulla. Yhdistetyt eeteriuuttoliuokset kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi heksaani-etyyliasetaatti-seoksella, 3:1) tuotti tulokseksi 0,43 g (E)-3-(1,3-dioksan-2-yyli)-1-(2-pyridyyli)-1-propeenia (55) ja 1,12 g (Z)-3-(1,3-dioksan-2-yyli)-1-(2-pyridyyli)-1-propeenia (56). $^1$H-NMR-spektrit vastasivat rakenteita.

**1-(1,3-dioksan-2-yyli)-3-(2-pyridyyli)propaani(57)**

Liuoksen läpi, joka sisälsi olefiinia 56 (800 mg, 4,2 mmol) ja 10 % palladiumia hiilellä sisältävää katalyyttiä (100 mg), johdettiin tasainen vetykaasuvirta 10 minuutin ajan. Sen jälkeen reaktioseos suodatettiin piimaan läpi ja väkevöitiin, jolloin saatiin 805 mg asetaalia 57 värittömänä öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**4-(2-pyridyyli)butyraldehydi (58)**

Liuosta, joka sisälsi asetaalia 57 (420 mg, 2,2 mmol) THF:ssa (4,0 ml) ja 4 N HCl:ssa (3,0 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1,5 tuntia ja sitten se neutraloitiin lisäämällä hitaasti kiinteätä $NaHCO_3$:a. Reaktioseos uutettiin etyyliasetaatilla, kuivattiin $MgSO_4$:llä ja väkevöitiin, jolloin saatiin 288 mg aldehydiä 58. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(2-pyridyyli)-4-heptanoli (59)**

Alkoholi 59 valmistettiin aldehydistä 58 (288 mg, 1,93 mmol) ja yhdisteestä 27 (2,3 ml, 2,3 mmol) THF:ssa (3,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 28 valmistamiseksi, jolloin saatiin 520 mg puhdistamatonta alkoholia 59. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-Boc-pipekolyyli-(R ja S)-1-fenyyli-7-(2-pyridyyli)-4-heptyyliesteri (60)**

Esteri 60 valmistettiin alkoholista 59 (520 mg, 1,93 mmol), (S)-Boc-pipekoliinihaposta (442 mg, 1,93 mmol), EDC:stä (370 mg, 1,93 mmol) ja katalyyttisestä määrästä DMAP:tä $CH_2Cl_2$:ssa (4,0 ml) ja DMF:ssa (4,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 29 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi heksaani-etyyliasetaattiseoksella, 3:1) tuotti tulokseksi 740 mg diastereomeerista esteriä 60 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(2-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-pipekolaatti (61)**

Amiini 61 valmistettiin käsittelemällä esteri 60 (740 mg, 1,54 mmol) trifluorietikkahapolla (2,0 ml) $CH_2Cl_2$:ssa (5,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 30 valmistamiseksi, jolloin saatiin 580 mg diastereomeerista amiinia (61) öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(2-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-N-metyylioksalyylipipekolaatti (62)**

Liuokseen, joka sisälsi amiinia 61 ((48 mg, 0,13 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (1,0 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiinia (33 µl, 0,15 mmol) ja metyylioksalyylikloridia (14 µl, 0,15 mmol), tulokseksi saatu seos lämmitettiin huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin yön yli. Reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla, pestiin kylläisellä $NH_4Cl$:lla ja kylläisellä NaCl:lla, kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin sen jälkeen. Flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 25 - 30 % etyyliasetaattia) antoi tulokseksi 49 mg diastereomeerista amidia 62 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(2-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-N-(t-butyyliglyoksyyli)pipekolaatti (21)**

Liuokseen, joka sisälsi amidia 62 THF:ssa (1,2 ml) ja jonka lämpötila oli -78 °C, lisättiin pisaroittain t-butyylilitiumia, kunnes TLC osoitti lähtöaineen kuluneen loppuun. Reaktioseokseen lisättiin reaktion tukahduttamiseksi kylläistä $NH_4Cl$:a ja suoritettiin partitio etyyliasetaatin avulla. Yhdistetyt orgaaniset uuttoliuokset pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi heksaanilla, joka sisälsi 30 % etyyliasetaattia) tuotti tulokseksi diastereomeerista amidia 21 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8,50 (t), 7,57 (t), 7,20 - 7,05 (m), 5,23 (d), 5,18 (d), 4,56 (d), 4,44 (leveä d), 4,13 (d), 3,69 (leveä d), 3,37 - 3,28 (m), 3,13 - 3,00 (m), 2,85 - 2,70 (m), 2,65 - 2,54 (m), 2,38 - 2,15 (m), 1,82 - 1,65 (m), 1,56 - 1,44 (m), 1,55 - 1,30 (m), 1,27 (s), 1,21 (s).

**Esimerkki 8**

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(3-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti-N-oksidin (22) valmistus**

**(E ja Z)-3-(1,3-dioksan-2-yyli)-1-(3-pyridyyli)propeeni (63)**

Suspensioon, joka sisälsi [2-(1,3-dioksan-2-yyli)-etyyli]trifenyylifosfoniumbromidia (9,9 g, 22,4 mmol; Aldrich Chemical Co.) THF:ssa (50 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin butyylilitiumia (1,6 mol/l heksaanissa; 14,0 ml, 22,4 mmol) ja tulokseksi saatua punaista liuosta sekoitettiin 0,5 h lämpötilassa 0 °C. Tähän liuokseen lisättiin 3-pyridiinikarboksaldehydiä (1,8 ml, 18,7 mmol; Aldrich Chemical Co.), reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1,5 h ja sen jälkeen se kaadettiin veteen ja suoritettiin partitio eetterin avulla. Yhdistetyt eetteriuuttoliuokset kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin. Flashkromatografia (eluointi heksaani-etyyliasetaattiseoksella, 2:1) tuotti tulokseksi 3,3 g alkeenia 63 olefiini-isomeerien seoksena. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**1-(1,3-dioksan-2-yyli)-3-(3-pyridyyli)propaani(64)**

Liuoksen läpi, joka sisälsi olefiinia 63 (3,2 g, 16,7 mmol) ja 10 % palladiumia hiilellä sisältävää katalyyttiä (300 mg), johdettiin tasainen vetykaasuvirta 10 minuutin ajan. Sen jälkeen reaktioseos suodatettiin piimaan läpi ja väkevöitiin, jolloin saatiin 2,8 g asetaalia 64 värittömänä öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**4-(3-pyridyyli)butyraldehydi (65)**

Liuosta, joka sisälsi asetaalia 64 (1,5 g, 7,8 mmol) THF:ssa (10,0 ml) ja 4 N HCl:ssa (10,0 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja sitten se neutraloitiin lisäämällä hitaasti kiinteätä $NaHCO_3$:a. Reaktioseos uutettiin etyyliasetaatilla, kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin, jolloin saatiin 1,1 g aldehydiä 65. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(3-pyridyyli)-4-heptanoli (66)**

Alkoholi 66 valmistettiin aldehydistä 65 (1,1 g, 7,4 mmol) ja yhdisteestä 27 (8,1 ml, 8,1 mmol) THF:ssa (30,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 28 valmistamiseksi, jolloin saatiin 1,9 g puhdistamatonta alkoholia 66. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-Boc-pipekolyyli-(R ja S)-1-fenyyli-7-(3-pyridyyli)-4-heptyyliesteri (67)**

Esteri 67 valmistettiin alkoholista 66 (1,65 g, 6,12 mmol), (S)-Boc-pipekoliinihaposta (1,54 g, 6,73 mmol), EDC:stä (1,29 g, 6,73 mmol) ja katalyyttisestä määrästä DMAP:tä $CH_2Cl_2$:ssa (8,0 ml) ja DMF:ssa (8,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 29 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi heksaani-etyyliasetaattiseoksella, 2:1) tuotti tulokseksi 1,42 g diastereomeerista esteriä 67 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(3-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-pipekolaatti (68)**

Amiini 68 valmistettiin käsittelemällä esteri 67 (1,42 g, 2,95 mmol) trifluorietikkahapolla (2,0 ml) $CH_2Cl_2$:ssa (8,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 30 valmistamiseksi, jolloin saatiin 1,02 g diastereomeerista amiinia (68) öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(3-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti (9)**

Esteri 9 valmistettiin amiinista 68 (995 mg, 2,61 mmol), haposta 31 (645 mg, 2,87 mmol) ja EDC:stä (551 mg, 2,87 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (6,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 esterin 3 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi asetoni-heksaaniseoksella, 3:1) tuot-

ti tulokseksi 976 g diastereomeerista amidia 9 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-(3-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti-N-oksidi (22)**

Liuokseen, joka sisälsi amidia 9 (15 mg, 0,02 mmol) $CH_2Cl_2$:ssa (2,0 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin 55-%:ista 3-klooriperoksibentsoehappoa (9,3 µl, 0,03 mmol) ja tulokseksi saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Flash-kromatografia (eluointi 100-%:isella asetonilla) tuotti tulokseksi N-oksidia 22 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8,10 (m), 7,46 - 7,02 (m), 5,88 (d), 5,80 (d), 5,06 - 5,00 (m), 4,95 - 4,89 (m), 4,61 (m), 4,31 (dd), 3,87 (s), 3,84 (s), 3,83 (s), 3,81 (s), 3,78 (s), 3,50 (leveä d), 3,27 (ddd), 3,12 (ddd), 3,00 (ddd), 2,67 - 2,49 (m), 2,32 (leveä d), 1,86 - 1,78 (m), 1,55 - 1,50 (m), 1,39 - 1,22 (m).

**Esimerkki 9**

**(R ja S)-1-fenyyli-7-purinyyli-4-heptyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatin (25) valmistus**

**4-klooributyraldehydi (69)**

Liuokseen, joka sisälsi 4-kloori-1-butanolia (19,1 g, 0,15 mmol; Aldrich Chemical Co.) $CH_2Cl_2$:ssa (50 ml) ja jonka lämpötila oli 0 °C, lisättiin jauhettuja 0,4 nm:n (4 Å) molekyyliseuloja (1,0 g) ja pyridiniumdikromaattia (38,7 g, 0,18 mmol) ja tulokseksi saatua suspensiota sekoitettiin 45 min lämpötilassa 0 °C. Reaktioseos laimennettiin eetterillä, suodatettiin piimaan läpi ja väkevöitiin. Jäännös tislattiin alipaineessa (kp. 45 - 55 °C), jolloin saatiin 5,0 g aldehydiä 69 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-kloori-7-fenyyli-4-heptanoli (70)**

Alkoholi 70 valmistettiin aldehydistä 69 (182 mg, 1,7 mmol) ja yhdisteestä 27 (1,9 ml, 1,9 mmol) THF:ssa

(20,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 28 valmistamiseksi, jolloin saatiin 128 mg puhdistamatonta alkoholia 70. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-Boc-pipekolyyli-(R ja S)-1-kloori-7-fenyyli-4-heptyyliesteri (71)**

Esteri 71 valmistettiin alkoholista 70 (128 mg, 0,56 mmol), (S)-Boc-pipekoliinihaposta (156 mg, 0,68 mmol), EDC:stä (130 mg, 0,68 mmol) ja katalyyttisestä määrästä 4-pyrrolidinopyridiiniä $CH_2Cl_2$:ssa (2,0 ml) tavalla, joka esitettiin edellä esimerkissä 1 yhdisteen 29 valmistamiseksi. Flash-kromatografia (eluointi eetteri-dikloorimetaani-heksaaniseoksella, 1:5:14) tuotti tulokseksi 159 mg diastereomeerista esteriä 71. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(S)-Boc-pipekolyyli-(R ja S)-1-fenyyli-7-purinyyli-4-heptyyliesteri (72)**

Liuokseen, joka sisälsi puriinia (34 mg, 0,28 mmol) DMF:ssa (3,0 ml) ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin kiinteätä NaH:ä (8,4 mg, 0,28 mmol; 80 % mineraaliöljyssä) ja tulokseksi saatua liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 10 min. Tähän reaktioseokseen lisättiin kloridia 71 (62 mg, 0,14 mmol) ja NaI:a (10 mg), ja tätä seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli ja sitten se haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin, pestiin perätysten vedellä kylläisellä $NaHCO_3$:lla ja kylläisellä NaCl:lla ja sen jälkeen kuivattiin $MgSO_4$:lla ja väkevöitiin. Flash-kromatografia (eluointi $NH_4OH$-MeOH-$CH_2Cl_2$-seoksella 5:10:85) tuotti tulokseksi 56 mg substituoitua puriinia 72 öljynä. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-purinyyli-4-heptyyli-(S)-pipekolaatin hydrokloridisuola (73)**

Liuoksen sisään, joka sisälsi esteriä 72 (53,7 mg, 0,10 mmol) EtOAc:ssa (10 ml) ja jonka lämpötila oli

-20 °C, puhallettiin vedetöntä HCl:a 10 min ja sen jälkeen reaktioseoksesta poistettiin kaasu $N_2$:llä. Väkevöinti tuotti tulokseksi puhdistamatonta amiinia 73 hydrokloridisuolana. $^1$H-NMR-spektri vastasi rakennetta.

**(R ja S)-1-fenyyli-7-purinyyli-4-heptyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti (25)**

Lietteeseen, joka sisälsi puhdistamatonta amiinihydrokloridia 73 $CH_3CN$:ssä ja jota pidettiin huoneenlämpötilassa, lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiinia (45 µl, 0,26 mmol), happoa 31 (37 mg, 0,15 mmol) ja BOP-reagenssia (54 g, 0,12 mmol), tulokseksi saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 vuorokautta ja sitten se haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (75 ml), pestiin sitten perätysten vedellä, 5-%:isella $KHSO_4$:llä, kylläisellä $NaHCO_3$:llä ja kylläisellä NaCl:lla ja sen jälkeen kuivattiin $MgSO_4$:llä ja väkevöitiin. Flashkromatografia (eluointi MeOH-$Et_2O$-$CH_2Cl$-seoksella, 1:4:36) tuotti tulokseksi 26,5 mg diastereomeerista amidia 25 rotameerien seoksena. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9,11 (s), 8,95 (m), 8,09 (m), 7,36 - 7,05 (m), 5,31 (m), 4,28 (m), 3,90 (m), 3,47 (leveä t), 3,20 (m), 2,58 (m), 2,28 (leveä d), 2,17 - 1,18 (m). $R_f$ = 0,1 (30 % eetteriä sisältävä dikloorimetaani).

**Testejä koskeva diskussio**

**Solujen lähde ja soluviljelmä**

LeukoPak-soluista tai kokoverestä, joka on peräisin satunnaiselta normaalilta verenluovuttajalta (testin mukaan HIV-negatiivinen ja hepatiittinegatiivinen), saatavat tuoreet ääreisveren lymfosyytit (PBL:t) eristetään ja erotetaan tiheyssentrifugoimalla Histopaque 1077 -laitteella (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Hiiren sytotoksinen T-solulinja, CTLL, ja ihmisen Jurkat T-solulinja ovat peräisin ATCC:ltä (CTLL-2 ATCC TIB214, Jurkat Clone E6-1 ATCC TIB152). Ihmiset allogeeniset B-solulinjat, joita

käytetään tuoreiden PBL:ien aktivointiin, ovat EBV-transformoituja lymfosyyttejä, jotka ovat peräisin normaaleilta terveiltä aikuisilta luovuttajilta ja jotka edustavat kahta täysin erilaista HLA-haplotyyppiä. Kaikista solulinjoista testattiin rutiininomaisesti mykoplasmakontaminaation esiintyminen Gibco Mycotect -testausvälineistöä käyttäen, ja ne ovat mykoplasmattomia. Elatusalusta koostuu RPMI 1640:stä (Gibco, Grand Island, NY), joka sisältää penisilliiniä (50 ky/ml) ja streptomysiiniä (50 µg/ml), L-glutamiinia (2 mmol/l), 2-merkaptoetanolia ($5 \cdot 10^{-5}$), lämmöllä inaktivoitua FCS:ää (10 %) ja HEPES:ä (10 mmol/l).

**Yhdisteiden liuokset ja titraukset**

Kaikki kemialliset raaka-aineet liuotettiin DMSO:iin. Yhdisteiden titraukset tehtiin siihen väliaineeseen, jossa kukin eri testi toteutettiin, ts. täydelliseen RPMI:hin tai HB 104:ään lopullisten laimennettujen pitoisuuksien saavuttamiseksi, käyttämällä hyväksi useaan kertaan tehtyjä kolminkertaisia laimennuksia 1 µM tai 10 µM varastoliuoksista.

**MTT-testi**

MTT-testi on kolorimetrinen menettely yhdisteiden myrkyllisyyden kasvavalle imusolu- ja ei-imusolulinjalle määrittämiseksi, joka menettely perustuu tetratsoliumsuolan pelkistymiseen intaktien mitokondrioiden vaikutuksesta [T. Mossman, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55]. Solujen elävyys testattavien yhdisteiden ollessa läsnä seerumittomassa väliaineessa (HB 104, HANA Biologic, Inc.) erilaisina pitoisuuksina tai puuttuessa siitä määritettiin NTT:tä [3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi] käyttäen. 4 tuntia ennen 3-vuorokautisen myrkyllisyystestiviljelyjakson päättymistä kuhunkin mikromaljan syvennykseen lisättiin 20 µl MTT-väriä (5 mg/ml PBS:ssä, pH 7,2). Inkubointiajan päättyessä suurin osa elatusalustasta poistettiin kustakin syvennyksestä varovasti aspiraation avulla. Sen jälkeen lisättiin 100 µl

hapotettua isopropyylialkoholia (0,04 N HCl) värin liuottamiseksi ja luetaan optinen tiheys aallonpituudella 570 nm, josta vähennetään OD aallonpituudella 630 nm (Molecular Devices Thermomax -maljalukulaite ja Softmax-tietokoneohjelma, Menlo Park, CA). Tuloksia verrattiin vertailunäytteiden (väliaine ilman lääkeaineita) keskimääräiseen OD:hen ja laskettiin annokset, jotka aiheuttavat 50-%:isen myrkyllisyyden ($TC_{50}$).

**Mitogeneesitestit ("PMA" ja OKT3)**

Testiyhdisteiden inhiboiva vaikutus ihmisen PBL:ien proliferoimiseen reaktiona mitogeeneihin (W. K. Waithe ja K. Hirschhorn, Handbook of Experimental Immunology, 3. painos, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1978; B. Mishell ja S. M. Shiigi, Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA 1980) määritettiin stimuloimalla soluja ($5 \cdot 10^5$) $OKT^3$:lla (lopullinen laimennus $10^{-4}$) tai PMA:lla (10 ng/ml) ja ionomysiinillä (250 ng/ml) testattavien yhdisteiden ja vertailulääkeaineiden (CsA, FK-506, pagamysiini) ollessa läsnä erilaisina pitoisuuksina tai puuttuessa, jolloin lopullinen tilavuusmäärä oli 200 µl/syvennys 96-syvennyksisellä pyöreäpohjaisilla maljoilla. 48 tunnin inkuboinnin jälkeen (37 °C, 5 % $CO_2$) solut pulssitettiin [$^3$H]tymidiinillä (1 µCi) ja kerättiin 24 tuntia myöhemmin Tom Tek -solunkeräimellä, ja niille tehtiin laskenta LKB-ß-tuikelaskurilla. Tuloksia ($min^{-1}$) verrattiin vertailunäytteisiin, jotka sisälsivät pelkkää väliainetta, ja laskettiin pitoisuudet, jotka saivat lukemat pienenemään 50 % ($IC_{50}$).

**MLR-biotestit ("LB" ja "JVM")**

Antigeenin aktivoima PBL:ien proliferaatio primaarisessa sekalymfosyyttireaktiossa määritettiin testattavien yhdisteiden ja vertailulääkeaineiden ollessa läsnä erilaisina pitoisuuksina tai puuttuessa. Tuoreita PBL:iä ($5 \cdot 10^4$) stimuloitiin mitomysiini C:llä käsitellyillä allogeenisilla EBV-transformoiduilla ß-lymfoblastoidisoluilla

($5 \cdot 10^3$), LB ja LVM, lopullisen tilavuusmäärän ollessa 200 µl/syvennys 96-syvennyksisellä pyöreäpohjaisilla maljoilla [B. Mishell ja S. M. Shiigi, Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA 1980; P. A. Nelson *et al.*, Transplantation 50 (1990) 286]. Viljelmät pulssitettiin päivänä 6 ja kerättiin 24 tuntia myöhemmin, ja niille tehtiin laskenta samalla tavalla kuin edellisessä osassa.

**IL-2-mikrotesti ("CTLL")**

Sen määrittämiseksi, inhiboivatko testiyhdisteet myöhempää sytokiinin hyväksikäytön aiheuttamaa T-solujen aktivoitumisprosessia, selvitettiin IL-2-riippuvaisen hiiren T-solulinjan CTLL-20 (ATCC) proliferaatiovaste [S. Gillis *et al.*, J. Immunology 120 (1978) 2027]. CsA ja FK-506 inhiboivat aktivoitujen T-solujen aiheuttamaa IL-2:n tuotantoa, kun taas rapamysiini häiritsee IL-2:n hyväksikäyttöä. Rapamysiini inhiboi siten IL-2-riippuvaista CTLL:ien proliferaatiota ja CsA sekä FK-506 eivät inhiboi (F. J. Dumont *et al.*, J. Immunology 144 (1990) 251]. CTLL:t ($3 \cdot 10^3$) asetettiin 24 tunniksi alttiiksi testattavien yhdisteiden ja vertailulääkeaineiden erilaisille pitoisuuksille ihmisen rekombinaatio-IL-2:n (Genzyme, rIL-2, 1 ky/ml) ollessa läsnä. 4 tunnin kuluttua lääkeaineiden lisäyksestä solut pulssitettiin [$^3$H]tymidiinillä, niitä inkuboitiin vielä 20 h lisää (37 °C, 5 % $CO_2$), sen jälkeen ne kerättiin ja niille tehtiin laskenta edellä kuvatulla tavalla.

**Hyötyosuus**

Yhdisteen 20 hyötyosuus määritettiin rotilla. Kerta-annos 50 mg/kg annettiin suun kautta letkulla tai vatsaontelon sisäisenä (i.p.) ruiskeena väliaineessa, joka koostui 10 % etanolia sisältävästä oliiviöljystä. Eläimiä lopetettiin sitten 0,5, 1, 2, 4, 8 ja 12 tunnin kuluttua, veri kerättiin natriumhepariiniin ja se pakastettiin välittömästi. Kokoveri erotettiin asetonitriili-metanoli-

seoksella (tilavuussuhde 90:10) ja yhdisteen pitoisuus millilitraa kohden verta määritettiin HPLC:n avulla. Tiedot osoittavat, että antaminen i.p. antoi tulokseksi pitoisuudet 0,07 µmol/l, 22 µmol/l, 225 µmol/l, 45 µmol/l ja 1 µmol/l veressä 0,05 tunnin, 1 tunnin, 2 tunnin, 4 tunnin, 8 tunnin ja 12 tunnin kohdalla, tässä järjestyksessä.

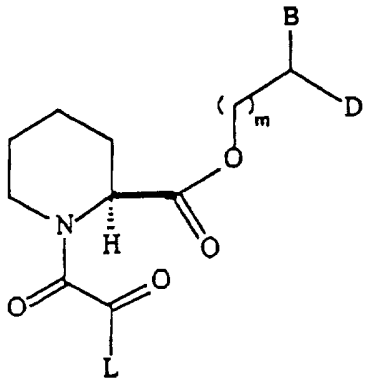
I.p. antamisen jälkeen veressä saavutetut tasot ovat osoitus vatsaontelosta verenkiertoon tapahtuneesta imeytymisestä bioaktiivinen rakenne säilyttäen. Saavutetut tasot veressä ovat riittäviä immunosuppression aikaansaamiseksi.

**Vastineet**

Ammattimiehet tuntevat tai kykenevät saamaan selville, pelkästään rutiinikokeita käyttäen, monia keksinnön tässä kuvattujen erikoissuoritusmuotojen vastineita. Sellaisten vastineiden on tarkoitus kuulua seuraavien patenttivaatimusten piiriin:

**Patenttivaatimukset**

1. Menetelmä immunosuppressiivisen yhdisteen valmistamiseksi, jolla on kaava



(I)

jossa

B on Ar, $C_{5-7}$-sykloalkyylisubstituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{1-6}$-alkyyliryhmä, $C_{5-7}$-sykloalkyylisubstituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{2-6}$-alkenyyliryhmä, $C_{5-7}$-sykloalkenyylisubstituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{1-6}$-alkyyliryhmä, $C_{5-7}$-sykloalkenyylisubstituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{2-6}$-alkenyyliryhmä, Ar-substituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{1-6}$-alkyyliryhmä tai Ar-substituoitu, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{2-6}$-alkenyyliryhmä, jolloin

Ar on fenyyli, 2-tienyyli, 3-tienyyli, 2-pyridyyli, 3-pyridyyli, 4-pyridyyli, N-purinyyli, 3-pyridyyli-N-oksidi, bentsimidatsolyyli tai 7-atsaindolyyli, ja Ar voi sisältää 1 - 3 substituenttia, joka on itsenäisesti halogeeni, hydroksimetyyli, hydroksyyli, nitro, suoraketjuinen tai haarautunut O-$C_{1-4}$-alkyyli, suoraketjuinen tai haarautunut O-$C_{2-4}$-alkenyyli, O-bentsyyli, O-fenyyli, amino, karboksyyli tai fenyyli;

D on fenyylisubstituoitu $C_{1-6}$-alkyyli, fenoksisubstituoitu fenyyli tai metoksifenyyli;

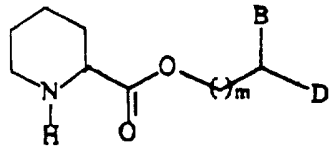
L on suoraketjuinen tai haarautunut $C_{1-6}$-alkyyli, suoraketjuinen tai haarautunut $C_{2-6}$-alkenyyli, $C_{5-7}$-sykloal-

kyyli, O-bentsyyli tai fenyyli, joka on mahdollisesti substituoitu suoraketjuisella tai haarautuneella O-$C_{1-6}$-alkyylillä tai suoraketjuisella tai haarautuneella O-$C_{2-6}$-alkenyylillä, ja

m on 0 tai 1;

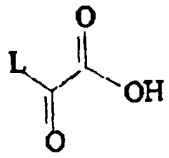
jolloin stereokemia asemissa 1 ja 2 on toisistaan riippumattomasti R tai S, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(a) vapaa aminoryhmä aminoesterissä, jolla on kaava



(XIII)

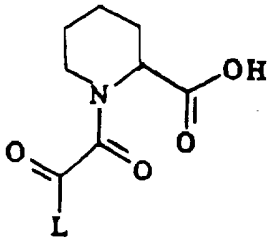
jossa B, D ja n ovat edellä määriteltyjä, asyloidaan yhdisteellä, jolla on kaava



(XIV)

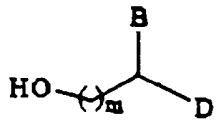
jossa L on edellä määritelty, tai sen aktivoidulla johdannaisella, tai

(b) karboksyylihappo, jolla on kaava



(A)

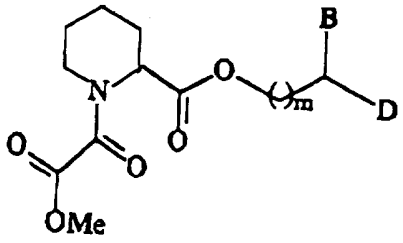
jossa L on edellä määritelty, saatetaan reagoimaan alkoholin kanssa, jolla on kaava



(B)

jossa B, D ja m ovat edellä määriteltyjä, tai

(c) pipekolaattijohdannainen, jolla on kaava



(C)

jossa B, D ja m ovat edellä määriteltyjä, saatetaan reagoimaan litiumsuolan kanssa, jolla on kaava

$L^-Li^+$

jossa L on edellä määritelty,

minkä jälkeen haluttaessa muutetaan saatu yhdiste farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolakseen.

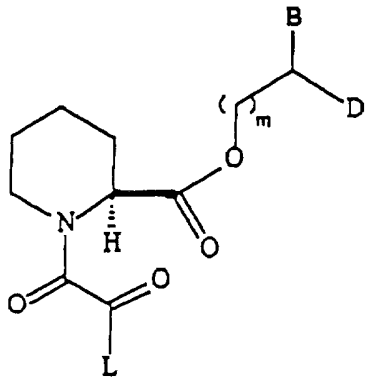
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan (S)-1,7-difenyyli-4-heptyyli-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan (R- ja S)-6-fenyyli-1-(3-pyridyyli)-3-heksyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan (R ja S)-1-fenyyli-7-(3-pyridyyli)-4-heptyyli-(S)-N-(3,4,5-trimetoksifenyyliglyoksyyli)pipekolaatti.

**Patentkrav**

1. Förfarande för framställning av en immunoundertryckande förening med formeln




vari

B är Ar, en $C_{5-7}$-cykloalkylsubstituerad, rakkedjad eller förgrenad $C_{1-6}$-alkylgrupp, en $C_{5-7}$-cykloalkylsubstituerad, rakkedjad eller förgrenad $C_{2-6}$-alkenylgrupp, en $C_{5-7}$-cykloalkenylsubstituerad, rakkedjad eller förgrenad $C_{1-6}$-alkylgrupp, en $C_{5-7}$-cykloalkenylsubstituerad, rakkedjad eller förgrenad $C_{2-6}$-alkenylgrupp, en Ar-substituerad, rakkedjad eller förgrenad $C_{1-6}$-alkylgrupp eller en Ar-substituerad, rakkedjad eller förgrenad $C_{2-6}$-alkenylgrupp, varvid

Ar är fenyl, 2-tienyl, 3-tienyl, 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, N-purinyl, 3-pyridyl-N-oxid, bensimidazolyl eller 7-azaindolyl, och Ar kan innehålla 1 - 3 substituenter som självständigt är halogen, hydroximetyl, hydroxyl, nitro, en rakkedjad eller förgrenad O-$C_{1-4}$-alkyl, en rakkedjad eller förgrenad O-$C_{2-4}$-alkenylgrupp, O-bensyl, O-fenyl, amino, karboxyl eller fenyl;

D är en fenylsubstituerad $C_{1-6}$-alkyl, fenoxisubstituerad fenyl eller metoxifenyl;

L är en rakkedjad eller förgrenad $C_{1-6}$-alkyl, en rakkedjad eller förgrenad $C_{2-6}$-alkenyl, $C_{5-7}$-cykloalkyl, O-bensyl eller fenyl som är eventuellt substituerad med en

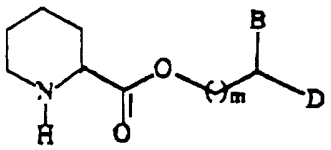
rakkedjad eller förgrenad O-$C_{1-6}$-alkyl eller en rakkedjad eller förgrenad O-$C_{2-6}$-alkenyl, och

m är 0 eller 1;

varvid stereokemin i positioner 1 är 2 är oberoende av varandra R eller S, eller för framställning av ett farmaceutiskt godtagbart salt därav,

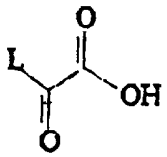
k ä n n e t e c k n a t av att

(a) den fria aminogruppen i en aminoester med formeln



(XIII)

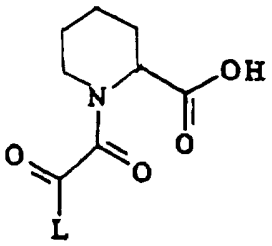
vari B, D och n är ovan definierade, acyleras med en förening med formeln



(XIV)

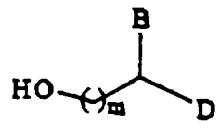
vari L är ovan definierad, eller med ett aktiverat derivat därav, eller

(b) en karboxylsyra med formeln



(A)

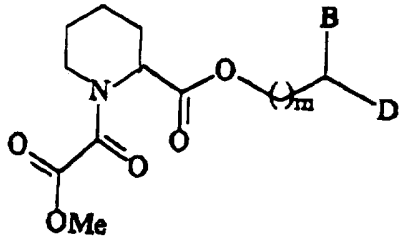
vari L är ovan definierad, bringas att reagera med en alkohol med formeln



(B)

vari B, D och n är ovan definierade, eller

(c) ett pipekolatderivat med formeln



(C)

vari B, D och n är ovan definierade, bringas att reagera med ett litiumsalt med formeln

$L^-Li^+$

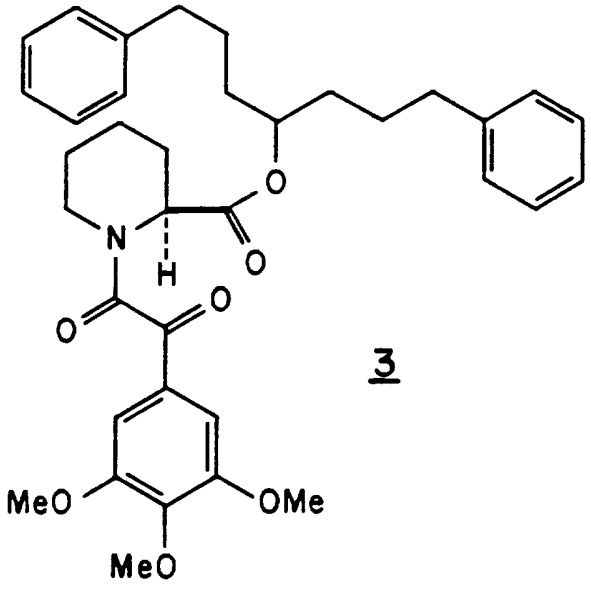
vari L är ovan definierad,

varefter om så önskas omvandlas den erhållna föreningen till sitt farmaceutiskt godtagbart salt.

2. Förfarande för enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att (S)-1,7-difenyl-4-heptyl-N-(3,4,5-trimetoxifenylglyoxyl)pipekolat framställs.

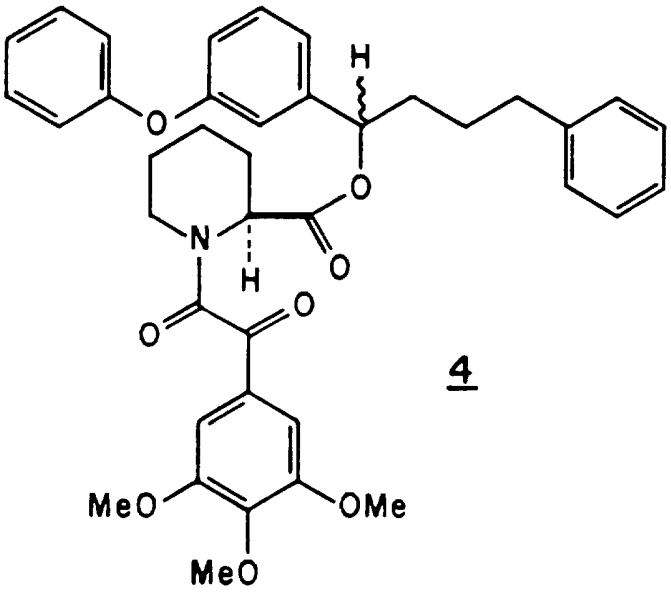
3. Förfarande för enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att (R- och S)-6-fenyl-1-(3-pyridyl)-3-hexyl-(S)-N-(3,4,5-trimetoxifenylglyoxyl)pipekolat framställs.

4. Förfarande för enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att (R och S)-1-fenyl-7-(3-pyridyl)-4-heptyl-(S)-N-(3,4,5-trimetoxifenylglyoxyl)pipekolat.



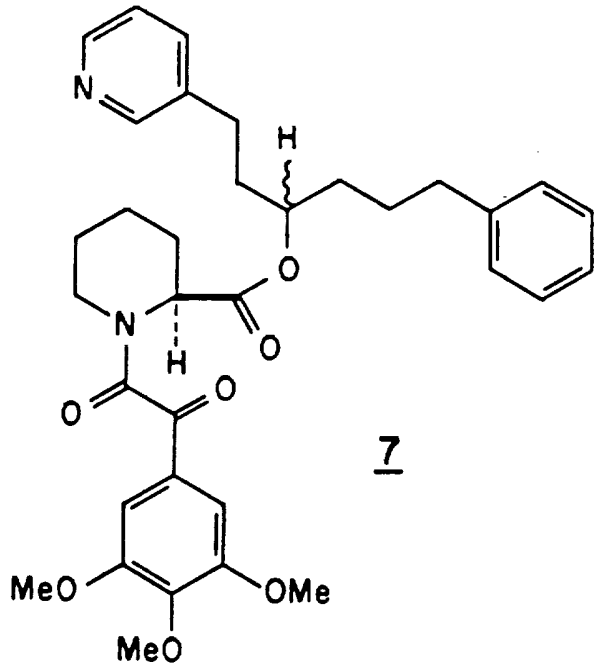

3

FIG. IA



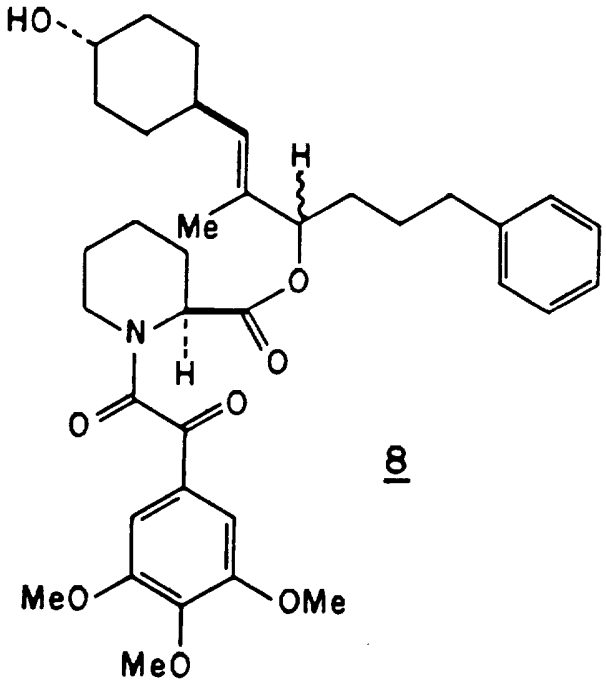

4

FIG. IB



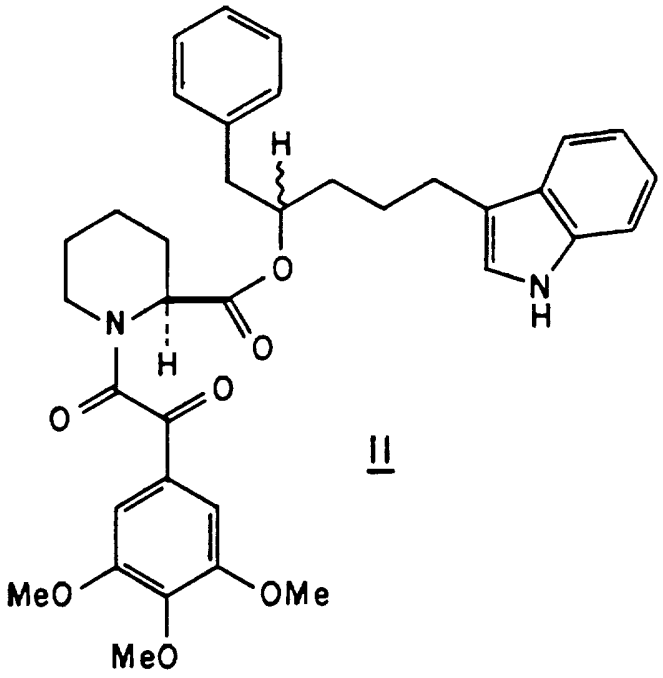

7

FIG. IC



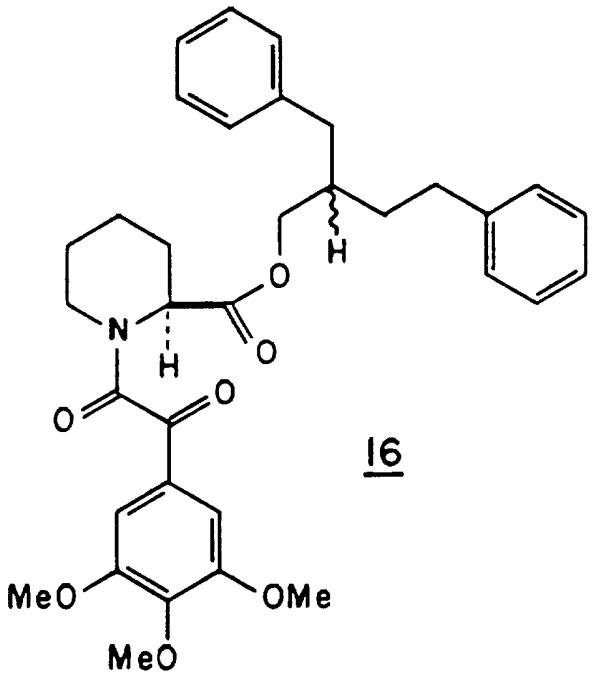

8

FIG. ID



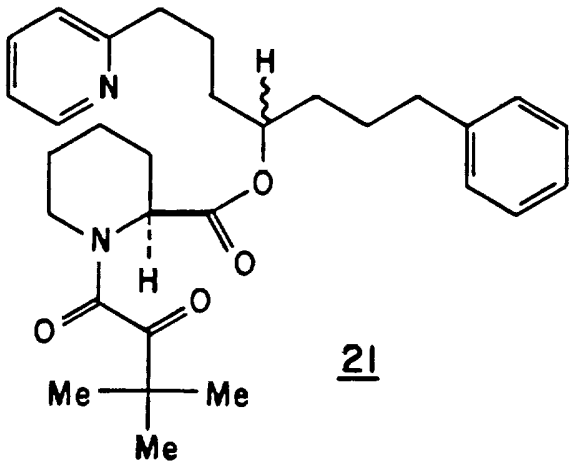

II

FIG. 1E



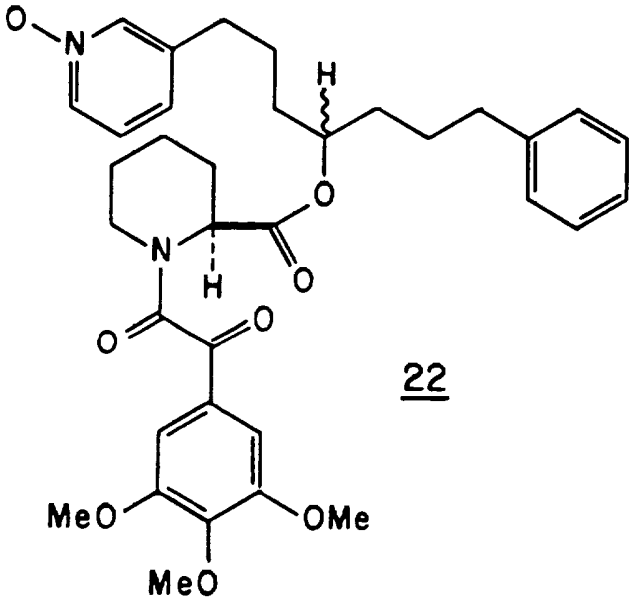

16

FIG. 1F



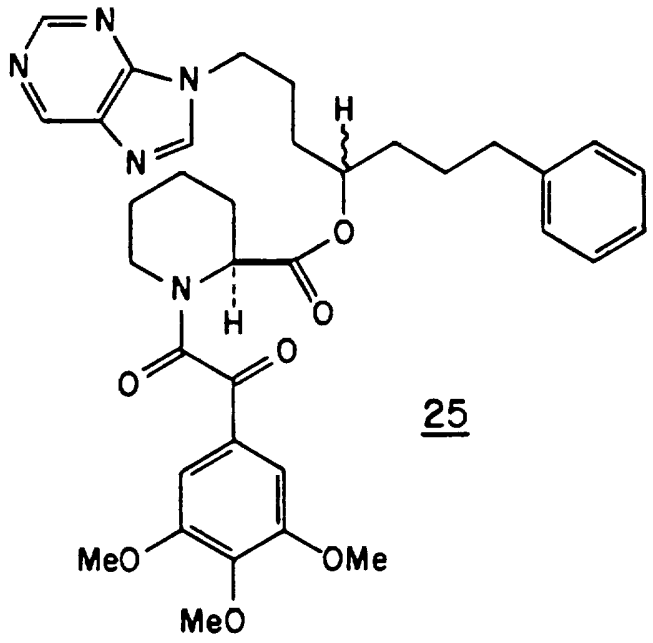

21

FIG. IG




22

FIG. IH




25

FIG. II