

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 915518 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 915518

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07D413/12
C07D417/12

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 22.11.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 22.11.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 25.05.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

24.11.1990 DE 4037427

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Kali-Chemie Pharma GmbH, Hans-Böckler-Allee 20, 3000 Hannover, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Jasserand, Daniel, France, RANSKA, (FR)

2 •Floc'h, Francois, France, RANSKA, (FR)

3 •White, Richard, France, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä lääkinnallisesti vaikuttavien heterosyklisesti substituoitujen piperatsinoalkyylibentsoksatsiini- ja -tiatsiiniyhdisteiden valmistamiseksi

Förfarande för framställning av heterocykliskt substituerade piperazinoalkylbensoxazin- och -tiazinföreningar med läkemedelsverkan

Heterosyklisesti substituoituneet piperatsinoalkyylibentsoksatsiini- ja -tiatsiiniyhdisteet, menetelmät niiden valmistamiseksi sekä näitä yhdisteitä sisältävät lääkkeet

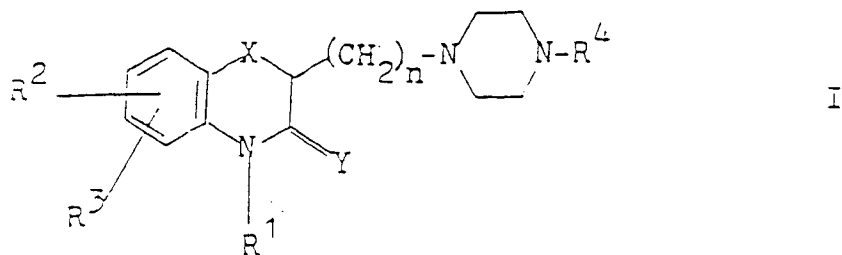
Oheisen keksinnön kohteena ovat uudet, 2-asemassaan heterosyklillä substituoituneen piperatsinoalkyylijäännöksen käsittävät bentsoksatsiini- ja bentsotiatsin-3-oni-johdannaiset ja vastaavat 3-tioni-johdannaiset ja niiden suolat sekä näitä yhdisteitä sisältävät farmaseuttiset valmisteet sekä menetelmät näiden yhdisteiden valmistamiseksi.

Eurooppalaisen patenttihakemuksen, jonka julkaisunumero on 0 233 728, perusteella tunnetaan 1,4-bentsoksatsin-3-oni-johdannaiset, joiden 2-asemassa on fenyylipiperatsinoalkyylijäännös. Näillä yhdisteillä on selvää verenpainetta alentavaa ja verisuonia laajentavaa vaikutusta.

Oheinen keksintö perustuu tehtävään kehittää uusia, allergialääkkeiksi sopivia farmaseuttisia vaikuteaineita. Edelleen, keksintö perustuu tehtävään valmistaa uusia bentsoksatsiini-johdannaisia, joilla on arvokkaita farmakologisia ominaisuuksia.

Oheisen keksinnön puitteissa todettiin, että keksinnön mukaisilla, heterosyklisesti substituoituneilla yhdisteillä on arvokkaita farmakologisia ominaisuuksia ja tulehdusta ja allergiaa torjuvia vaikutuksia, niiden vaikutusprofiilin ollessa edullinen, toksisuuden ollessa pieni ja siedettävyyden ollessa hyvä. Vaikutusprofiilinsa ansiosta keksinnön mukaisia aineita voidaan käyttää tulehduksia vastaan vaikuttavana vaikuteaineena sekä allergialääkkeenä tulehdus- ja allergiasairauksia hoidettaessa.

Näin ollen oheisen keksinnön kohteena ovat uudet yhdisteet, joilla on yleinen kaava I



missä

X tarkoittaa happea tai rikkiä,

Y tarkoittaa happea tai rikkiä,

R¹ tarkoittaa vetyä tai alempaa alkyyliä,

R² tarkoittaa vetyä, alempaa alkyyliä, halogeenia, alempaa alkoksia, hydroksia, nitroa tai trifluorimetyyliä ja

R³ tarkoittaa vetyä, alempaa alkyyliä, halogeenia tai alempaa alkoksia, tai

R² ja R³ ovat sitoutuneet vierekkäisiin hiiliatomeihin ja ne tarkoittavat yhdessä 1-2 hiiliatomia käsittävää alkyleeni-dioksiryhmää,

n tarkoittaa kokonaislukua 0-4 ja

R⁴ tarkoittaa 6-jäsenistä tyydyttymätöntä heterosykliä, jossa on 1 tai 2 piperatsiinirenkaseen epäsuorasti sitoutunutta typpiä, joka heterosykli voi mahdollisesti olla substituoitunut yhdellä tai kahdella hiiliatomilla sitoutuneella, alemman alkyylin, alemman alkoksin ja halogeenin joukosta valitulla substituentilla,

sekä niiden fysiologisesti siedetyt happoadditiosuolat.

Mikäli kaavan I mukaisissa yhdisteissä substituentit R² ja R³ sekä jäännöksen R⁴ substituentit tarkoittavat tai sisältävät alempia alkyyliä, nämä alemmat alkyyliä voivat olla suora- tai haaraketjuisia ja käsittää erityisesti 1-4, edullisesti 1-2 hiiliatomia, niiden ollessa erityisesti metyyli tai metoksi. Mikäli nämä substituentit ovat halogeenia, niin kyseeseen tulevat erityisesti fluori, kloori tai bromi, edullisesti kloori. Rengasrakenteen bentseenirengas voi olla taroituksenmukaisesti substituoitumaton. Mikäli bentseenirengas

on substituoitunut yhdellä substituentilla R^2 tai myöskin kahdella substituentilla R^2 ja R^3 , niin tällöin sopivia substituentteja ovat erityisesti alemmat alkyylisubstituentit, esimerkiksi metyyliisubstituentit.

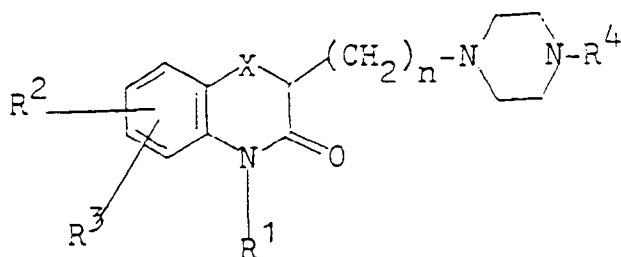
Substituentti R^1 tarkoittaa tarkoituksenmukaisesti vetyä. Mikäli R^1 tarkoittaa alempaa alkyylia, se voi olla suora- tai haaraketjuinen ja se voi sisältää 1-4, erityisesti 1-2 hiiliatomia.

Kaavan I mukaisissa yhdisteissä n tarkoittaa lukuja 0-4. Edulliseksi on osoittautunut erityisesti 3- tai 4-jäseninen alkyleeniketju.

Substituentti R^4 voi tarkoittaa tyydyttymätöntä, yhden tai kaksi typpiatomia sisältävää heterosykliä, esimerkiksi heteroaryyliryhmää. Sopivia jäännöksiä R^4 ovat esimerkiksi pyridyyli-, pyrimidinyyli-, pyratsinyyli- tai pyridatsinyylijäännökset, erityisesti pyridyylijäännökset. Mikäli R^4 tarkoittaa pyridyyliiryhmää, niin tällöin tulee edullisesti kyseeseen pyrid-2-yyliiryhmä, joka voi myös mahdollisesti olla substituoitunut. Sopivia ovat esimerkiksi alemmalla alkyylillä, erityisesti metyyllillä substituoitunut tai substituoitumaton pyridyylijäännös. Erityisen edulliseksi on osoittautunut 4-metyylipyrid-2-yyli-jäännös.

Keksinnön mukaisesti näitä uusia, kaavan I mukaisia yhdisteitä sekä niiden happoadditiosuoloja saadaan siten, että tunnetulla tavalla

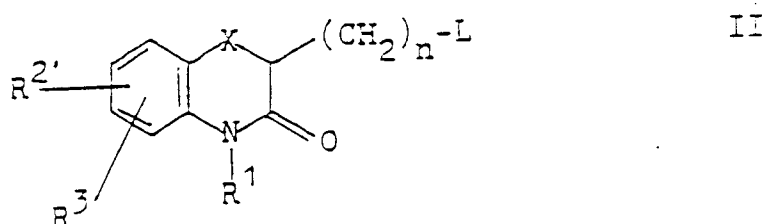
a) yleisen kaavan Ia



Ia

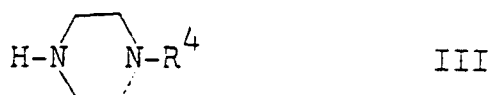
missä X , R^1 , R^2 , R^3 , n ja R^4 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia,

mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi yleisen kaavan II



missä X , R^1 , R^3 ja n ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia ja symbolilla $R^{2'}$ on sama merkitys kuin symbolilla R^2 kuitenkin siten, että hydroksiryhmä on suojattu myöhemmin irroitettavalla suojaavalla ryhmällä, ja L tarkoittaa amino-
lyyttisesti irtoavaa jäännöstä, erityisesti halogeenia,

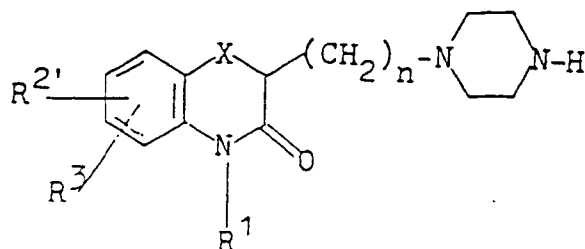
mukaiset yhdisteet saatetaan reagoimaan yleisen kaavan III



missä R^4 on edellä esitetyn määritelmän mukainen,

mukaisten piperatsiinijohdannaisten kanssa, tai

b) yleisen kaavan IV



missä X , R^1 , $R^{2'}$, R^3 ja n ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia,

mukaiset yhdisteet saatetaan reagoimaan yleisen kaavan V

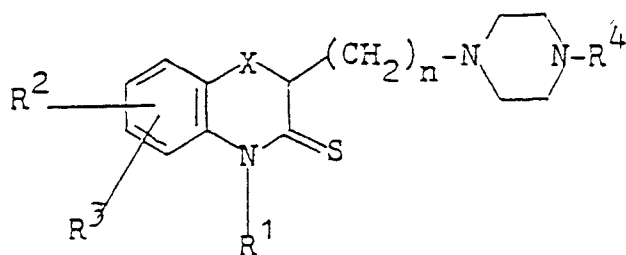


V

missä R^4 on edellä esitetyn määritelmän mukainen ja L' tarkoittaa halogeenia,

mukaisten yhdisteiden kanssa, minkä jälkeen mahdollinen hydroksia suojaava ryhmä irroitetaan uudestaan, tai

c) yleisen kaavan Ia mukaiset yhdisteet muunnetaan yhdisteiksi, joilla on yleinen kaava Ib



Ib

o d r d →
4 b d r d

missä X , R^1 , R^2 , R^3 , n ja R^4 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia, ja

tämän jälkeen toivottaessa saadut, yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet, missä R^1 tarkoittaa vetyä, alkyloidaan sellaisiksi yleisen kaavan I mukaisiksi yhdisteiksi, joissa R^1 tarkoittaa alempaa alkyyliä, ja/tai saaduissa yleisen kaavan I mukaisissa yhdisteissä, joissa R^2 tarkoittaa metoksia, tämä metoksiryhmä pilkotaan hydroksiryhmäksi, ja toivottaessa vapaat, yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet muunnetaan happoadditiosuoloikseen tai tällaiset happoadditiosuolat muunnetaan vapaiksi, kaavan I mukaisiksi yhdisteiksi.

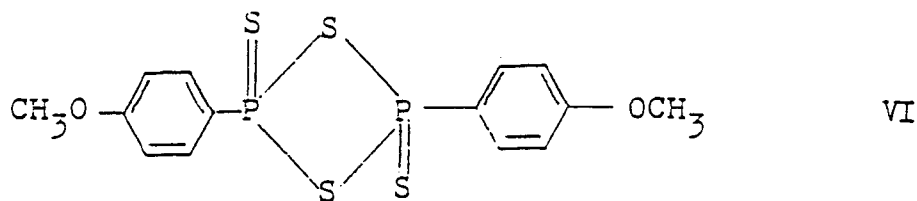
Kaavan II mukaisten yhdisteiden ja kaavan III mukaisten yhdisteiden välinen reaktio menetelmämuunnoksen a) mukaisesti voidaan toteuttaa sinänsä tavallisilla amiinien alkylointimenetelmillä.

Reaktio toteutetaan tarkoituksenmukaisesti reaktio-olosuhteissa inertissä orgaanisessa liuottimessa, emäksisissä olosuhteissa.

Kaavan II mukaisissa yhdisteissä läsnäoleviksi, aminolyyttisesti irtoaviksi jäännöksiksi L soveltuvat halogeenit kuten kloori, bromi tai jodi, edullisesti bromi tai kloori, tai myöskin asyylioksijäännös O-Z, missä Z tarkoittaa alempaa alkanoyylijäännöstä tai orgaanista sulfonihappojäännöstä, esimerkiksi alemman alkaanisulfonihapon, esimerkiksi metaanisulfonihapon jäännöstä tai aromaattisten sulfonihappojen kuten bentseenisulfonihapon jäännöstä tai alemmalla alkyylillä tai halogeenilla substituoituneita bentseenisulfonihappoja, esimerkiksi tolueenisulfonihappoja tai bromibentseenisulfonihappoja. Inerttinä orgaanisena liuottimena voidaan käyttää erityisesti aproottisia liuottimia, esimerkiksi aromaattisia hiilivetyjä, kuten tolueenia, ksyleeniä tai bentseeniä, sykliisiä eettereitä kuten dioksaania, dimetyyliformamidia tai alempia alkanoleja kuten etanolia tai edellä mainittujen liuottimien seoksia. Tarkoituksenmukaisesti toimitaan korotetuissa lämpötiloissa, esimerkiksi alueella 50-150 °C olevissa lämpötiloissa, edullisesti liuottimen kiehumislämpötilassa. Reaktio toteutetaan tarkoituksenmukaisesti lisäämällä siihen orgaanista tai epäorgaanista emästä. Siinä voidaan kuitenkin käyttää myös ylimäärin yhdistettä III, joka voi toimia sisäisenä emäksenä. Esimerkkeinä sopivista orgaanisista emäksistä ovat tertiääriset orgaaniset amiinit, erityisesti tertiääriset alemmat alkyyliamiinit kuten trietyyliamiini, tripropyyliamiinit, N-(alempi alkyyli)-morfoliinit tai N-(alempi alkyyli)-piperidiinit. Sopivia epäorgaanisia emäksiä ovat erityisesti alkali-metallikarbonaatit tai -bikarbonaatit. Reaktioaika voi vaihdella reaktio-olosuhteista riippuen 2 tunnista 8 tuntiin. Mahdollisten hydroksiryhmien R² suojaaviksi ryhmiksi voidaan valita sinänsä tunnetut eetterisuojarahmät, jotka irroitetaan uudestaan myöhemmin sinänsä tunnetulla tavalla solvolyyttisesti tai hydrogenolyyttisesti, ja joista esimerkkeinä voidaan mainita alemmat alkyyli- tai bentsyyli-ryhmät.

Kaavan IV mukaisten yhdisteiden ja kaavan V mukaisten yhdisteiden välinen reaktio menetelmämuunnoksen b) mukaisesti voidaan toteuttaa sinänsä tavallisilla amiinien alkylointimenetelmillä. Reaktio voidaan toteuttaa esimerkiksi tavalla, joka on kuvattu edellä kaavan II mukaisten yhdisteiden ja kaavan III mukaisten yhdisteiden välisen reaktion yhteydessä.

Kaavan Ia mukaisissa yhdisteissä läsnäolevan 3-oni-ryhmän muuntaminen kaavan Ib mukaisissa yhdisteissä läsnäolevaksi 3-tioni-ryhmäksi menetelmämuunnoksen c) mukaisesti voidaan toteuttaa menetelmillä, joita käytetään tavallisesti okso-yhdisteissä läsnäolevan hapen vaihtamiseksi rikkiin. Täten kaavan Ib mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi siten, että kaavan Ia mukaisia yhdisteitä käsitellään fosforipentasulfidilla (esim. P_4S_{10}), tai myöskin julkaisussa Lawesson et al., Bull. Soc. Chim. Belg., 87, 525-534 (1978), kuvatun menetelmän mukaisesti toteuttamalla reaktio kaavan VI mukaisen (Lawessonin reagenssina tunnetun) 2,4-bis(metoksifenyyli)-1,3-ditia-2,4-difosfetaani-2,4-disulfidin kanssa



Deoksosulfurointi toteutetaan tarkoituksenmukaisesti reaktio-oloissa inertissä orgaanisessa liuottimessa, esimerkiksi aromaattisessa hiilivedyssä kuten ksyleenissä tai tolueenissa, korotetuissa lämpötiloissa, esimerkiksi alueella 50-150 °C olevissa lämpötiloissa, tarkoituksenmukaisesti reaktioseoksen kiehumislämpötilassa. Päättäneen reaktion jälkeen sulfuroidut yhdisteet voidaan erottaa fosforijohdannaisista suodattamalla.

Saadut kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R^1 tarkoittaa vetyä, voidaan toivottaessa alkyloida jälkeinpäin sinänsä tunnetulla tavalla vastaaviksi N-alkyyliyhdisteiksi. Alkylointiaineena voidaan käyttää alkyylihalogenideja, erityisesti jodideja, alkyylisulfaatteja tai alkyylisulfonihappoestereitä. Tarkoituksenmukaisesti yhden amidi- tai tiamidiryhmittymän sisältävä, kaavan I mukainen yhdiste saatetaan ensin reagoimaan vahvan emäksen, esimerkiksi alkalimetyyllihydridin, -amidin tai -alkoholaatin kanssa inertissä polaarissa orgaanisessa liuottimessa, minkä jälkeen sen annetaan reagoida edelleen alkylointiaineen kanssa. Reaktio voidaan toteuttaa lämpötilassa, joka vaihtelee 0 °C:sta liuottimen kiehumislämpötilaan. Käytetystä emäksestä riippuen liuottimena voidaan käyttää dimetyyliformamidia tai syklisiä eettereitä kuten tetrahydrofuraania tai dioksaania, tai mikäli emäs on metallialkoholaatti, myös vastaavia alkoholeja. Täten reaktio voidaan toteuttaa esimerkiksi tarkoituksenmukaisesti dimetyyliformamidissa natriumhydridiä käyttäen.

Kaavan I mukaisissa yhdisteissä, missä R^2 tarkoittaa metoksia, tämä metoksiryhmä voidaan pilkkoa hydroksiryhmäksi sinänsä tunnetulla tavalla metoksiaryylieettereiden pilkkomiseen soveltuvia menetelmiä käyttäen. Tällainen eetterin pilkkominen voidaan toteuttaa esimerkiksi käsittelemällä jodivedyllä reaktio-olosuhteissa inertissä liuottimessa, esimerkiksi asetanhydridissä, tai joditrimetyylisilaanilla tai booritribromidilla.

Kaavan I mukaiset yhdisteet voidaan erottaa reaktioseoksesta ja puhdistaa sinänsä tunnetulla tavalla. Happoadditiosuolat voidaan muuntaa tavalliseen tapaan vapaiksi emäksiksi ja nämä vapaan emäkset voidaan toivottaessa muuntaa tunnetulla tavalla farmakologisesti siedettäviksi happoadditiosuoloiksi.

Kaavan I mukaisten yhdisteiden farmakologisesti hyväksyttäviä happoadditiosuoloja ovat esimerkiksi näiden yhdisteiden suolat epäorgaanisten happojen kuten halogeenivetyhappojen, erityi-

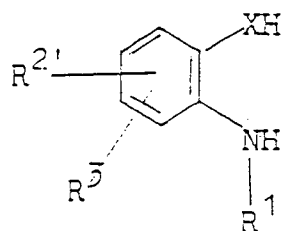
sesti kloorivetyhapon, rikkihapon tai fosforihappojen kanssa tai orgaanisten happojen, esimerkiksi alempien alifaattisten mono- tai dikarboksyylihappojen kuten maleiinihapon, fumaarihapon, maitohapon, viinihapon, tai etikkahapon kanssa tai sulfonihappojen, esimerkiksi alempien alkyylisulfonihappojen kuten metaanisulfonihapon kanssa, tai mahdollisesti bentseeni- renkaastaan halogeenilla tai alemmalla alkyylillä substituotuneiden bentseenisulfonihappojen kuten esimerkiksi p-tolueenisulfonihapon tai sykloheksyyliamiinisulfonihapon kanssa.

Kaavan I mukaiset yhdisteet käsittävät kiraalisuuskeskuksen bentsoksatsiini- tai tiatsiinirungon 2-asemassa, joten ne voivat esiintyä kahtena erilaisena, optisesti aktiivisena enantiomeerina tai rasemaattina.

Oheinen keksintö kattaa sekä kaavan I mukaisten yhdisteiden raseemiset seokset että niiden puhtaat optiset isomeerit.

Jos synteesissä käytetään kaavojen II tai IV mukaisten yhdisteiden rasemaatteja, niin tällöin kaavan I mukaiset yhdisteet saadaan rasemaatteina. Jos lähtöaineina käytetään kaavojen II tai IV mukaisten yhdisteiden optisesti aktiivisia muotoja, niin tällöin voidaan saada kaavan I mukaisia, optisesti aktiivisia yhdisteitä. Kaavan I mukaisia, optisesti aktiivisia yhdisteitä voidaan saada raseemisista seoksista sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi kromatografisella erotuksella kiraalisia erotusaineita käyttäen tai toteuttamalla reaktiosopivien, optisesti aktiivisten happojen, esimerkiksi viinihapon tai 10-kamferisulfonihapon kanssa, mitä seuraa erotus optisesti aktiivisiksi antipodeiksi saatujen suolojen fraktioivalla kiteytyksellä.

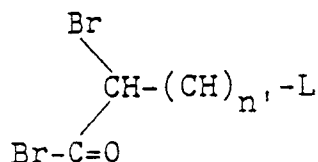
Kaavan II mukaiset lähtöyhdisteet voidaan saada kaavan VII mukaisista 2-aminofenoli johdannaisista



VII

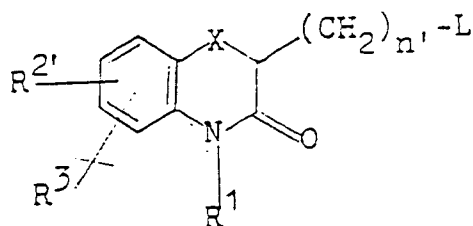
missä R^1 , $R^{2'}$, R^3 ja X ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia.

Niinpä kaavan VII mukaiset yhdisteet voidaan kondensoida sinänsä tunnetulla tavalla kaavan VIII



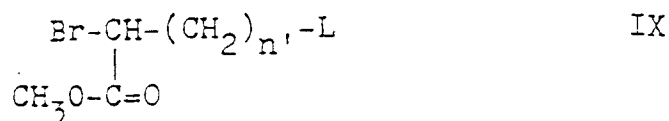
VIII

missä L on edellä esitetyn määritelmän mukainen ja n' tarkoittaa lukuja 1-4, mukaista β -bromi-asyyllibromidia käyttäen kaavan IIa mukaisiksi yhdisteiksi



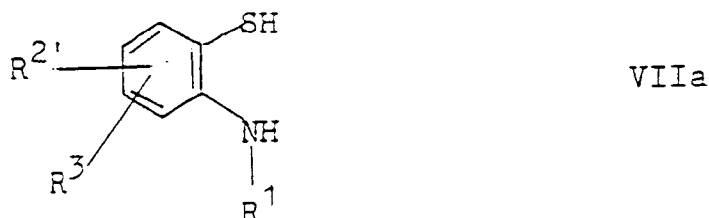
IIa

missä R^1 , $R^{2'}$, R^3 , X , n' ja L ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia. Tämä kondensatio voidaan toteuttaa reaktioolosuhteissa inertissä liuottimessa, esimerkiksi halogenoidussa hiilivedyissä kuten kloroformissa, emäksen, esimerkiksi alkalimetallivetykarbonaattien tai -karbonaattien läsnäollessa, ja se toteutetaan tarkoituksenmukaisesti siirtokatalyytin, esimerkiksi bentsyyli- β -trimetyyliammoniumkloridin läsnäollessa. Kaavan VII mukaiset yhdisteet voidaan myös saattaa reagoimaan sinänsä tunnetulla tavalla kaavan IX

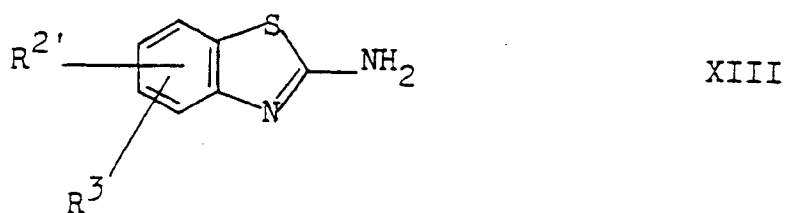


missä n' ja L ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia, mukaisten β -bromialkaanikarboksyylihapon metyyliestereiden kanssa, jolloin saadaan kaavan IIa mukaisia yhdisteitä. Tämä reaktio voidaan toteuttaa esimerkiksi dimetyyliformamidissa epäorgaanisen emäksen kuten alkalimetallikarbonaatin läsnäollessa.

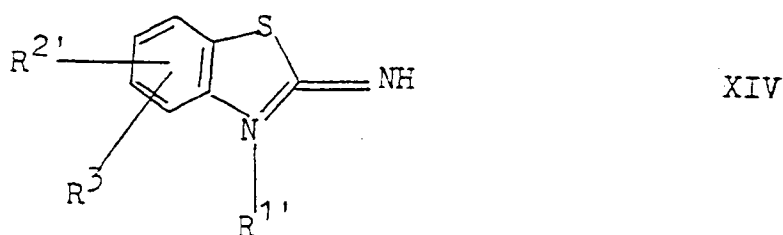
Yleisen kaavan VIIa



missä R^1 , $R^{2'}$ ja R^3 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia, mukaiset yhdisteet ovat tunnettuja tai ne voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla yleisen kaavan XIII mukaisista yhdisteistä



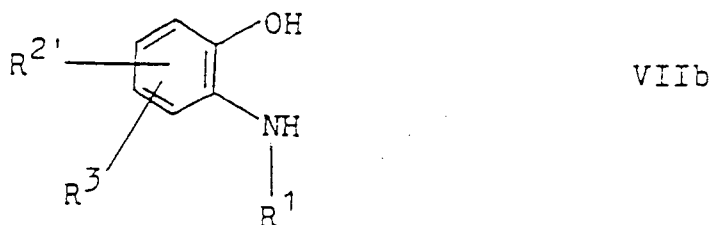
missä $R^{2'}$ ja R^3 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia. Kaavan XIII mukaiset yhdisteet voidaan alkyloida sinänsä tunnetulla tavalla alkyylijäännöksen R^1 liittämiseksi, jolloin saadaan yleisen kaavan XIV mukaisia yhdisteitä



missä $R^{2'}$ ja R^3 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia ja R^1 tarkoittaa alempaa alkyyliä.

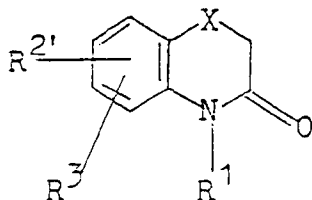
Kaavojen XIII ja XIV mukaiset yhdisteet voidaan muuntaa sinänsä tunnetulla tavalla kaavan VIIa mukaisiksi yhdisteiksi pilkkomalla ne lämmön avulla vesipitoisessa alkalisisä välialueessa, esimerkiksi keittämällä alkalimetallihydroksidiliuoksessa.

Yleisen kaavan VIIb



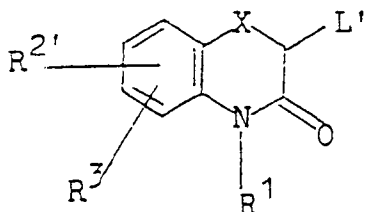
missä R^1 , $R^{2'}$ ja R^3 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia, mukaiset yhdisteet ovat tunnettuja tai niitä voidaan valmistaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä tai analogisesti sinänsä tunnettujen menetelmien kanssa. 2-alkyyliaminofenoliyhdisteitä (R^1 = alempi alkyyli) voidaan saada vastaavista 2-aminofenoliyhdisteistä. Tätä tarkoitusta varten ne asyloidaan ensin siten, että sekä fenoliseen hydroksiryhmään että aminoryhmään liitetään asyylisuojarahmā. Saaduissa esteriamidihdisteissä amidiryhmittymä alkyloidaan sinänsä tunnetulla tavalla siten, että nämä yhdisteet saatetaan reagoimaan alkylointiaineen, esimerkiksi alemman alkyylihalogenidin, -sulfaatin tai -sulfonaatin kanssa vahvan emäksen kuten alkalimetallihydridin tai -hydroksidin läsnäollessa, mahdollisesti siirtokatalyytin, esimerkiksi bentsyyli(trimetyyliammonium)kloridin läsnäollessa. Reaktio voidaan toteuttaa esimerkiksi edellä kuvatuissa olosuhteissa, jotka vallitsevat kaavan I mukaisia yhdisteitä jälkikäteen alkyloitaessa. Toteutetun alkyloinnin jälkeen asyylisuojarahmät voidaan lohkaista jälleen irti sinänsä tunnetulla tavalla happamalla tai alkalisella hydrolyysillä.

Kaavan II, missä n tarkoittaa lukua 0, mukaiset yhdisteet voidaan saada kaavan X mukaisista yhdisteistä



X

missä R^1 , $R^{2'}$, R^3 ja X ovat edellä esitettettyjen määritelmien mukaisia. Niinpä kaavan IIb



IIb

missä R^1 , $R^{2'}$ ja R^3 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia ja L' tarkoittaa halogeenia, mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi kaavan X mukaisiin yhdisteisiin voidaan liittää sinänsä tunnetulla tavalla halogeenisubstituentti L' , erityisesti kloori, käsittelemällä näitä yhdisteitä halogenointiaineella, esimerkiksi sulfuryylkloridilla. Tämä klooraus voidaan toteuttaa reaktio-olosuhteissa inertissä liuottimessa, esimerkiksi halogenoidussa hiilivedyissä kuten dikloorimetaanissa.

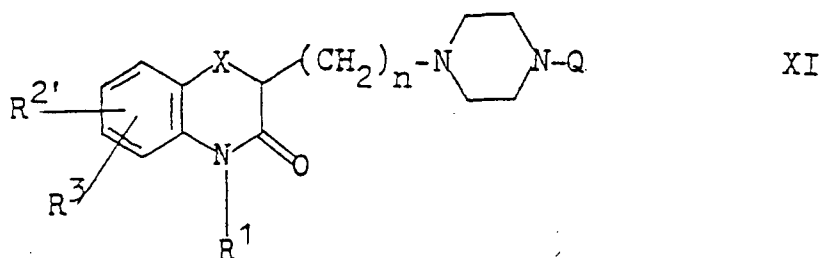
Kaavan X mukaiset yhdisteet ovat tunnettuja tai niitä voidaan saada sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi siten, että kaavan VII mukaiset yhdisteet kondensoidaan klooriasetyylikloridin kanssa. Tämä kondensaatio voidaan toteuttaa kaavan IIa mukaisten yhdisteiden valmistuksen yhteydessä esitetyissä reaktio-olosuhteissa.

Kaavan IV mukaisia yhdisteitä ei olla tähän mennessä kuvattu kirjallisuudessa, vaan ne ovat uusia, arvokkaita välituotteita

farmakologisesti aktiivisten yhdisteiden, esimerkiksi kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistuksessa.

Kaavan IV mukaisia yhdisteitä voidaan saada sinänsä tunnetulla tavalla esimerkiksi siten, että kaavan II mukaiset yhdisteet saatetaan reagoimaan piperatsiiniylimäärän kanssa. Tämä reaktio voidaan toteuttaa amiinien alkylointiin sinänsä tavallisilla menetelmillä, esimerkiksi niissä edellä kuvatuissa olosuhteissa, jotka vallitsevat kaavan II mukaisten yhdisteiden ja kaavan III mukaisten yhdisteiden välisessä reaktiossa.

Kaavan IV mukaisia yhdisteitä voidaan myös saada yleisen kaavan XI



missä R^1 , $R^{2'}$, R^3 , X ja n ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia ja Q tarkoittaa amiinisuojarahmää, mukaisista yhdisteistä siten, että tämä amiinisuojarahmä lohkaistaan irti sinänsä tunnetulla tavalla. Amiinisuojarahminä voidaan käyttää sinänsä tunnettuja, aminofunktion suojaamiseen käyttökelpoisia suojaavia ryhmiä, esimerkiksi hydrolyytisesti irtilohkeavia asyyli-ryhmiä tai hydrogenolyytisesti irtilohkeavia bentsyyli-ryhmiä. Sopivia suojaavia ryhmiä tunnetaan esimerkiksi teoksen E. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry"; Plenum Press, Lontoo (1971), alkaen sivulta 44, perusteella. Erityisen sopivia ovat formyyli-ryhmä sekä alemmat karbalkoksisuojarahmät. Nämä ryhmät voidaan lohkaista irti sinänsä tunnetulla tavalla, happaman tai alkalisen hydrolyysin avulla.

Kaavan XI mukaisia yhdisteitä voidaan saada sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi kaavan II mukaisten yhdisteiden ja kaavan XII



XII

missä Q on edellä esitetyn määritelmän mukainen, mukaisten yhdisteiden välisellä reaktiolla. Tämä reaktio voidaan toteuttaa amiinien alkylointiin tavallisesti käytetyillä menetelmillä, esimerkiksi sellaisissa reaktio-olosuhteissa, jotka on kuvattu edellä kaavan II mukaisten yhdisteiden ja kaavan III mukaisten yhdisteiden välisen reaktion yhteydessä.

Kaavan III mukaiset yhdisteet ovat tunnettuja tai niitä voidaan valmistaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi siten, että kaavan V mukaiset yhdisteet saatetaan reagoimaan piperatsiiniylimäärän tai kaavan XII mukaisen yhdisteen kanssa, minkä jälkeen suojaryhmä Q lohkaistaan uudestaan irti.

Yhdisteiden I ja niiden farmakologisesti hyväksyttävien happo-additiosuolojen tunnusomaisena piirteenä ovat mielenkiintoiset farmakologiset ominaisuudet, ja niillä on tulehduksia ja allergiaa torjuvia vaikutuksia. Erityisesti näillä yhdisteillä on edullinen vaikutusprofiili astmaoireiden hoidon kannalta, niiden toksisuuden ollessa pieni ja siedettävyyden ollessa hyvä.

Astma on krooninen, tulehduksellinen keuhkosairaus, jonka tunnusomaisena piirteenä on hengitysteiden ajoittainen, palautuva estyminen. Yleisesti oletetaan, että astmaoireiden ja -kohtausten puhkeaminen johtuu syöttösoluina tunnetusta, perus- ja välikudoksessa esiintyvistä solutyypistä. Nämä syöttösolut sisältävät edeltäkäsien muodostuneita tulehdusta välittäviä ja kouristusta aiheuttavia aineita, erityisesti histamiinia. Ne kykenevät lisäksi syntetisoimaan uudestaan lukuisia, membraanilipideistä peräisin olevia välittäjiä. Syöttösolut toimivat myös yhdessä monien erilaisten oheissolujen kanssa, jotka

kaikki kykenevät syntetisoimaan tulehduksen sekä esitulehduksen välittäjiä.

Allergiaa aiheuttavien olosuhteiden puuttuessa nämä syöttösolut ovat lähes toimettomina odotusasemassa. Allergisten reaktioiden avaintekijä on kiertävien IgE-vasta-aineiden läsnäolo suurina pitoisuuksina. Kun nämä vasta-aineet sitoutuvat vastaavaan antigeeniin, ne aktivoivat sekä edeltäkäsinkin syntyneiden välittäjäaineiden degranulaation ja vapautumisen että myöskin muiden välittäjäaineiden uuden synteesin.

Koska astma on tulehduksellinen, tukkeutumista aiheuttava keuhkosairaus, niin sen hoito perustuu olennaisesti kahteen seikkaan, nimittäin oireiden lievittämiseen antamalla potilaalle keuhkoputkia laajentavia aineita kuten β -sympatikomimeettisiä aineita, ksantiinijohdannaisia sekä antikolinergisia aineita; antamalla tulehduksia torjuvia vaikuteaineita kuten dinatriumkromoglisinaattia ja steroideja; sekä käyttämällä spesifisiä välittäjäaineita, esim. histamiinia vastaan kohdistettua hoitoa. Oireiden lievittämiseen tähtäävä hoito soveltuu noin 50 %:lle astmapotilaista, mutta tämä hoito ei lievitä kuitenkaan lainkaan taudin syitä, eli tulehdusta. Tulehduksia torjuvat vaikuteaineet voivat heikentää tulehdusta, mutta niillä on kuitenkin usein epätoivottuja sivuvaikutuksia ja niitä annetaan usein samanaikaisesti keuhkoputkia laajentavien aineiden kanssa. Tiettyä välittäjäainetta vastaan kohdistetut hoidot ovat yksinään täysin riittämättömiä, koska astmaan liittyy useita välittäjäaineita.

Keksinnön mukaisten aineiden tunnusomaisena piirteenä on se, että niillä on tulehdusta torjuvaa vaikutusta, ja että niillä on spesifistä, jotakin tai joitakin kolmea välittäjätyyppiä, eli histamiinia, leukotrieenejä sekä verihiutaleiden kasautumistekijää, jotka eivät osallistu ainoastaan keuhkoputkien akuuttiin kouristeluun vaan myöskin kroonisen tulehduksen säilymiseen, vastaan kohdistuvaa vaikutusta, tai jotka vaikutta-

vat myös välittäjäspesifisten reseptoreiden välityksellä kyseessä olevia kohdesoluja vastaan.

Yhdisteiden tulehdusta sekä allergiaa torjuvat ominaisuudet voidaan osoittaa farmakologisilla standardikokeilla sekä in vitro että in vivo.

Koemenetelmien kuvaus

1. Ihon passiivisen anafylaksian (P.C.A.) sekä histamiinilla indusoitujen, anafylaksian kaltaisten ihoreaktioiden estymisen määrittäminen

P.C.A (passive cutaneous anaphylaxis) toteutetaan menetelmillä, jotka on kuvattu julkaisuissa Goose et al., J.N. Immunology 16 (1969), 749, sekä Martin et al., Arch. Pharmacol. 316 (1981), 186.

Kokeessa käytettyä IgE-rikasta ovalbumiini-antiseerumia tuotetaan immunoituissa Brown-Norway-rotissa. Tätä tarkoitusta varten rotat immunoidaan injektoimalla vatsaontelon sisäisesti (i.p.) seosta, joka sisältää 100 µg ovalbumiinia sekä Bordatella-pertussis-suspensiota [Vaxicoq[®], valmistaja: Institut Merieux, joka sisältää 5×10^9 organismia sekä 1,25 mg yhdistettä $Al(OH)_3$]. 20 vuorokauden kuluttua eläimille annetaan immunoinnin uusimiseksi toisena i.p.-injektiona liuosta, joka sisältää 10 µg ovalbumiinia 0,5 ml:ssa fysiologista keittosuolaliuosta. Edelleen neljän vuorokauden kuluttua eläinten veri otetaan talteen ja se sentrifugoidaan. Täten saatua antiseerumia säilytetään käyttöön saakka -20 °C:n lämpötilassa.

Ihon passiivisen anafylaksian sekä histamiinilla indusoitujen, anafylaksian kaltaisten ihoreaktioiden estymisen määrittäminen toteutetaan seuraavasti:

Eläinten passiiviseksi herkistämiseksi ovalbumiinille Sprague-Dawley-rottien, joiden elopaino on 150-180 g, kylkeen injek-

toidaan ihonsisäisesti 50 μ l IgE-rikkaan ovalbumiini-antiseerumin 1:75-laimennosta, joka on tehty fysiologiseen natriumkloridiliuokseen.

Kun tästä herkistämisestä on kulunut 24 tuntia, rotille annettiin Martin:in et al. menetelmän mukaisesti laskimonsisäisesti liuosta, joka sisälsi 8,25 mg/kg ovalbumiinia sekä 26,4 mg/kg sinistä väriainetta (Evan's Blue), ihon passiivisen anafylaksian laukaisemiseksi. Tämä ovalbumiiniärsytys saa aikaan anafylaktisen reaktion siihen kohtaan, johon antiseerumia oli injektoitu.

Histamiinilla indusoidun, anafylaksian kaltaisen ihoreaktion määrittämiseksi eläimiin, antiseerumi-injektion suhteen vastakkaiseen kylkeen injektoidaan ihonsisäisesti 50 μ l fysiologista natriumkloridiliuosta, joka sisältää 0,8 mg/ml histamiinia, välittömästi ennen ovalbumiinia ja sinistä väriainetta sisältävän liuoksen laskimonsisäistä injektiota.

Tutkimuspäivänä testattavat aineet liuotetaan tislattuun veteen, joka sisältää 1 til.-% dimetyyliformamidia ja 1 til.-% tuotetta Tween[®] 20 [polyoksietyleen(20)sorbitaanimonolauraatti]. Yhtä tuntia ennen ärsytyksen laukaisevaa ovalbumiini-injektiota kullekin eläimelle annetaan suun kautta 2×10^{-5} mol/kg testattavaa ainetta kulloinkin 0,5 ml:ssa liuosta. Vertailuryhmä saa vertailun mahdollistamiseksi pelkkää liuotinta.

Ärsytystä laukaisevalla laskimonsisäisellä ovalbumiini-injektioilla aiheutetut, turvotusta käsittävät anafylaktiset (P.C.A.) sekä anafylaksian kaltaiset (histamiinilla indusoidut) reaktiot, jotka todetaan turvotuksena, paksuuntumisena sekä tulehduksesta johtuvana sinisen värin tihkumisena, arvoistellaan 30 minuutin kuluttua laskimonsisäisellä ovalbumiini-injektioilla toteutetun ärsytyksen jälkeen. Arvostelu tapahtuu arvioimalla näköhavainnon perusteella sinisen värin tihkuminen turvonneissa kohdissa. Anafylaktisten ja anafylaksian kaltaisten reaktioiden prosentuaalinen estyminen testattavien ainei-

den vaikutuksesta määritetään vertailuasteikkojen avulla vertaamalla testattavilla aineilla käsittelemättömissä vertailueläimissä esiintyviin reaktioihin.

Taulukossa A on esitetty tulokset, jotka on saatu edellä kuvatuilla koemenetelmillä kaavan I mukaisia yhdisteitä käyttäen. Kaavan I mukaisiin yhdisteisiin liitetyt esimerkkinumeroit viittaavat jäljempänä seuraaviin valmistusesimerkkeihin.

Taulukko A

Rotissa esiintyviin anafylaktisiin ja anafylaksian kaltaisiin ihoreaktioihin kohdistuva estovaikutus

Test.	<u>Prosent. estyminen p. o. -annoksella 2×10^{-5} mol/kg</u>	
aine,	Ihon passiivinen	Histamiinilla indusoitu
<u>esim. no.</u>	<u>anafylaksia (P.C.A)</u>	<u>anafyl. kaltainen reaktio</u>
22	69	45
7	70	40
9	60	30
1	88	55
8	73	60
12	80	50
13	55	30
15	60	30
16	50	45
17	70	35
11	55	20
10	70	35
3	80	55
18	80	53
19	80	60
21	78	55
24	80	60
25	50	15
27	60	35
28	65	40

2. Pienimmän toksisen annoksen määrittäminen

Uroshiirille, joiden elopaino oli 20-25 g, annetaan suun kautta testattavia yhdisteitä enimmäisannoksena 300 mg/kg. Eläimiä seurataan tarkoin 3 tunnin ajan toksisuusoireiden havaitsemiseksi. Lisäksi 24 tunnin ajan yhdisteiden antamisen jälkeen kaikki oireet ja kuolemantapaukset merkitään muistiin. Samoin seurannaisoireet havainnoidaan ja ne merkitään muistiin. Mikäli hiiri kuolee tai siinä havaitaan voimakkaita myrkytysoireita, niin tällöin toisille hiirille annetaan testattavia yhdisteitä pienenevinä annoksina. Pienin annos, joka vielä johtaa kuolemaan tai aiheuttaa voimakkaita myrkytysoireita, esitetään seuraavassa taulukossa B pienimpänä toksisena annoksena.

Taulukko B

Testattava aine, esim. no	Pienin toksinen annos, mg/hiiri-kg, p.o.
------------------------------	---

1	300
22	300
8	100
9	300
2	>300
11	>300
12	300
13	100
16	300

3. Histamiini-(H₁)-reseptori-antagonismin perustuvan antihistamiini-(H₁)-vaikutuksen tutkiminen in vitro

Kyseessä olevien aineiden histamiini-(H₁)-reseptori-antagonismin tutkimiseksi niillä oleva, sileiden lihasten histamiinilla indusoituun supistumiseen kohdistuva estovaikutus määritetään

in vitro eristetyn sisäelimen avulla. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää sykkyräsuolesta saatuja eristettyjä kudoshaukkeita. Nämä fysiologisessa suolaliuoksessa olevat kudoshaukkeet reagoivat histamiinin lisäykseen supistamalla. Keksinnön mukaisten yhdisteiden lisääminen heikentää tätä histamiinilisäyksellä aikaansaatua, sykkyräsuolileikkeissä olevien sileiden lihasten supistumista. Supistumisen heikentymisen voimakkuus on osoitus yhdisteiden antihistamiini-(H₁)-vaikutuksesta. Tämä tutkimus toteutetaan analogisesti alunperin julkaisussa Magnus, Pflügers Arch. 102, 123 (1904) kuvatus menetelmän kanssa.

Marsun sykkyräsuolesta saadun eristetyn sileän lihaksen supistumiseen, joka oli indusoitu 5×10^{-6} -molaarisella histamiinipitoisuudella, kohdistuvan estovaikutuksen määrittämiseen käytetty koejärjestely

Tässä kokeessa käytetään Dunkin Hartley-marsujen, joiden elopaino on 300-500 g, sykkyräsuolesta saatuja, 1,5 cm:n pituisia pätkiä.

Kukin leike laitetaan 10 ml:sta fysiologista suolaliuosta Krebs-Henseleit:in mukaisesti valmistettuun kudoshauketeeseen ja kiinnitettiin sykkyräsuolileikkeen pituusmuutoksen isotonisissa mittauksissa tavallisesti käytettävään laitteeseen (automaattinen Celaster-mittalaite) siten, että kudokseen kohdistuu 1 g:n jännitys. Haukeen pH pidetään arvossa 7,4 ja sitä kaasutetaan seoksella, jonka koostumus on 5 % CO₂ ja 95 % O₂. Tasapainotusvaiheen jälkeen kudokseen aiheutetaan isotoninen supistuminen lisäämällä histamiinia siten, että sen loppupitoisuudeksi saadaan 5×10^{-6} mol/l, joka histamiini huuhdotaan sitten pois 30 sekunnin pituisen kosketusajan jälkeen. Jäljempänä kuvatussa kokeessa käytetään vain sellaista kudosta, jolla saadaan kolme toistettavaa supistumista 10 minuutin välein. Sitten testattavia aineita lisätään siten, että loppupitoisuudeksi saadaan 10^{-6} mol/l, ja 30 sekunnin pituisen kosketusajan jälkeen lisätään taas histamiinia siten, että sen

pitoisuudeksi saadaan $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Aiheutettuja supistuksia mitataan 30 sekunnin ajan. Tämän jälkeen kudot huuhdotaan useaan kertaan 10 minuutin pituisen ajanjakson aikana. Sitten aiheutetaan vielä kerran supistusärsyke histamiinia lisäämällä. Aiheutettuja supistuksia mitataan jälleen 30 sekunnin ajan. Pelkän histamiinilisäyksen aiheuttamien supistusten voimakkuuden sekä testattavien aineiden läsnäollessa todettujen supistusten voimakkuuden välinen ero määritettiin ja siitä laskettiin prosentuaalinen estovaikutus.

Seuraavassa taulukossa C on esitetty tulokset, jotka on saatu edellä kuvatuilla menetelmillä testattavia aineita käyttäen. Taulukossa on esitetty estovaikutukset, jotka kohdistuvat 30 sekuntia testattavan aineen antamisen jälkeen histamiinilla indusoituihin supistuksiin sekä 10 minuuttia myöhemmin histamiinilisäyksellä indusoituihin supistuksiin.

Taulukko C

In vitro-(H₁)-reseptoriantagonismi

	Histamiinilla indusoituun sykkyräsuolen supistumiseen kohdistuva prosentuaalinen estovaikutus, histamiinipitoisuuden ollessa	
Testat-	5x10 ⁻⁶ mol/l ja testattavan aineen pitoisuuden	
tava aine,	ollessa 10 ⁻⁶ mol/l	
esim. no	30 sek. kuluttua	10 sek. kuluttua
7	85	74
8	42	5
13	42	15
16	30	27
11	32	35
2	51	60
10	42	36
3	66	28
18	78	83
19	60	42
21	50	89
23	70	83
24	70	86
25	50	32
27	16	72
28	38	45

4. Anti-P. A. F.-vaikutuksen in vitro-määrittäminen

P. A. F. (Platelet Activating Factor = verihiutaleiden kasautumistekijä) on fosfolipidinen välittäjäaine, joka vaikuttaa monella tavalla. Verihiutaleiden kasautumisen aktivoituminen johtaa keuhkoputkien pitkäaikaisiin kuroutumiin ja hengitysteiden ylitireaktiivisuuteen.

Tämän kokeen avulla tutkitaan julkaisussa Mikashima et al., Jap. J. Pharmacol. 44 (1987), 387-391, kuvatun menetelmän mukaisesti testattavien aineiden vaikutusta P.A.F. -lisäyksellä indusoituun verihiutaleiden kasautumiseen kaniinin verestä saadussa verihiutalesuspensiossa.

Kokeessa käytetään kaniinin verestä saatujen verihiutaleiden suspensiota, joka sisältää 4×10^9 verihiutaletta/ml muunnetussa Tyrode-puskuriliuoksessa, jonka pH on asetettu arvoon 7,4 (Tyrode-liuos = vesiliuos, jonka koostumus litrassa on 136,9 mMol NaCl, 2,68 mMol KCl, 2,31 mMol CaCl_2 , 1,0 mMol MgCl_2 , 11,9 mMol NaHCO_3 , 1,45 mMol NaH_2PO_4 sekä 5,55 mMol glukoosia. Muunnettu Tyrode-liuos = Tyrode-liuos, johon on lisätty 1,3 mM/l CaCl_2 ja 2,5 g/l gelatiinia). Verihiutaleet ovat peräisin kolmesta kaniinista (uusiseelantilainen hybridi, elopaino 3-4 kg) saadusta, kulloinkin 10 ml:n verinäytteestä. Tätä tarkoitusta varten verinäytteet käsitellään etyleenidiamiinitetraetikkahapolla ja pestään menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa Artley et al., Brit. J. Hämatol. 19 (1970), 7-17. Sitten näytteistä erotetaan sentrifugoimalla (20 min. nopeudella 400xg) ensin runsaasti verihiutaleita sisältävä plasma. Verihiutaleet erotetaan plasmasta sentrifugoimalla uudestaan 15 minuutin ajan nopeudella 1400xg. Sentrifugoinnin jälkeen laskeumana saadut verihiutaleet suspendoidaan uudestaan Tyrode-puskuriliuokseen (joka ei sisällä kuitenkaan kalsiumia). Tähän suspensioon lisätään 0,4 mMol lyysiiniasetyyylisalisylaattia, ja verihiutaleet laskeutetaan uudestaan 15 minuutin kuluttua. Saatu laskeuma suspendoidaan uudestaan edellä mainittuun muunnettuun Tyrode-puskuriliuokseen, ja verihiutaleiden lukumäärä saadussa suspensiossa asetetaan toivottuun pitoisuuteen.

Reagenssina käytetään 40×10^9 -molaarista P.A.F. -liuosta. Tämä liuos valmistetaan kloroformiin tehdystä $1,8 \times 10^{-3}$ -molaarisesta varastoliuoksesta. Tätä tarkoitusta varten varastoliuoksesta otettu 10 μl :n näyte haihdutetaan kuiviin ja liuotetaan sitten uudestaan 180 μl :aan muunnettua Tyrode-liuosta, johon on lisätty 0,25 % lipidittömäksi tehtyä naudan seerumin albumiinia.

Tästä valmistetaan sitten 10^{-5} -molaarista käyttöliuosta, jota säilytetään pakastettuna. Kokeita varten tästä liuoksesta otetut näytteet laimennetaan sopivalla tavalla.

Kokeen toteuttamiseksi pienellä magneettisekoittimella varustetussa kasaumaputkessa olevaan 330 μ l:aan muunnettua Tyrodepuskuriliuosta lisätään samalla sekoittaen (1000 kierr/min.) 50 μ l verihiutalesuspensiota sekä 10 μ l tutkittavan yhdisteen 40×10^{-5} -molaarista liuosta. Tällä tavalla testattavan aineen loppupitoisuudeksi saadaan 10^{-5} mol/l. Seosta inkuboidaan ensin 90 sekuntia, minkä jälkeen siihen lisätään 10 μ l P. A. F.-valmistetta. Kasaumaputkissa tapahtuvaa kasautumista mitataan 4-5 minuutin ajan tietokoneeseen yhdistetyllä kasaumamittalaitteella.

Pelkkää verihiutalesuspensiota sisältävissä koeputkissa esiintyvä kasautuminen asetetaan 0 %:ksi, kun taas verihiutalesuspensiota sekä P. A. F.-valmistetta sisältävissä koeputkissa esiintyvä kasautuminen asetetaan 100 %:ksi. Kasautuminen, jota esiintyy vielä sen jälkeen, kun verihiutaleiden kasautumisen P. A. F.-indusoitua voimistumista on estetty testattavan aineen lisäyksellä, mitataan, ja tästä tuloksesta lasketaan havaittu kasautumisen estyminen prosentteina.

Seuraavassa taulukossa D on esitetty tulokset, jotka on saatu edellä kuvatulla menetelmällä kaavan I mukaisia yhdisteitä käyttäen.

Taulukko D

Anti-P. A. F.-vaikutus in vitro

Testat-	Kaniinin verestä saatujen verihiutaleiden
tava	P. A. F-indusoidun kasautumisen prosentuaalinen
aine,	estyminen testattavan aineen pitoisuuden
esim. no.	ollessa 10^{-5} mol/l

22	42
9	51
8	48
11	96
2	60
18	76
21	37
10	74
27	35
28	45

5. Syklo-oksigenaasi-inhibition ja 5-lipoksygenaasi-inhibition määrittäminen in vitro

Solukalvojen sisältämä arakidoni happo metaboloituu solun aktivoitumisen jälkeen kahdella tavalla. 5-lipoksygenaasi-entsyymien (= 5-LO) vaikutuksesta syntyy leukotrieenejä, muunmuassa C₄-leukotrieenejä, ja syklo-oksigenaasi-entsyymien (= CO) vaikutuksesta syntyy prostanoideja. In vitro-järjestelmissä nämä metaboliitit erittyvät solusta.

Syklo-oksigenaasia inhiboivien ja 5-lipoksygenaasia inhiboivien ominaisuuksien selvittämiseksi testattavien aineiden estovaikutus arakidoni hapon johdannaisten eli C₄-leukotrieenin (= LTC₄) sekä 6-keto-prostaglandiinin F_{1α} (= 6-keto-PGF_{1α}) biosynteesiin määritetään hiiren vatsaontelosta saatujen makrofaagisolujen avulla in vitro. Tätä tarkoitusta varten LTC₄- ja

6-keto-PGF_{1α}-pitoisuus hiiren vatsaontelosta saatujen makrofaagisolujen viljelyalustassa määritetään tsymosaanistimuloinnin jälkeen julkaisuissa Scott et al., J. Exp. Med. 152 (1980), 324-335, sekä Fradin et al., Prostaglandins, 33 (1987), 579-589, kuvatulla menetelmällä.

8-10 viikon ikäisten uroshiirten vatsaontelosoluja sisältävä solususpensio otetaan talteen sinänsä tunnetulla tavalla. Solujen viljelyalustana käytetään kaupallisesti tuotenimellä RPMI 1640 saatavaa liuosta (valmistaja Gibco), johon on lisätty hepariinia (10 kansainvälistä yksikköä/ml) sekä antibiootteja julkaisussa Bonney et al., Biochem. J. 176 (1978), 422-433, esitetyn ohjeen mukaisesti. Solususpension solupitoisuus asetetaan arvoon 10⁶ solua/ml, ja suspensio jaetaan tasan 24 tiitterilevyn kuoppiin, joiden tilavuus on 1 ml. Levyjä pidetään kaksi tuntia kosteana pidetetyssä lämpökaapissa, johon johdetaan samalla CO₂-rikastettua (CO₂-pitoisuus 7 %) ilmaa. Tämän jälkeen ne solut, jotka eivät ole tarttuneet tiitterikuoppien seinämiin, poistetaan pesemällä. Jäljelle jääneitä, seinämiin kiinnittyneitä makrofaagisoluja inkuboidaan noin 12 tunnin ajan suspensioväliaineessa, johon on lisätty 0,1 % naudan seerumin albumiinia (BSA = bovine serum albumin). Sitteen tämä suspensioväliaine korvataan Hanks'in suolaliuoksella (= Hanks' Balanced Salt Solution = HBSS), joka sisältää 10 mM Hepes (= hydroksietyylipiperatsinoetaanisulfonihappoa), ja johon on lisätty testattavien aineiden 0,1 %:sta liuosta, joka on tehty dimetyyliformamidin 1 %:een vesiliuokseen, tai pelkkää liuotinta. 15 minuutin kuluttua arakidonihapon metabolia stimuloidaan lisäämällä 10 hiukkasta tsymosaania (= oluthiivan eli Saccharomyces cerevisiae soluseinistä eristetty glykoproteiiniseos, valmistaja Sigma Chemical Co., München) kuhunkin kuoppaan. Kahden tunnin kuluttua kunkin kuopan pinnalla kelluvasta nesteestä otetuista näytteistä määritetään 6-keto-PGF_{1α}-sekä LTC₄-pitoisuus entsymaattisella immuunimäärityksellä (= EIA). Tämä EIA-määritys toteutetaan menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa Pradelles et al., Analytical Chem. 57 (1985), 1170-1173. Sekä LTC₄- että 6-keto-PGF_{1α}-määritys toteu-

tetaan vertailuasteikkoon vertaamalla ja käyttämällä näytteiden sopivia laimennoksia (LTC_4 -määrityksessä 1:50-1:250 ja 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ -määrityksessä 1:250-1:1250). 10^{-5} -molaarisena pitoisuutena olevan yhdisteen estovaikutuksen määrittämiseksi määritetään viite-eikosanoidien määrä, josta lasketaan estovaikutus prosentuaalisena inhibitiona tsymosaani-vertailumittauksiin nähden. Tästä kokeesta saadut tulokset on koottu seuraavaan taulukkoon E.

Taulukko E

10^{-5} -molaarisen pitoisuuden in vitro-estovaikutus (%) hiiren vatsaontelosta saaduissa, tsymosaanilla stimuloituissa makrofaagisoluiissa 6-keto-PGF $_{1\alpha}$:n ja LTC_4 :n vapautumiseen

Testattava aine,

esim. no.	6-keto-PGF $_{1\alpha}$	LTC_4
7	17	46
9	32	65
1	27	48
5	36	72
15	46	9
11	0	42

Edellä kuvattujen vaikutustensa ansiosta kaavan I mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää tulehdusta ja allergiaa torjuvina lääkkeinä suurissa nisäkkäissä, erityisesti ihmisessä tulehdus- ja allergiasairauksien hoitamiseksi. Keksinnön mukaiset, suun kautta annettuina vaikutuskykyiset yhdisteet voivat vaikuttaa monella eri tavalla, koska niiden vaikutus kohdistuu useita pääasiallisia, tulehduksiin ja astmaoireisiin osallistuvia välittäjäaineita vastaan. Tämän vaikutusprofiilin ansiosta voidaan olettaa, että sekä allergiasta johtuvia että allergiasta johtumattomia astmaoireita hoidettaessa keksinnön mukaiset yhdisteet eivät pelkästään lievitä tällaisiin astma-

sairauksiin liittyviä oireita vaan myöskin niihin liittyviä tulehduksia.

Käytetyt annoskoot voivat vaihdella yksilöllisesti, ja ne riippuvat luonnollisestikin käsiteltävästä tilasta, käytetystä aineesta sekä antotaavasta. Esimerkiksi ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti annettavat valmisteet sisältävät yleisesti vähemmän vaikuteainetta kuin suun kautta annettavat preparaatit. Yleisesti, suuremmille nisäkkäille, erityisesti ihmiselle voidaan antaa sellaisia lääkevalmisteita, joiden yksikköannos sisältää vaikuteainetta 10-250 mg.

Parantavina aineina käytettäessä näitä kaavan I mukaisia yhdisteitä on voitu sisällyttää yhdessä tavallisten farmaseuttisten apuaineiden kanssa esimerkiksi sellaisiin galeenisiin valmisteisiin kuten tabletteihin, kapseluihin, peräpuikkoihin tai liuoksiin. Näitä galeenisia valmisteita voidaan valmistaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä, käyttäen tavallisia kiinteitä kantaja-aineita kuten maitosokeria, tärkkelystä tai talkkia tai juoksevia paraffiineja, sekä käyttäen tavallisia farmaseuttisia apuaineita kuten esimerkiksi tabletteja hajottavaa ainetta, liukenemista edistäviä aineita tai säilöntäaineita.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat keksintöä lähemmin, sitä kuitenkaan millään tavalla rajoittamatta.

Esimerkki 1

2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni

A. 45,3 g:aan (= 0,23 mol) 6-bromikapronihappoa lisättiin samalla sekoittaen 63,6 g (= 0,235 mol) fosforitribromidia, minkä jälkeen tähän seokseen lisättiin 75,1 g (= 0,47 mol) bromia siten, että puolet siitä lisättiin pisaroittain ja loput nopeammin. Sitten seos kuumennettiin alueella 85-90 °C olevaan lämpötilaan, jossa sitä pidettiin 1,5 tuntia. Sitten tässä lämpötilassa lisättiin vielä 18,4 g (= 0,115 mol) bromia

ja reaktioseosta pidettiin vielä 18 tuntia alueella 85-90 °C olevassa lämpötilassa. Jatkokäsittelyä varten reaktioseos jäähdytettiin sitten 20 °C:n lämpötilaan ja se kaadettiin seokseen, jonka koostumus oli 700 ml jäähdytettyä vettä ja 500 ml kylmää heksaania. Orgaaninen faasi erotettiin ja vesifaasi pestiin vielä kahdesti kulloinkin 100 ml:lla heksaania. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin natriumsulfaattilla. Sitten liuotin poistettiin tislaamalla. Öljymäisenä jäännöksenä saadun 2,6-dibromikapronihappobromidin tunnusomaiset piirteet selvitettiin IR- ja NR-spektroskooppisesti ja sitä käytettiin seuraavassa vaiheessa tämän enempää puhdistamatta.

B) 9,25 g (= 0,07 mol) 2-aminotiofenolia, 27,9 g bentsyylitrimetyyliammoniumkloridia ja 25 g natriumvetykarbonaattia lisättiin 150 ml:aan kloroformia samalla sekoittaen. Saatu suspensio jäähdytettiin -5 °C:n lämpötilaan ja tähän jäähdytettyyn suspensioon lisättiin hitaasti, samalla sekoittaen liuos, joka sisälsi 25,3 g 2,6-dibromikapronihappobromidia 70 ml:ssa kloroformia. Lisäykseen tarvittiin 30 minuuttia, ja lämpötila vaihteli -5 °C:sta +5 °C:een. Seosta pidettiin vielä tunnin ajan tällä lämpötila-alueella. Tämän jälkeen seosta kuumennettiin 7 tunnin ajan palautusjäähdyttäen. Sitten se jäähdytettiin, suodatettiin ja kloroformi poistettiin tislaamalla saadusta suodoksesta. Saatuun jäännökseen lisättiin vettä ja tolueenia. Orgaaninen faasi erotettiin, kuivattiin ja fraktioitiin pylväskromatografisesti. 2-(4-bromibutyyli)-2H-1,4-bentsotiat-sin-3(4H)-onia sisältävä fraktio erotettiin. Siitä saatiin dietyylieetterin läsnäollessa kiteyttämällä 5,9 g 2-(4-bromibutyyli)-2H-1,4-bentsotiat-sin-3(4H)-onia heikosti vaaleanruskeina kiteinä, joiden sulamispiste oli 100 °C.

C) Seosta, joka sisälsi 3,6 g (= 0,012 mol) 2-(4-bromibutyyli)-2H-1,4-bentsotiat-sin-3(4H)-onia, 2,12 g (= 0,012 mol) N-(4-metyyli-pyridin-2-yyli)-piperatsiinia ja 1,83 g (= 0,018 mol) trietyyliamiinia 100 ml:ssa tolueenia, kuumennettiin palautusjäähdyttäen 9 tunnin ajan samalla sekoittaen siten, että 3 tunnin kuluttua lisättiin vielä 0,46 g trietyyliamiinia ja 6

tunnin kuluttua lisättiin vielä kerran 0,9 g trietyyliamiinia.

Reaktioseoksen jatkokäsittelymiseksi se jäähdytettiin 20 °C:n lämpötilaan ja siihen lisättiin 200 ml vettä. Orgaaninen faasi erotettiin ja tolueeni poistettiin tislaamalla. Saatu jäännös liuotettiin 50 ml:aan suolahapon 20-prosenttista vesiliuosta ja tämä liuos pestiin tolueenilla. Vesifaasi tehtiin alkali-seksi asettamalla sen pH arvoon 9, minkä jälkeen se uutettiin dikloorimetaanilla. Dikloorimetaaniuute pestiin, kuivattiin kalsiumkloridilla ja dikloorimetaani poistettiin tislaamalla. Jäännöksenä saatu raaka otsikon mukainen yhdiste puhdistettiin pylväskromatografisesti, minkä jälkeen se kiteytettiin uudelleen tolueenin ja isopropanolin 50/50-seoksesta (til./til.). Tällä tavalla saatiin 2,4 g 2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia värittöminä kiteinä, joiden sulamispiste oli 119 °C.

Esimerkki 2

2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-tioni

5,95 g (= 0,015 mol) esimerkissä 1 valmistettua 2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia liuotettiin 60 °C:n lämpötilassa 60 ml:aan ksyleeniä. Tähän liuokseen lisättiin 6,9 g yhdistettä P₄S₁₀ ja reaktioseosta kuumennettiin palautusjäähdyttäen ja sekoittaen tunnin ajan.

Jatkokäsittelyä varten seos jäähdytettiin, tällöin muodostunut sakka erotettiin ja se lisättiin seokseen, joka sisälsi 160 ml natriumhydroksidin 2N vesiliuosta sekä 200 ml dikloorimetaania. Reaktioseokseen lisättiin edelleen 50 ml vettä ja 50 ml dikloorimetaania, jolloin saatiin vähän sakkaa käsittävä reaktioliuos, josta sakka erotettiin suodattamalla. Sitten orgaaninen faasi erotettiin, kuivattiin ja liuotin poistettiin tislaamalla. Tällöin saatiin 5,2 g jäännöstä, joka fraktioitiin pylväskromatografisesti. Otsikon mukaista yhdistettä

saatiin sitä sisältävästä fraktiosta dietyylieetterin ja etyyliasetaatin 50/50-seoksesta (til./til.) kiteyttämällä. Tällä tavalla saatiin 3,1 g 2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-tionia vaa-leanruskeina kiteinä, joiden sulamispiste oli 119 °C.

Esimerkki 3

4-metyyli-2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni

2 g (= 0,005 mol) esimerkin 1 mukaisesti valmistettua 2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia liuotettiin 20 ml:aan vedetöntä dimetyyliformamidia samalla sekoittaen. 0,151 g natriumhydridiä lisättiin typpi-ilmakehässä ja saatua suspensiota pidettiin 10 minuuttia huoneen lämpötilassa. Sitten siihen lisättiin nopeasti 0,86 g metyylijodidia ja reaktioseosta sekoitettiin 2,5 tuntia huoneen lämpötilassa. Jatkokäsittelyä varten liuotin poistettiin tislamalla, jäännökseen lisättiin 100 ml vettä ja se uutettiin 100 ml:lla etyyliasetaattia. Orgaaninen faasi väkevöitiin liuotinta haihduttamalla ja jäännöksenä saatu raaka otsikon mukainen yhdiste puhdistettiin pylväskromatografisesti. Täten saatu emäs liuotettiin suolahapon 2,3 N isopropanoliliuokseen. Valkoisena sakkana erottunut, otsikon mukaisen yhdisteen hydrokloridi erotettiin suodattamalla. Tällä tavalla saatiin 0,7 g 4-metyyli-2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni-hydrokloridia, jonka summakaava on $C_{23}H_{30}N_4OS$, 2HCl, 2,5H₂O, ja jonka sulamispiste oli 163 °C.

Esimerkki 4

4-metyyli-2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni

A) 0,1 mol 2-aminobentsotiatsolia ja 0,1 mol metyylijodidia keitettiin 50 ml:ssa absoluuttista etanolia 12-15 tuntia palautusjäähdyttäen. Saostunut 2-imino-3-metyylibentsotiatsoli-

hydrojodidi erotettiin ja liuotettiin kuumaan veteen. Tämä liuos tehtiin alkaliseksi lisäämällä siihen natriumkarbonaatin kylläistä vesiliuosta. Saostunut 2-imino-3-metyyli-bentstiatsoli erotettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin alennetussa paineessa.

B) Edellä saatua tuotetta keitettiin palautusjäähdyttään 36 tunnin ajan 50-prosenttisessa kaliumhydroksidiliuoksessa. Jatkokäsittelyä varten liuos laimennettiin vedellä ja sen pH asetettiin arvoon 6 lisäämällä siihen etikkahapon 5N vesiliuosta. Tätä vesiliuosta uutettiin sitten moneen kertaan etikkahapon etyyliesterillä. Yhdistetyistä orgaanisista faaseista poistettiin liuotin alennetussa paineessa tislamalla. Jäännöksenä saatua 2-(metyyliamino)-tiofenolia käytettiin seuraavassa reaktiovaiheessa tämän enempää puhdistamatta.

C) 4,5 g (= 0,032 mol) 2-(metyyliamino)-tiofenolia, 6 g trietyyli-bentsyyliammoniumkloridia ja 11,20 g natriumvetykarbonaattia lisättiin 120 ml:aan kloroformia. Saatua suspensio jäähdytettiin 5 °C:n lämpötilaan, minkä jälkeen siihen lisättiin pisaroittain liuos, joka sisälsi 10,88 g 2,6-dibromihek-sanoyyli-bromidia 20 ml:ssa kloroformia, niin hitaasti, ettei lämpötila kohonnut arvon 5 °C yläpuolelle. Lisäykseen kului 20 minuuttia. Sitten reaktioseoksen annettiin lämmetä huoneen lämpötilaan, minkä jälkeen sitä keitettiin 4 tuntia palautusjäähdyttään. Jatkokäsittelyä varten reaktioseos jäähdytettiin ja suodatettiin. Kloroformifaasi pestiin, kuivattiin natriumsulfaattilla ja liuotin poistettiin tislamalla. Muodostunut 2-(4-bromibutyyli)-4-metyyli-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni eristettiin saadusta jäännöksestä saatiin pylväskromatografi-sesti fraktioimalla. Tällöin saatiin 2,78 g valkoisia kiteitä, joiden sulamispiste oli 116 °C.

D) Edellä saatu tuote saatettiin reagoimaan analogisesti esimerkiksi 1 C) kuvatulla tavalla N-(4-metyyli-pyridin-2-yyli)-piperatsiinin kanssa tolueenissa, johon lisättiin trietyyliamiinia. Saatua 4-metyyli-2-{4-[4-(4-metyyli-pyridin-2-yyli)-pi-

peratsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni muunnettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla dihydrokloridikseen, jonka summakaava on $C_{23}H_{30}N_4OS$, $2HCl$, $2,5H_2O$, ja jonka sulamispiste on $163^{\circ}C$.

Esimerkki 5

2-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni

A) Suspensioon, joka sisälsi 10,0 mMol 2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia 10 ml:ssa dikloorimetaania, lisättiin huoneen lämpötilassa pisaroittain, samalla sekoittaen 0,8 ml (= 1 ekvivalentti) sulfonyylikloridia, ja reaktioseosta sekoitettiin vielä edelleen 5 tuntia huoneen lämpötilassa. Seoksen jatkokäsittelyä varten se haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa. Jäännöksenä saatua 2-kloori-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia (sulamispiste $189-210^{\circ}C$, yhdisteen hajotessa) käytettiin tämän enempää puhdistamatta seuraavassa reaktiovaiheessa.

B) 7 g (= 0,035 mol) 2-kloori-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia, 6,2 g N-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsiinia ja 7 g trietyyliamiinia kuumennettiin palautusjäähdyttäen ja sekoittaen 100 ml:ssa tolueenia 5 tunnin ajan. Jatkokäsittelyä varten suspensio laimennettiin 200 ml:lla tolueenia, sakka erotettiin suodattamalla ja se liuotettiin suolahapon 20-prosenttiseen vesiliuokseen. Tämä liuos tehtiin alkaliseksi lisäämällä siihen ammoniumhydroksidiliuosta, muodostunut sakka erotettiin suodattamalla, se pestiin vedellä ja kuivattiin. Tällä tavalla saatiin vaaleanruskeina kiteinä 2 g 2-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia, jonka sulamispiste oli $245^{\circ}C$.

Esimerkki 6

7-hydroksi-2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni

360 mg 7-metoksi-2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-

1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia (katso esimerkki 19, valmistetaan analogisesti esimerkissä 1 kuvatulla tavalla) lisättiin 5 ml:aan dikloorimetaania pitäen kosteus loitolla. Seos jäähdytettiin -5 °C:n lämpötilaan, minkä jälkeen siihen lisättiin pisaroittain ja samalla sekoittaen liuos, joka sisälsi 0,73 g booritribromidia 1 ml:ssa metyleenikloridia. Sitten sekoittamista jatkettiin vielä 30 minuuttia huoneen lämpötilassa. Jatkokäsittelyä varten reaktioseos kaadettiin, samalla sekoittaen, jäätä ja natriumvetykarbonaatin vesiliuosta sisältävään seokseen. Sitten siihen lisättiin 200 ml kloroformia. Muodostunut orgaaninen liuos pestiin vedellä, kuivattiin natriumsulfaatilla, suodatettiin ja haihdutettiin alennetussa paineessa. Otsikon mukainen yhdiste eristettiin saadusta jäännöksestä pylväskromatografisesti fraktioimalla. Otsikon mukaista yhdistettä sisältävät fraktiot haihdutettiin ja niihin lisättiin eeteriä. Tällä tavalla saatiin 30 mg 7-hydroksi-2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia valkoisina kiteinä, joiden sulamispiste oli 212 °C.

Seuraavat, alla olevassa taulukossa I esitetyt, kaavan I mukaiset yhdisteet saatiin edellä olevissa esimerkeissä kuvatuilla menetelmillä.

Taulukko I

Esim.	R ¹	R ²	R ³	X	Y	n	R ⁴	Suolamuoto s.p. °C
7	H	H	H	O	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	2·HCl 180 (Z)
8	H	H	H	S	O	3	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 140
9	H	H	H	O	O	3	4-CH ₃ -pyrid-2-	2·HCl 183
10	H	H	7-CH ₃	S	O	3	4-CH ₃ -pyrid-2-	2·HCl 126
11	H	H	H	S	S	3	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 134
12	H	H	H	S	O	4	pyrim-2-	emäs 140
13	H	H	H	S	O	4	5-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 128
14	H	H	H	O	S	3	4-CH ₃ -pyrid-2-	2·HCl 170
15	H	H	H	S	O	3	5-Cl-pyrid-2-	emäs 153
16	H	H	H	S	O	4	6-CH ₃ O-pyrid-2-	emäs 132
17	H	H	H	S	O	4	pyrid-2-	emäs 125
18	H	7-F-	H	S	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	HCl 162
19	H	7-CH ₃ O-	H	S	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 123
20	H	7-Cl-	H	S	O	4	6-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 92
21	H	6-CH ₃ -	7-CH ₃	S	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 114
22	H	6-CH ₃ -	H	O	O	3	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 115
23	H	6-Cl-	H	O	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 116
24	H	6-CH ₃ -	H	O	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 126
25	H	7-HO-	H	S	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 126
26	H	H	H	S	O	4	3-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 119
27	H	7-Cl	H	S	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	emäs 152
28	n- C ₄ H ₉	H	H	S	O	4	4-CH ₃ -pyrid-2-	3·HCl 148

pyrid-2- = pyridin-2-yyli, pyrim-2- = pyrimidin-2-yyli
 Emäs = vapaa emäs HCl = hydrokloridi
 Z = hajoa

Esimerkki I

2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-onia sisältävät tabletit

Esimerkissä valmistettiin tabletteja, joiden koostumus tablettia kohden oli seuraava:

2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yyli)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-oni	20 mg
maissitärkkelys	60 mg
maitosokeri	135 mg
gelatiini (10 %:nen liuos)	6 mg

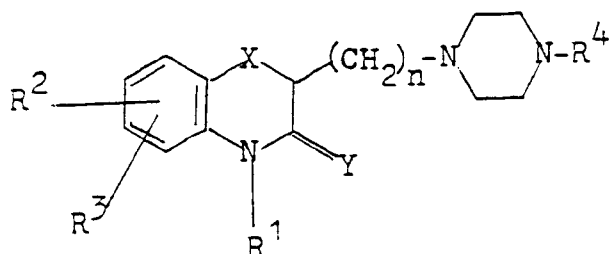
Vaikuteaine, maissitärkkelys ja maitosokeri paksunnettiin 10-prosenttisella gelatiiniliuoksella. Tahna hienonnettiin ja saadut rakeet levitettiin sopivalle pellille ja kuivattiin 45 °C:ssa. Nämä kuivatut rakeet johdettiin hienonnuskokeen läpi ja niihin sekoitettiin sekoittimessa vielä seuraavat apuaineet:

talkki	5 mg
magnesiumstearaatti	5 mg
maissitärkkelys	9 mg

minkä jälkeen ne puristettiin 240 mg:n tableteiksi.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden:



missä

X tarkoittaa happea tai rikkiä,

Y tarkoittaa happea tai rikkiä,

R¹ tarkoittaa vetyä tai alempaa alkyyliä,

R² tarkoittaa vetyä, alempaa alkyyliä, halogeenia, alempaa alkoksia, hydroksia, nitroa tai trifluorimetyyliä ja

R³ tarkoittaa vetyä, alempaa alkyyliä, halogeenia tai alempaa alkoksia, tai

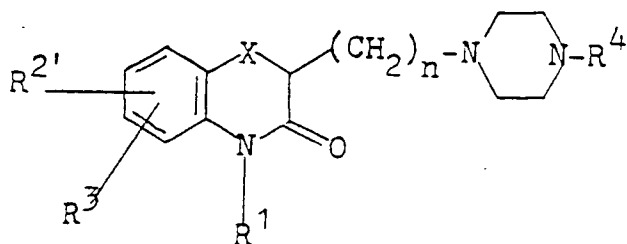
R² ja R³ ovat sitoutuneet vierekkäisiin hiiliatomeihin ja ne tarkoittavat yhdessä 1-2 hiiliatomia käsittävää alkyleeni-dioksiryhmää,

n tarkoittaa kokonaislukua 0-4 ja

R⁴ tarkoittaa 6-jäsenistä tyydyttymätöntä heterosykliä, jossa on 1 tai 2 piperatsiinirenkaiseen epäsuorasti sitoutunutta typpiä, joka heterosykli voi mahdollisesti olla substituutunut yhdellä tai kahdella hiiliatomiin sitoutuneella, alemman alkyylin, alemman alkoksin ja halogeenin joukosta valitulla substituentilla,

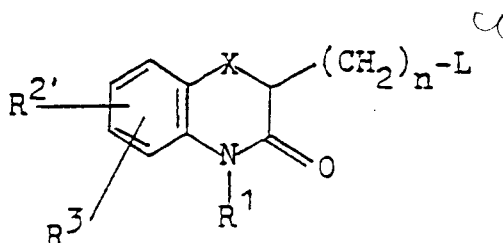
sekä niiden happoadditiosuolojen valmistamiseksi, t u n -
n e t t u siitä, että

a) yleisen kaavan Ia



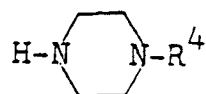
missä X , R^1 , R^2 , R^3 , n ja R^4 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia,

mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi yleisen kaavan II



missä X , R^1 , R^3 ja n ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia ja symbolilla $R^{2'}$ on sama merkitys kuin symbolilla R^2 kuitenkin siten, että hydroksiryhmä on suojattu myöhemmin irroitettavalla suojaavalla ryhmällä, ja L tarkoittaa aminolyyttisesti irtoavaa jäännöstä, erityisesti halogeenia,

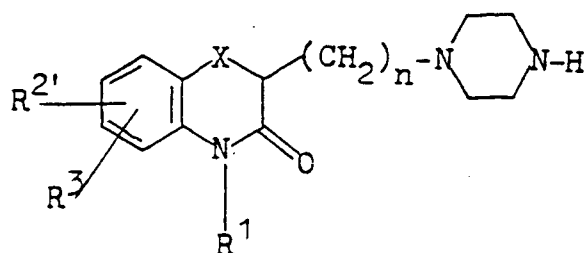
mukaiset yhdisteet saatetaan reagoimaan yleisen kaavan III



missä R^4 on edellä esitetyn määritelmän mukainen,

mukaisten piperatsiini johdannaisten kanssa, tai

b) yleisen kaavan IV



missä X , R^1 , $R^{2'}$, R^3 ja n ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia,

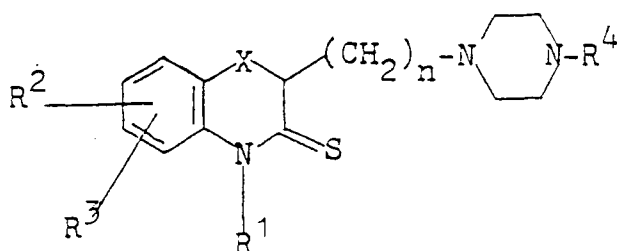
mukaiset yhdisteet saatetaan reagoimaan yleisen kaavan V



missä R^4 on edellä esitetyn määritelmän mukainen ja L' tarkoittaa halogeenia,

mukaisten yhdisteiden kanssa, minkä jälkeen mahdollinen hydroksia suojaava ryhmä irroitetaan uudestaan, tai

c) yleisen kaavan Ia mukaiset yhdisteet muunnetaan yhdisteiksi, joilla on yleinen kaava Ib



missä X , R^1 , R^2 , R^3 , n ja R^4 ovat edellä esitettyjen määritelmien mukaisia, ja

tämän jälkeen toivottaessa saadut, yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet, missä R^1 tarkoittaa vetyä, alkyloidaan sellaisiksi yleisen kaavan I mukaisiksi yhdisteiksi, joissa R^1 tarkoittaa alempaa alkyyliä, ja/tai saaduissa yleisen kaavan I mukaisissa yhdisteissä, joissa R^2 tarkoittaa metoksia, tämä metoksiryhmä pilkotaan hydroksiryhmäksi, ja toivottaessa vapaat, yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet muunnetaan happoadditiosuoloikseen tai tällaiset happoadditiosuolat muunnetaan vapaiksi, kaavan I mukaisiksi yhdisteiksi.

2. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että Y tarkoittaa happea.

3. Menetelmä jomman kumman edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että n tarkoittaa lukua 3 tai 4.

4. Menetelmä jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukais-
ten yhdisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
 R^4 tarkoittaa mahdollisesti substituoitunutta pyridyylijään-
nöstä.

5. Menetelmä patenttivaatimuksen 4 mukaisten yhdisteiden val-
mistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että R^4 tarkoittaa
4-(alempi alkyyli)pyrid-2-yylijäännöstä.

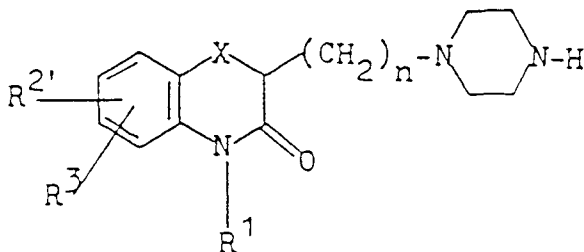
6. Menetelmä jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukais-
ten yhdisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
 R^1 tarkoittaa vetyä.

7. Menetelmä jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukais-
ten yhdisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
 R^2 tarkoittaa vetyä tai alempaa alkyyliä ja R^3 tarkoittaa
vetyä.

8. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten yhdisteiden val-
mistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että X tarkoittaa happea
tai rikkiä ja Y tarkoittaa happea, R^1 tarkoittaa vetyä, R^2
tarkoittaa vetyä tai alempaa alkyyliä, R^3 tarkoittaa vetyä, n
tarkoittaa lukua 3 tai 4 ja R^4 tarkoittaa mahdollisesti alem-
malla alkyyllillä substituoitunutta pyridyylijäännöstä.

9. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten yhdisteiden val-
mistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan
patenttivaatimuksen 8 mukaista 2-{4-[4-(4-metyylipyridin-2-yy-
li)-piperatsin-1-yyli]-butyyli}-2H-1,4-bentsotiatsin-3(4H)-
onia sekä sen fysiologisesti siedettyjä happoadditiosuoloja.

10. Yleisen kaavan IV mukaiset yhdisteet



ei piperidin
happo

missä

X tarkoittaa happea tai rikkiä,

R¹ tarkoittaa vetyä tai alempaa alkyyliä,

R^{2'} tarkoittaa vetyä, alempaa alkyyliä, halogeenia, alempaa alkoksia, nitroa tai trifluorimetyyliä, ja

R³ tarkoittaa vetyä, alempaa alkyyliä, halogeenia tai alempaa alkoksia, tai

R^{2'} ja R³ ovat sitoutuneet vierekkäisiin hiiliatomeihin ja ne tarkoittavat yhdessä 1-2 hiiliatomia käsittävää alkyleeni-dioksiryhmää, ja

n tarkoittaa kokonaislukua 0-4.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP A - 186310 CORD 279/16
A - 233728 CORD 265/34

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Abstracts	99 (1983)	22 495 m
- a -	101 (1984)	171 268 b
- " -	104 (1986)	109 687 w

2/5-96 C. Pettersson

Allekirjoitus