(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 963508 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 963508

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07D 261/04 (2006.01)
C07D 261/08 (2006.01)
C07D 261/18 (2006.01)
C07D 261/20 (2006.01)
C07D 263/30 (2006.01)
C07D 413/04 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 417/04 (2006.01)
C07C 205/51 (2006.01)
C07F 9/653 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
A61K 31/423 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/535 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **03.03.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **06.09.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **06.09.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **03.03.1995 PCT/EP1995/000784**

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

10.03.1994 DE 4408084 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Hoechst Aktiengesellschaft,** 65926 Frankfurt am Main, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Schwab, Wilfried,** Wiesbaden, SAKSA, (DE)
2 • **Anagnostopulos, Hiristo,** Wiesbaden, SAKSA, (DE)
3 • **Bartlett, Robert Ryder,** Darmstadt, SAKSA, (DE)
4 • **Schleyerbach, Rudolf,** Hofheim, SAKSA, (DE)
5 • **Weithmann, Klaus Ulrich,** Hofheim, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

3,5-disubstituoituja ja 3,5,6-trisubstituoituja 2-isoksatsoliineja ja isoksatsoleja, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö lääkkeinä

3,5-disubstituerade och 3,5,6-trisubstituerade 2-isoxazoliner och isoxazoler, förfarande för framställning av dessa och användning av dem som läkemedel

3,5-disubstituoituja ja 3,5,6-trisubstituoituja 2-isoksatsoliineja ja isoksatsoleja, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö lääkkeinä

Tämä keksintö koskee tulehdusten, astman, reumasairauksien ja autoimmuunisairauksien ennaltaehkäisyyn ja/tai hoitoon soveltuvia lääkeaineita.

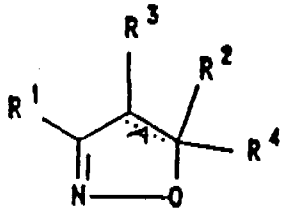
Ei-steroidisten anti-inflammatoristen lääkeaineiden, esimerkiksi asetyylisalisyylihapon ja indometasiinin, vaikutustapa on jo tunnettu. Se perustuu syklo-oksigenaasientsyymin inhibitioon, jota entsyymiä on läsnä monissa soluissa ja joka vastaa tulehduksia edistävien prostaglandiinien synteesistä.

Samoin on jo tunnettua, että sellaisia syklo-oksigenaasin inhibiittoreita voidaan käyttää reuman hoidossa (EP 245 825). On tosin jo käynyt ilmi, että prostaglandiineilla on ei-toivottujen vaikutustensa ohella myös toivottuja soluja suojaavia ominaisuuksia, esimerkiksi trombosyyteissä, mahalaukussa ja pohjukaissuolessa sekä munuaisissa. Kaikilla syklo-oksigenaasin inhibiittoreilla on siksi ei-toivottuja sivuvaikutuksia; ne esimerkiksi pidentävät verenvuotoaikaa, aiheuttavat mahahaavoja ja estävät munuaisten toimintaa.

Voi siis olla edullista inhiboida prostaglandiinien sijasta leukotrieenien ja sytokiinien ryhmään kuuluvia, erityisen voimakkaita tulehduksenvälittäjäaineita, kuten interleukiini-1α:aa ja interleukiini-1ß:aa, happiradikaaleja ja proteaaseja estämällä niiden muodostuminen.

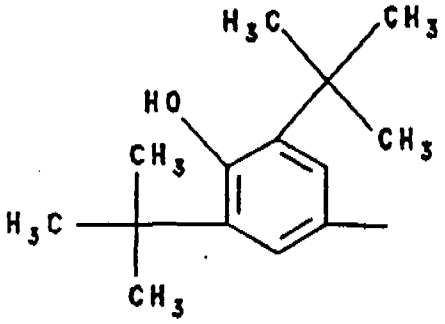
Nyt on havaittu, että yhdisteellä, jolla on kaava I, ei ole oleellista inhiboivaa vaikutusta syklo-oksigenaasiin mutta se estää leukotrieenien, sytokiinien, happiradikaalien ja proteaasien muodostumista ja sillä on vaikutusta astman, autoimmuunisairauksien ja reumasairauksien tutkimisessa käytetyissä malleissa.

Keksintö koskee yhdistettä, jolla on kaava I



(I)

ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen fysiologisesti siedettävissä olevaa suolaa ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen stereoisomeerista muotoa, jossa kaavassa toisella ryhmistä R^1 ja R^2 on kaavan II mukainen merkitys



(II)

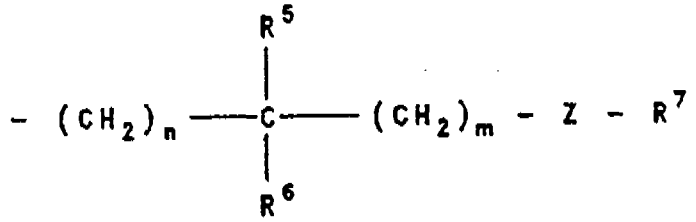
ja toisella jokin seuraavista merkityksistä:

a) pyridyyli,

b) tiofenyyli,

c) tiatsolyyli,

d) ryhmä, jolla on kaava III



(III)

jossa

n tarkoittaa lukua 0, 1, 2, 3, 4, 5 tai 6,

m tarkoittaa lukua 0, 1, 2, 3 tai 4,

Z on

1) -O- tai

2) -NH-,

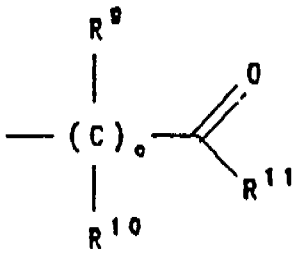
R^5 ja R^6 ovat kumpikin itsenäisesti

1) vetyatomi,

2) C_{1-4}-alkyyli,
3) C_{2-4}-alkenyyli,
4) C_{2-4}-alkynyyli,
5) fenyyli tai
6) OH ja

R^7 on

1) vetyatomi,
2) aminohaposta peräisin oleva ryhmä,
3) trifluorimetyylisulfonyyli,
4) $-O-P(O)(OH)_2$,
5) $-O-P(O)(OH)_2$, joka on mono- tai diesteröity fenyyli- tai C_{1-6}-alkyyliryhmällä, tai
6) ryhmä, jolla on kaava IV,



(IV)

jossa

o on 0 tai 1,

ryhmillä R^9 ja R^{10} on toisistaan riippumattomasti merkitys

1) vetyatomi tai
2) C_{1-4}-alkyyli,

R^{11} on

1) OH,
2) $-O-C_{1-4}$-alkyyli,
3) C_{1-20}-alkyyli,
4) C_{1-20}-alkyyli, joka sisältää yhden tai useamman substituentin, joka/joista kukin itsenäisesti voi olla
4.1. -COOH,
4.2. -OH,
4.3. -O-asetyyli tai
4.4. =O,

5) -COOH,

6) $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-C_{1-4}$-alkyyli,

7) N-glysyyli,

8) N-glysyyli-C_{1-4}-alkyyliesteri,

9) N-C_{1-4}-alkyylihydroksyyliamino,

10) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino,

11) 5-metyyli-isoksatsol-4-yyli,

12) 1-syaani-2-hydroksi-1-propenyyli,

13) fenyyli tai

14) fenyyli, joka on substituoitu yhdellä tai useammalla ryhmällä

14.1. C_{1-4}-alkyyli-N(R^{12})(R^{13})

jossa ryhmillä R^{12} ja R^{13} on toisistaan riippumattomasti jokin seuraavista merkityksistä:

1) vetyatomi,

2) C_{1-4}-alkyyli,

3) fenyyli-C_{1-2}-alkyyli,

4) R^{12} ja R^{13} muodostavat yhdessä niitä yhdistävän typpiatomin kanssa 5 - 7-jäsenisen heterosyklisen ryhmän, joka on substituoimaton tai 1 - 3 C_{1-4}-alkyyliryhmällä substituoitu ja jossa hiiliatomi voi olla korvautunut rikki-, happi- tai typpiatomilla, ja

5) aminohaposta peräisin oleva ryhmä,

tai R^6 ja R^7 ovat sitoutuneet toisiinsa ja ovat yhdessä 1 - 3 CH_2-ryhmää;

e) ryhmä, jolla on kaava V,

$$-Q_1-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R^8 \qquad (V)$$

jossa Q_1 on

1) $-(CH_2)_m-$, jossa m on 0, 1, 2, 3 tai 4, tai

2) -CH=CH- ja

R^8 on

1) vetyatomi,

2) C_{1-4}-alkyyli,

3) OH,

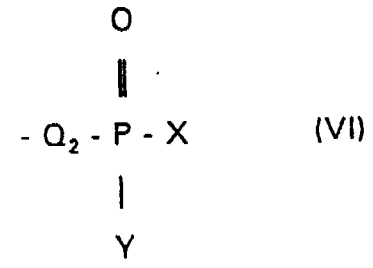
4) -O-C_{1-4}-alkyyli,

5) NH_2,

6) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino tai

7) N-(3,5-dimetyyli-4-hydroksibentsyyli)amino; ja

f) ryhmä, jolla on kaava VI,



(VI)

jossa Q_2 on

1) -$(CH_2)_m$-, jossa m on 0, 1, 2, 3 tai 4, tai

2) -CH=CH- ja

X ja Y ovat kumpikin itsenäisesti

1) C_{1-4}-alkyyli,

2) -O-C_{1-4}-alkyyli tai

3) OH;

...A... on mahdollinen kaksoissidos sillä rajoituksella, että kaksoissidos ja ryhmä R^4 eivät voi olla läsnä samanaikaisesti;

R^4 on

1) vetyatomi tai

2) C_{1-6}-alkyyli tai

R^2 ja R^4 muodostavat yhdessä sen hiiliatomin kanssa, johon ne ovat sitoutuneet, alifaattisen renkaan, joka koostuu 3, 4 tai 5 hiiliatomista; ja

R^3 on

1) vetyatomi,

2) C_{1-4}-alkyyli tai

3) hydroksi-C_{1-4}-alkyyli.

Kaavan I mukaiset yhdisteet voivat olla lääkkeissä optisten isomeerien, diastereomeerien tai rasemaattien muodossa tai niiden seoksina. Mainitut alkyyli- ja alkanoyyliryhmät voivat olla joko suoraketjuisia tai haarautuneita.

Yhdisteitä, joista tämän keksinnön yhteydessä tarkoitetut 5 - 7-jäseniset heterosykliset ryhmät ovat peräisin, ovat esimerkiksi pyrroli, pyridiini, atsepiini, tiatsoli, isotiatsoli, oksatsoli, isoksatsoli, pyratsoli, imidatsoli, tiatsiini, 1,2-oksatsiini, 1,3-oksatsiini, morfoliini, pyridatsiini, pyrimidiini, pyratsiini, 1,2-tiatsepiini, 1,3-tiatsepiini, 1,4-tiatsepiini, 1,2-oksatsepiini, 1,3-oksatsepiini, 1,4-oksatsepiini, 1,2-diatsepiini, 1,3-diatsepiini, 1,4-diatsepiini ja niiden osaksi tai täysin tyydyttyneet muunnokset. Erikoisesti mainittakoon pyrrolidiini, piperidiini, morfoliini, piperatsiini, N-metyylipiperatsiini ja pyridiini.

Termillä "aminohappo" tarkoitetaan seuraavien yhdisteiden stereoisomeerisia muotoja, esimerkiksi D- ja L-muotoja: Asparagiini, valiini, arginiini, asparagiinihappo, glutamiini, glutamiinihappo, tryptofaani, ß-alaniini, lysiini, proliini, glysiini, γ-aminobutyraatti, Nε-asetyylilysiini, Nδ-asetyyliornitiini, Nγ-asetyylidiaminobutyraatti, Nα-asetyylidiaminobutyraatti, histidiini, isoleusiini, leusiini, metioniini, fenyylialaniini, seriini, kysteiini, treoniini, alaniini ja tyrosiini. Edullisia ovat L-aminohapot. Aminohapporyhmät ovat peräisin vastaavista aminohapoista. Aminohapoista käytetään tavanomaisia lyhenteitä. Aminohapporyhmä on sitoutunut amidisidoksella ryhmään -NH- tai esterisidoksella ryhmään -O-.

Seuraavat aminoryhmät ovat edullisia: Gly, Ala, Phe, Ser, Thr, Val, ß-Ala, γ-aminobutyraatti, Asp, Glu, Asn, Gln, Nε-asetyylilysiini, Nδ-asetyyliornitiini, Nγ-asetyylidiaminobutyraatti, Nα-asetyylidiaminobutyraatti, Lys ja Tyr.

Edullinen on sellainen kaavan I mukainen yhdiste ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen fysiologisesti siedettävissä oleva suola ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen stereoisomeerinen muoto, jossa toisella ryhmistä R^1 ja R^2 on kaavan II mukainen merkitys ja toisella jokin seuraavista merkityksistä:

a) 2-pyridyyli,

b) 4-pyridyyli,

c) tiofen-3-yyli,

d) 2-tiatsolyyli

e) ryhmä, jolla on kaava III, jossa

n on luku 0, 1, 2, 3 tai 4,

m on luku 0 tai 1 ja

Z on

1) -O- tai

2) -NH-,

R^5 ja R^6 ovat kumpikin itsenäisesti

1) vetyatomi,

2) C_{1-2}-alkyyli,

3) fenyyli tai

4) OH tai

R^6 ja R^7 ovat sitoutuneet toisiinsa ja muodostavat yhdessä metyleeniryhmän tai

R^7 on

1) vetyatomi,

2) trifluorimetyylisulfonyyli,

3) jokin aminohapporyhmistä Gly, Phe, Ala, Lys, Tyr ja Ser tai

4) ryhmä, jolla on kaava IV, jossa

o on 0 tai 1,

ryhmillä R^9 ja R^{10} on toisistaan riippumattomasti merkitys

1) vetyatomi tai

2) metyyli,

R^{11} on

1) OH,

2) -O-C_{1-4}-alkyyli,

3) C_{1-18}-alkyyli,

4) C_{1-6}-alkyyli, joka sisältää yhden tai useamman substituentin, joka/joista kukin itsenäisesti voi olla

4.1. -COOH,

4.2. -OH tai

4.3. -O-asetyyli,

5) -COOH,

6) -C(=O)-O-C_{1-4}-alkyyli,

7) N-glysyyli,

8) N-glysyyli-C_{1-4}-alkyyliesteri,

9) N-metyylihydroksyyliamino,

10) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino,

11) 5-metyyli-isoksatsol-4-yyli,

12) 1-syaani-2-hydroksi-1-propenyyli tai

13) fenyyli, joka on substituoitu

13.1. 4-(4-morfolinyyli)metyyliryhmällä;

f) ryhmä, jolla on kaava V, jossa

Q_1 on

1) -$(CH_2)_m$-, jossa m on 0, 1 tai 2, tai

2) -CH=CH- ja

R^8 on

1) vetyatomi,

2) metyyli,

3) OH,

4) -O-C_{1-2}-alkyyli,

5) amino,

6) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino tai

7) N-(3,5-dimetyyli-4-hydroksibentsyyli)amino; ja

g) ryhmä, jolla on kaava VI, jossa

Q_2 on

1) -$(CH_2)_m$-, jossa m on 0, 1 tai 2, tai

2) -CH=CH- ja

X ja Y ovat kumpikin itsenäisesti

1) metyyli,

2) -O-C_{1-2}-alkyyli tai

3) OH;

...A... on mahdollinen kaksoissidos sillä rajoituksella, että kaksoissidos ja ryhmä R^4 eivät voi olla läsnä samanaikaisesti;

R^4 on

1) vetyatomi tai

2) C_{1-2}-alkyyli tai

R^2 ja R^4 muodostavat yhdessä sen hiiliatomin kanssa, johon ne ovat sitoutuneet, alifaattisen renkaan, joka koostuu 3, 4 tai 5 hiiliatomista; ja

R^3 on

1) vetyatomi,

2) metyyli tai

3) hydroksimetyyli.

Erityisen edullinen on sellainen kaavan I mukainen yhdiste ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen fysiologisesti siedettävissä oleva suola ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen stereoisomeerinen muoto, jossa toisella ryhmistä R^1 ja R^2 on kaavan II mukainen merkitys ja toisella jokin seuraavista merkityksistä:

a) 2-pyridyyli,

b) 4-pyridyyli,

c) tiofen-3-yyli,

d) 2-tiatsolyyli

e) ryhmä, jolla on kaava III, jossa

n on luku 0, 1, 2, 3 tai 4,

m on luku 0 tai 1 ja

Z on

1) -O- tai

2) -NH-,

R^5 ja R^6 ovat kumpikin itsenäisesti

1) vetyatomi,

2) C_{1-2}-alkyyli tai

3) fenyyli tai

R^6 ja R^7 ovat sitoutuneet toisiinsa ja muodostavat yhdessä metyleeniryhmän tai

R^7 on

1) vetyatomi,

2) trifluorimetyylisulfonyyli,

3) jokin aminohapporyhmistä Gly, Lys ja Phe tai

4) ryhmä, jolla on kaava IV, jossa

o on 0 tai 1,

ryhmillä R^9 ja R^{10} on toisistaan riippumattomasti merkitys

1) vetyatomi tai

2) metyyli,

R^{11} on

1) OH,

2) -O-metyyli tai -O-etyyli,

3) C_{1-18}-alkyyli,

4) C_{1-6}-alkyyli, joka sisältää yhden tai useamman substituentin, joka/joista kukin itsenäisesti voi olla

4.1. -COOH,

4.2. -OH tai

4.3. -O-asetyyli,

5) -COOH,

6) $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-C_{1-2}$-alkyyli,

7) N-glysyyli,

8) N-glysyyli-C_{1-2}-alkyyliesteri,

9) N-metyylihydroksyyliamino,

10) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino,

11) 5-metyyli-isoksatsol-4-yyli tai

12) 1-syaani-2-hydroksi-1-propenyyli;

f) ryhmä, jolla on kaava V, jossa

Q_1 on

1) $-(CH_2)_m-$, jossa m on 0, 1 tai 2, tai

2) -CH=CH- ja

R^8 on

1) vetyatomi,
2) metyyli,
3) OH,
4) -O-metyyli,
5) amino,
6) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino tai
7) N-(3,5-dimetyyli-4-hydroksibentsyyli)amino; ja
g) ryhmä, jolla on kaava VI, jossa

Q_2 on

1) $-(CH_2)_m-$, jossa m on 0 tai 2, tai
2) -CH=CH- ja

X ja Y ovat kumpikin itsenäisesti

1) metyyli,
2) $-O-C_{1-2}$-alkyyli tai
3) OH;

...A... on mahdollinen kaksoissidos sillä rajoituksella, että kaksoissidos ja ryhmä R^4 eivät voi olla läsnä samanaikaisesti;

R^4 on

1) vetyatomi tai
2) metyyli tai

R^2 ja R^4 muodostavat yhdessä sen hiiliatomin kanssa, johon ne ovat sitoutuneet, alifaattisen renkaan, joka koostuu 3, 4 tai 5 hiiliatomista; ja

R^3 on

1) vetyatomi tai
2) hydroksimetyyli.

Aivan erityisen edullisia ovat yhdisteet, jotka on esitetty taulukossa 1 rakennekaavoineen.

Keksintö koskee myös menetelmää 2-isoksatsoliinin tai isoksatsolin, jolla on kaava I, ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen stereoisomeerisen muodon ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen fysiologisesti siedettävissä olevan suo-

lan valmistamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että

a) primaarinen nitroyhdiste muunnetaan isosyanaatin ja katalyyttisen trietyyliamiinimäärän avulla tai hydroksaamihappokloridi, joka on saatu aikaan klooraamalla vastaava aldoksiimi, muunnetaan orgaanisella tai epäorgaanisella emäksellä vastaavaksi nitriilioksidiksi ja tämän välituotteena saatavan nitriilioksidin annetaan puhdistamatta reagoida sopivalla tavalla substituoidun olefiinin tai alkyynin kanssa (1,3-dipolaarinen sykloadditioreaktio), jolloin saadaan 2-isoksatsoliini tai isoksatsoli, jolla on kaava I, ja muodostunut tuote mahdollisesti puhdistetaan kiteyttämällä tai kromatografisesti; tai

b) menetelmällä a tai o valmistettu karboksyylihappoesteri, jolla on kaava I, tai menetelmällä h tai k molekyyliin lisäksi muodostettu esteriryhmä saippuoidaan karboksyylihapoksi; tai

c) menetelmällä a tai o valmistettu karboksyylihapon alkyyliesteri, jolla on kaava I, muunnetaan sopivalla tavalla substituoidulla, primaarisella tai sekundaarisella amiinilla vastaavaksi amidiksi; tai

d) menetelmällä a tai o valmistettu fosfiinihapon monoalkyyli- tai fosfonihapon dialkyyliesteri, jolla on kaava I, saippuoidaan fosfonihappopuoliesteriksi, fosfonihapoksi tai fosfiinihapoksi; tai

e) menetelmällä b aikaansaatu karboksyylihappo muunnetaan ensin aktivoiduksi happojohdokseksi, joka sen jälkeen esteröidään alkoholilla tai muunnetaan primaarisella tai sekundaarisella amiinilla vastaavaksi amidiksi tai N-alkyloidulla hydroksyyliamiinilla vastaavaksi hydroksyyliamidiksi;

f) menetelmässä a, b, h, e, o tai g välivaiheena muodostettu tai mukana kuljetettu N- tai O-atomia suojaava ryhmä poistetaan tai muodostettu tai mukana kuljetettu karboksyyli-, fosfiini-, fosfoni- tai fosforihappoesteri

saippuoidaan sopivalla tavalla ja saadaan aikaan yhdiste, jolla on kaava I; tai

g) menetelmällä f tai o aikaansaatu yhdiste, joka sisältää vapaan aminoryhmän, muunnetaan reaktiolla isosyanaatin kanssa vastaavaksi ureajohdokseksi tai reaktiolla aktivoidun karboksyylihappojohdoksen tai N-suojatun aminohapon kanssa vastaavaksi amidiksi tai reaktiolla sulfonihappokloridin kanssa vastaavaksi sulfonamidiksi; tai

h) menetelmällä a, o tai f aikaansaatu yhdiste, joka sisältää vapaan alkoholiryhmän, muunnetaan reaktiolla isosyanaatin kanssa vastaavaksi uretaaniksi tai reaktiolla sellaisen karboksyylihappojohdoksen, joka sisältää aktivoidun karboksyylihapon ja mahdollisesti muita funktionaalisia ryhmiä, tai vastaavan N-suojatun aminohappojohdoksen kanssa vastaavaksi esteriksi tai reaktiolla diketeenin kanssa vastaavaksi 3-oksobutyraatiksi tai reaktiolla halogeeniyhdisteen kanssa, kuten α-halogeenikarboksyylihapon kanssa, vastaavaksi eetteriksi; tai

i) menetelmällä a, o tai f aikaansaatu yhdiste, joka sisältää primaarisen tai sekundaarisen alkoholiryhmän, hapetetaan aldehydiksi tai ketoniksi; tai

k) menetelmällä i valmistettu karbonyyliyhdiste muunnetaan reaktiolla emäksen ja dialkyylifosfonoetikkahappoesterin kanssa vastaavaksi krotonihappojohdokseksi tai reaktiolla tetra-alkyylimetyleenidifosfonaatin kanssa vastaavaksi trans(2-dialkoksifosfono)vinyylijohdokseksi; tai

l) sykloadditiossa muodostunut epoksidiryhmä muunnetaan vastaavaksi 1,2-dioliksi; tai

m) menetelmällä g valmistettu amidi, joka sisältää 3H-isoksatsolirenkaan, muunnetaan vastaavaksi substituoiduksi 2-syaani-3-hydroksikrotonihappoamidiksi käsittelemällä se emäksellä renkaan avaamiseksi; tai

n) jollakin menetelmistä a - m valmistettu yhdiste, jolla on kaava I ja joka kemiallisen rakenteensa johdosta

esiintyy enantiomeerisessa muodossa, erotetaan puhtaiksi enantiomeereiksi muodostamalla suoloja enantiomeerisesti puhtaiden happojen tai emästen kanssa, kromatografisesti käyttämällä kiraalisia stationaarifaaseja tai muodostamalla johdoksia kiraalisten, enantiomeerisesti puhtaiden yhdisteiden avulla, kuten aminohappojen avulla, erottamalla siten aikaansaadut diastereomeerit ja poistamalla kiraalinen apuryhmä; tai

o) sykloadditiolla kiraaliseen tai raseemiseen olefiiniin aikaansaatu kaavan I mukaisten 2-isoksatsoliinidiastereomeerien seos erotetaan kromatografisesti silikageelipylväässä puhtaiksi diastereomeereiksi; tai

p) jollakin menetelmistä a - o valmistettu yhdiste, jolla on kaava I, joko eristetään vapaassa muodossa tai, jos siinä esiintyy happamia tai emäksisiä ryhmiä, mahdollisesti muunnetaan fysiologisesti hyväksyttäväksi suolakseen: tai

q) menetelmällä h valmistettu yhdiste, joka sisältää toisenkin funktionaalisen ryhmän, kuten halogeenimetyyliryhmän, alkyloidaan primaarisella tai sekundaarisella aminoryhmällä tai eetteröidään alkoholilla.

Fysiologisesti siedettävissä olevien suolojen valmistus sellaisista kaavan I mukaisista yhdisteistä, jotka kykenevät muodostamaan suoloja, niiden stereoisomeeriset muodot mukaan luettuina, tapahtuu sinänsä tunnetulla tavalla. Karboksyylihapot, fosfoni- ja fosfiinihapot sekä fosfonihappopuoliesterit muodostavat emäksisten reagenssien, kuten hydroksidien, karbonaattien, vetykarbonaattien, alkoholaattien ja ammoniakin, ja orgaanisten emästen, esimerkiksi trimetyyli- ja trietyyliamiinin, etanoliamiinin sekä myös emäksisten aminohappojen, esimerkiksi lysiinin, ornitiinin ja arginiinin, kanssa stabiileja alkalimetalli-, maa-alkalimetalli- tai, mahdollisesti substituoituja, ammoniumsuoloja. Mikäli kaavan I mukaiset yhdisteet sisältävät ryhmässä R^1 tai R^2 emäksisiä ryhmiä,

voidaan vahvoja happoja käyttämällä valmistaa myös stabiileja happoadditiosuoloja. Tähän tarkoitukseen soveltuvat sekä epäorgaaniset että orgaaniset hapot, kuten vetykloridi, vetybromidi ja rikki-, fosfori-, metaanisulfoni-, bentseenisulfoni-, p-tolueenisulfoni-, 4-bromibentseenisulfoni-, sykloheksyyliamidosulfoni-, trifluorimetyylisulfoni-, etikka-, oksaali-, viini- ja trifluorietikkahappo.

1,3-dipolaarisissa sykloadditioissa lähtöaineina käytettävien nitriilioksidien valmistusta ja reaktiota on kuvattu eräässä aktuellissa monografiassa (K. P. G. Torselli, Nitrile Oxides, Nitrones and Nitronates in Organic Synthesis, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1988). Esiasteina toimivat hydroksamoyylihalogenidit voidaan valmistaa kirjallisuudesta tutuin menetelmin halogenoimalla vastaavat aldoksiimit tai kloorioksi-iminoetikkahappoestereiden tapauksessa diatsotointireaktiolla glysiinin alkyyliestereistä [G. S. Skinner, J. Am. Chem. Soc. 64 (1924) 731]. Käytettäessä aldoksiimien klooratuksessa t-butyylihypokloriittia voidaan jättää vastaavien hydroksamoyylikloridien eristys tekemättä. Niin ikään käytettävät nitroyhdisteet ovat osaksi kirjallisuuden perusteella tunnettuja tai valmistettavissa periaatteessa kirjallisuudesta tutuin menetelmin, esimerkiksi 4-nitrovoihappoesterit liittämällä nitrometaani fluoridi- tai emäskatalysoidulla additioreaktiolla akryylihappojohdoksiin (D. W. Chasar, Synthesis 1982, 841 - 842; N. Ono, Synthesis 1984, 226 - 227). Käyttämällä emäksenä 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeniä (DBU) ja toteuttamalla reaktio tietyllä tavalla voidaan kirjallisuudessa mainittuja saantoja parantaa oleellisesti ja voidaan estää suurelta osin bisadditiosivutuotteiden syntyminen, jotka ovat tavallisesti vaikeasti erotettavissa.

Reaktiokomponentteina lisäksi käytettävät, mahdollisesti substituoidut, alkeeni- tai alkyynijohdokset ovat periaatteessa enimmäkseen kirjallisuuden perusteella tun-

nettuja tai jopa kaupan olevia yhdisteitä. Asianomaiset viitteet on esitetty esimerkeissä. Helposti oligomeroituvien nitriilioksidien valmistus tapahtuu edullisesti *in situ* olefiinisen tai asetyleenisen reaktiokomponentin läsnä ollessa ilman välieristystä. Valmistettaessa nitroyhdisteitä Mukaiyaman menetelmällä käytetään veden lohkaisuun edullisesti aromaattisia isosyanaatteja, esimerkiksi fenyyli-isosyanaattia tai di-isosyanaattobentseeniä. Tällöin on suositeltavaa toteuttaa reaktio reagoivien aineosien suhteen inertissä aproottisessa liuotteessa tai dispergointiaineessa, kuten etyyliasetaatissa, dimetyyliformamidissa, dimetyyliasetamidissa, dialkyylieetterissä, tetrahydrofuraanissa, halogenoidussa hiilivedyssä, esimerkiksi dikloorimetaanissa, kloroformissa tai dikloorietaanissa, hiilivedyssä, kuten heksaanissa, sykloheksaanissa, bentseenissä, tolueenissa tai muussa substituoidussa aromaattisessa hiilivedyssä, jolloin kysymykseen tulevat myös edellä mainittujen liuotteiden seokset. Nitriilioksidien valmistamisessa hydroksamoyylihalogenideista käytetään orgaanisia tai epäorgaanisia emäksia, kuten tertiaarisia amiineja tai alkalimetallikarbonaatteja tai -hydroksideja. Tällöin orgaanisia emäksiä käytettäessä reaktio toteutetaan edullisesti edellä mainituissa, mahdollisesti klooratuissa, alifaattisissa tai aromaattisissa hiilivedyissä tai alifaattisissa (sykliset mukaan luettuina) eettereissä, kun taas epäorgaanisia emäksiä käytettäessä reaktio voidaan lisäksi toteuttaa myös kahdesta faasista koostuvissa liuoteseoksissa, esimerkiksi etyyliasetaatti-vesi- tai dikloorimetaani-vesiseoksessa. Nitriilioksidien valmistus ja sykloadditio toteutetaan yleensä lämpötila-alueella -20 - +80 °C, edullisesti kuitenkin lämpötilassa 0 - 40 °C.

Sykloadditiossa mukana kuljetettujen tai lisäreaktioilla myöhemmin muodostettujen alkyyliestereiden saippuointi vastaaviksi karboksyylihapoiksi tehdään yleensä

vettä sisältävällä alkalilla, jota voidaan käyttää ekvivalenttinen moolimäärä tai ylimäärin, vesiliuoksessa tai, jos lähtöaine on veteen huonosti liukeneva, veden ja orgaanisen liuotteen seoksessa, jossa tapauksessa erityisen edullisiksi ovat osoittautuneet vesi-alkoholiseokset.

Yleiskaavan I mukaisissa yhdisteissä esiintyvien substituenttien R^1 ja R^2 mukana tulleet amiinia, alkoholia tai karboksyylihappoa suojaavat ryhmät poistetaan useimmiten peptidikemiasta tutuin menetelmin, jolloin edullisesti käytettävän t-butoksikarbonyyliryhmän tapauksessa poisto hapolla, esimerkiksi vetykloridin tai trifluorietikkahapon alkoholiliuoksella, on edullista, kun taas alemmat alkyyliesteriryhmät poistetaan edullisesti emäksellä. Fosfonihappo- ja fosfiinihappoestereiden muunto vapaiksi hapoiksi tehdään happamissa olosuhteissa, edullisesti vedettömässä väliaineessa, esimerkiksi vetybromidia käyttämällä orgaanisessa hapossa, kuten etikkahapossa, tai trimetyylibromisilaania tai trimetyylijodisilaania käyttämällä aproottisessa liuotteessa, jolloin käytetään edullisesti halogenoituja hiilivetyjä. Säästävässä poistossa reaktiolämpötila on edullisesti alueella 0 - 50 °C. Fosfonihappopuoliestereiden valmistamiseksi fosfonihappodiesterit yleensä hydrolysoidaan emäksillä.

Yleiskaavan I mukaiset yhdisteet, jotka sisältävät substituentissa R^1 tai R^2 vapaan karboksyyliryhmän, voidaan muuntaa karboksyyliryhmän asianmukaisen aktivoinnin jälkeen primaarisilla tai sekundaarisilla amiineilla tai myös N-alkyloiduilla hydroksyyliamiineilla tai 5-aminotetratsolilla sinänsä tunnetulla tavalla vastaaviksi amideiksi.

Yleiskaavan I mukaiset yhdisteet, jotka sisältävät substituentissa R^1 tai R^2 vapaan funktionaalisen alkoholi- tai amiiniryhmän, voidaan muuntaa aktivoiduilla karboksyylihappojohdoksilla, kuten happohalogenideilla tai -anhydrideillä, vastaaviksi esteri- tai amidijohdoksiksi. Myös N-suojatuista aminohapoista voidaan saada aikaan vastaavia

estereitä tai amideja. Aminohappokomponentin aktivointiin käytetään tässä tapauksessa edullisesti peptidikemiasta tuttuja menetelmiä, esimerkiksi hydroksibentsotriatsolidisykloheksyylikarbodi-imidimenetelmää [W. König ja R. Geiger, Chem. Ber. 103 (1970) 2034 - 2040] tai menetelmää, jossa aktivointi tehdään propaanifosfonihappoanhydridillä (PPA), jolloin liuotteina voidaan käyttää alifaattisten ja syklisten eettereiden ohella myös kloorattuja hiilivetyjä sekä dimetyyliformamidia. Apuemäksinä ovat edullisia tertiaariset amiinit, kuten trietyyliamiini, N-etyylimorfoliini ja pyridiini. Työskentelylämpötila on alueella -10 - +50 °C, edullisesti 0 - +20 °C.

Haluttaessa muuntaa suojatussa muodossa olevat asyylijohdokset vapaan funktionaalisen amino- tai karboksyyliryhmän sisältävään muotoon asianomaiset suojausryhmät voidaan poistaa erikseen tai myös yhdessä edellä jo kuvatuin tavoin.

Yleiskaavan I mukaiset yhdisteet, jotka sisältävät substituentissa R^1 tai R^2 vapaan funktionaalisen alkoholi- tai amiiniryhmän, voidaan lisäksi muuntaa uretaani- tai ureajohdoksiksi liittämällä ne (additioreaktio) sopivalla tavalla substituoituihin isosyanaatteihin. Isosyanaattiadditiossa mahdollisesti mukana kuljetetut tai funktionaaliseksi lisäryhmiksi muodostetut esteriryhmät voidaan, kuten edellä kuvattiin, muuntaa vastaaviksi karboksyylihapoiksi.

Yhdisteet, jotka sisältävät vapaan, primaarisen tai sekundaarisen alkoholiryhmän, voidaan hapettaa yksinkertaisella tavalla "Swernin hapetuksena" tunnetulla menetelmällä dimetyylisulfoksidin ja oksalyylikloridin avulla vastaaviksi aldehydeiksi tai ketoneiksi. Toteuttamalla reaktio sopivalla tavalla matalassa lämpötilassa voidaan tällöin välttää sivureaktiot, kuten fenolirenkaan hapettuminen tai hapettumisen aiheuttama 2-isoksatsoliinirenkaan hajoaminen. Siten aikaansaatavat karbonyyliyhdisteet voidaan muuntaa emäksillä tai happaman CH-ryhmän sisältävil-

lä yhdisteillä, kuten dialkyylifosfonoetikkahapon alkyyliestereillä tai tetra-alkyylimetyleenidifosfonaatilla, kondensaation kautta sopivalla tavalla substituoiduiksi trans-olefiineiksi.

Siinä tapauksessa, että yleiskaavan I mukaiset yhdisteet esiintyvät diastereomeerisissa tai enantiomeerisissa muodoissa ja saadaan käytettävässä synteesissä niiden seoksina, erotus puhtaiksi stereoisomeereiksi tehdään joko kromatografisesti kantajalla, joka mahdollisesti on kiraalinen, tai, mikäli kaavan I mukaiset raseemiset yhdisteet kykenevät muodostamaan suoloja, jakokiteyttämällä diastereomeeriset suolat, jotka muodostetaan käyttämällä apuaineena optisesti aktiivista emästä tai happoa. Kiraalisiksi stationaarifaaseiksi yleensä raseemisessa muodossa saatavien 2-isoksatsoliinien, jotka sisältävät 5-asemassa asymmetrisen C-atomin, enantiomeerien erotukseen ohutkerros- tai pylväskromatografisesti soveltuvat esimerkiksi muunnetut silikageelikantajat (ns. Pirkle-faasit) sekä suurimolekyyliset hiilihydraatit, esimerkiksi triasetyyliselluloosa. Analyysitarkoituksiin voidaan käyttää asianmukaisen, ammattimiehelle tutun derivatisoinnin jälkeen, myös kaasukromatografiamenetelmiä, joissa käytetään kiraalisia stationaarifaaseja. Raseemisten karboksyylihappojen, fosfonihappojen ja fosfiinihappojen enantiomeerien erottamiseksi muodostetaan optisesti aktiivisten, yleensä kaupan olevien, emästen avulla, esimerkiksi (-)-nikotiinin, (+)- ja (-)-fenyylietyyliamiinin, kiniiniemästen, L-lysiinin tai L- ja D-arginiinin avulla, liukoisuudeltaan erilaiset diastereomeeriset suolat, vaikeammin liukeneva komponentti erotetaan kiinteänä aineena, helpommin liukeneva diastereomeeri saostetaan emäliuoksesta ja siten saaduista diastereomeerisista suoloista saadaan puhtaita enantiomeereja.

Periaatteessa samalla tavalla voidaan kaavan I mukaiset raseemiset yhdisteet, jotka sisältävät emäksisen

ryhmän, kuten aminoryhmän, muuntaa optisesti aktiivisilla hapoilla, kuten (+)-kamferi-10-sulfonihapolla, D- ja L-viinihapolla, D- ja L-maitohapolla tai (+)- ja (-)-mantelihapolla, puhtaiksi enantiomeereiksi. Myös kiraaliset yhdisteet, jotka sisältävät funktionaalisia alkoholi- tai amiiniryhmiä, voidaan muuntaa sopivalla tavalla aktivoiduilla tai mahdollisesti N-suojatuilla, enantiomeerisesti puhtailla aminohapoilla vastaaviksi estereiksi tai amideiksi tai kääntäen kiraaliset karboksyylihapot, voidaan muuntaa enantiomeerisesti puhtailla aminohapolla, joiden karboksyyliryhmä on suojattu, amideiksi tai enantiomeerisesti puhtailla hydroksikarboksyylihapoilla, kuten maitohapolla, vastaaviksi kiraalisiksi estereiksi. Enantiomeerisesti puhtaassa muodossa molekyyliin tuodun aminohappo- tai alkoholiryhmän kiraalisuutta voidaan sitten käyttää hyväksi isomeerien erottamisessa toteuttamalla nyt esiintyvien diastereomeerien erotus kiteyttämällä tai kromatografisesti sopivia stationaarifaaseja käyttäen ja lohkaisemalla sen jälkeen mukana tullut kiraalinen molekyylin osa taas pois sopivin menetelmin.

Keksintö koskee myös lääkkeitä, joille on tunnusomaista, että ne sisältävät vaikuttavan määrän ainakin yhtä yhdistettä, jolla on kaava I, ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen stereoisomeerista muotoa ja/tai kaavan I mukaisen yhdisteen fysiologisesti siedettävissä olevaa suolaa farmaseuttisesti sopivien ja fysiologisesti siedettävissä olevien kantaja-aineiden, lisäaineiden ja/tai vaikuttavien aineiden ja apuaineiden ohella. Keksinnön mukaisia lääkkeitä voidaan antaa laskimonsisäisesti, parenteraalisesti, ulkoisesti, peräsuolen kautta tai suun kautta.

Keksinnön mukaiset lääkkeet soveltuvat edullisesti astmasairauksien, tulehdusten ja autoimmuunisairauksien ennaltaehkäisyyn ja/tai hoitoon.

Mainittuihin sairauksiin kuuluvat esimerkiksi reumasairaudet, lihasten, nivelten sekä mahalaukun ja suolis-

ton akuutit ja krooniset tulehdukset, allergiset hengitystiesairaudet, psoriasis ja autoimmuunisairaudet, esimerkiksi systeeminen *Lupus erythematoides* (SLE), tyyppiä II oleva diabetes, *Myastenia gravis*, Sjögrenin syndrooma, dermatomyosiitti, sklerodermia ja multippeliskleroosi (MS).

Keksintö koskee myös menetelmää keksinnön mukaisen lääkkeen valmistamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että ainakin yksi yhdiste, jolla on kaava I, yhdistetään farmaseuttisesti sopivan ja fysiologisesti siedettävissä olevan kantajan ja mahdollisesti muiden sopivien vaikuttavien aineiden, lisäaineiden tai apuaineiden kanssa sopivaksi antomuodoksi.

Sopivia galeenisten valmisteiden kiinteitä tai nestemäisiä muotoja ovat esimerkiksi granulaatit, pulverit, rakeet, tabletit, (mikro)kapselit, peräpuikot, siirapit, tinktuurat, suspensiot, emulsiot, tipat ja injektoitavissa olevat liuokset samoin kuin valmisteet, jotka vapauttavat vaikuttavaa ainetta hidastetusti, joiden muotojen valmistuksessa voidaan käyttää tavanomaisia apuaineita, kuten kantaja-aineita, hajotusaineita, sideaineita, päällystysaineita, paisutteita, liuku- tai voiteluaineita, makuaineita, makeutteita ja liukenemista edistäviä aineita. Yleisesti käytettyinä apuaineina mainittakoon esimerkiksi magnesiumkarbonaatti, titaanidioksidi, laktoosi, mannitoli ja muut sokerit, talkki, maidonvalkuainen, gelatiini, tärkkelys, selluloosa ja sen johdokset, eläin- ja kasviöljyt, kuten kalanmaksaöljy, aurongonkukkaöljy, maapähkinäöljy ja seesamiöljy, polyeteeniglykolit ja liuotteet, kuten esimerkiksi steriili vesi ja yhden- tai monenarvoiset alkoholit, esimerkiksi glyseroli.

Edullisesti farmaseuttisista valmisteista muodostetaan annostusyksikköjä ja ne annetaan sellaisina, jolloin kukin yksikkö sisältää vaikuttavana aineosana määrätyn annoksen keksinnön mukaista yhdistettä, jolla on kaava I.

Kiinteiden annostusyksikköjen, kuten tablettien, kapselien, rakeiden tai peräpuikkojen, tapauksessa kyseinen annos voi olla jopa noin 1 000 mg mutta on edullisesti noin 50 - 300 mg ja ampullien muodossa olevien injektioliuosten tapauksessa voi olla jopa noin 300 mg mutta on edullisesti noin 10 - 100 mg.

Aikuisen noin 70 kg painavan potilaan hoitamiseksi tarvittavat vuorokausiannokset ovat, kulloinkin käytettävän kaavan I mukaisen yhdisteen tehon mukaan, ihmisten ja eläinten tapauksessa noin 50 - 3 000 mg, edullisesti noin 150 - 1 000 mg, vaikuttavaa ainetta suun kautta annettaessa ja noin 50 - 1 000 mg, edullisesti noin 100 - 300 mg, laskimonsisäisesti annettaessa. Tietyissä tapauksissa voidaan kuitenkin käyttää myös suurempia tai pienempiä vuorokausiannoksia. Vuorokautinen annos voidaan antaa joko kerralla yhden ainoan annostusyksikön muodossa tai useampana pienempänä annostusyksikkönä tai myös osa-annoksina useammassa erässä määrätyin väliajoin. Lisäksi edellä mainittuja galeenisia antomuotoja valmistettaessa kaavan I mukaisiin yhdisteisiin ja/tai haluttaessa niiden fysiologisesti siedettävissä oleviin suoloihin voidaan lisäksi yhdistää myös muita sopivia vaikuttavia aineita, esimerkiksi verenkiertoa parantavia aineita, verihiutaleiden aggregoitumista estäviä aineita, trombosyyttien aggregoitumista estäviä aineita, kalsiumantagonisteja, antitrombboottisia aineita, veren lipidipitoisuutta alentavia aineita, neuroprotektiivisia aineita, analgeetteja, sedatiiveja, antidepressantteja, anti-inflammatorisia aineita, *angina pectoris* -lääkkeitä, kardiotonisia aineita, rytmihäiriölääkkeitä, diureetteja, verenpainetta alentavia aineita beetasalpaajat ja kalsiuminestäjät mukaan luettuina, plasman tilavuutta lisääviä aineita ja muita verisuonilääkkeitä.

Yhteenveto alla annettujen valmistusesimerkkien rakennekaavoista sekä sulamislämpötiloista ja ^{1}-NMR-spektritiedoista on esitetty taulukossa 1. Siinä tapauksessa,

että esiintyy stereoisomeerisia muotoja, rakennekaavoissa on ilmoitettu konfiguraatioiden suhde. Jäljempänä esitettyjen NMR-spektrien delta-arvot on ilmoitettu ppm:inä.

Esimerkki 1

3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-5-hydroksimetyyli-2-isoksatsoliini

a) 3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyyli)bentsaldoksiimi

Oksiimi valmistettiin kirjallisuudesta tutuin menetelmin (Houben-Weyl, Meth. d. Org, Chem., osa X/4, sivulta 55 alkaen) käyttäen lähtöaineena 3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyyli)bentsaldehydiä.

b) 1,3-dipolaarinen sykloadditio nitriilioksidia käyttäen

Vaiheessa a valmistettu aldoksiimi (24,9 g, 0,1 mol) liuotettiin dikloorimetaaniin (250 ml), lisättiin pisaroittain t-butyylihypokloriittia (12,0 g, 0,11 mol) samalla jäähdyttäen ja lisäyksen päätyttyä seosta jälkisekoitettiin vielä 45 minuuttia huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen kun oli lisätty allyylialkoholia (11,6 g, 0,2 mol), lisättiin hitaasti (6 tunnin aikana) pisaroittain trietyyliamiinia (16,7 ml, 0,12 mol) liuotettuna dikloorimetaaniin (150 ml). Seosta sekoitettiin yön yli, se pestiin vedellä, sitruunahapon laimealla vesiliuoksella ja NaCl-liuoksella, kuivattiin natriumsulfaatilla ja väkevöitiin alennetussa paineessa. Tuote saatiin kiteisessä muodossa t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta kiteyttämällä. Saanto: 13,1 g.

Jäljempänä olevassa taulukossa 1 esitetyt esimerkkiyhdisteet 2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 44, 48, 66, 67, 68, 69, 78, 79 ja 80 valmistettiin esimerkkiä 1 vastaavalla tavalla liittämällä (sykloadditio) *in situ* valmistetut nitriilioksidit sopiviin olefiineihin tai alkyyneihin.

Aluksi öljymäisinä saatavien raakatuotteiden puhdistuksessa ovat lisäksi osoittautuneet hyviksi kromatografinen käsittely silikageelillä t-butyylimetyylieetteriliuotebensiini- tai etyyliasetaatti-liuotebensiiniseoksia käyttäen ja sitä seuraava kiteytys.

Taulukossa 1 esitettyjen esimerkkiyhdisteiden valmistukseen liittyviä erityisseikkoja:

Esimerkki 2:

Olefiinikomponentin valmistusta on kuvattu julkaisussa EP 0 220 573.

Esimerkki 8:

3-vinyylitiofeeni: CAS-nro 13679-64-6

Esimerkki 11:

Sykloadditio akryylihapon metyyliesteriin. Muunto amidiksi tapahtui käyttämällä ylimäärin ammoniakin kylläistä metanoliuosta huoneenlämpötilassa.

Esimerkki 14:

Sykloadditio N-(3,5-dimetyyli-4-hydroksibentsyyli)-metakryyliamidiinin (synteesiä kuvattu julkaisussa DE 3 820 699).

Esimerkki 15:

Ei-stereoselektiivisen sykloaddition vuoksi tuote saadaan diastereomeerien seoksena.

Esimerkit 16 ja 17:

Sykloadditiossa butadieenimonoksidiin syntyvä raseeminen erytro- ja treo-diastereomeerin seos erotettiin diastereomeereiksi silikageelikromatografian avulla liuotebensiini-etyyliasetaattiseosta (9:1) käyttäen ja sen jälkeen kiteyttämällä (esimerkki 16: ras. erytro-isomeeri; esimerkki 17: ras. treo-isomeeri).

Esimerkit 18 - 20:

Sykloadditiossa 1-buten-3-oliin syntyvä raseeminen erytro- ja treo-diastereomeerin seos (esim. 18) erotettiin diastereomeereiksi silikageelikromatografian avulla liuotebensiini-t-butyylimetyylieetteriseosta (5:1) käyttäen

(esimerkki 19: ras. erytro-isomeeri; esimerkki 20: ras. treo-isomeeri).

Esimerkit 21 ja 22:

Sykloadditiossa 1-buten-3-oliasetaattiin syntyvä raseeminen erytro- ja treo-diastereomeerin seos erotettiin diastereomeereiksi silikageelikromatografian avulla liuotebensiini-etyyliasetaattiseosta (19:1) käyttäen (esimerkki 21: ras. erytro-isomeeri; esimerkki 22: ras. treo-isomeeri).

Esimerkki 23:

Sykloadditio toteutettiin käyttämällä akryylihapon t-butyyliesteriä. Tert.butyyliesteriryhmä poistettiin trifluorietikkahapolla dikloorimetaanissa huoneenlämpötilassa. Haihdutuksen jälkeen tuote voitiin kiteyttää t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta.

Esimerkki 35:

Olefiinikomponentin valmistusta on kuvattu julkaisussa EP 0 220 573.

Esimerkki 48:

Sykloadditio toteutettiin käyttämällä N-(t-butoksikarbonyyli)propargyyliamiinia. N-suojausryhmä poistettiin sitten trifluorietikkahapolla. Tuote kyettiin kiteyttämään trifluoriasetaattina metanoli-t-butyylimetyylieetteriseoksesta. Vapaa emäs saatiin uuttamalla se laimeasta NaOH-liuoksesta dikloorimetaanilla ja kuivaamalla ja väkevöimällä orgaaninen faasi.

Esimerkki 78:

Sykloadditio toteutettiin käyttämällä 6-hepteeni-2,4-diolia. Silikageelikromatografian avulla, jossa käytettiin eluenttina t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseosta, ja sen jälkeen edellä mainituista liuotteista moneen kertaan kiteyttämällä saatiin NMR-spektrin mukaan isomeerisesti puhdasta tuotetta.

Esimerkit 79 ja 80:

Sykloadditio toteutettiin esimerkkiä 1 vastaavalla tavalla käyttäen ylimäärin 1,6-heptadien-4-olia. Diaste-

reomeerit erotettiin silikageelikromatografian avulla liuotebensiini-etyyliasetaattiseoksia (gradientti 6:1 - 2:1) käyttäen. Treo- ja erytro-isomeerin paikantaminen ei ollut NMR-spektrometrisesti mahdollista.

Esimerkki 3

2-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yylimetoksi]metyylipropionihappo

Esimerkissä 2 saatu tuote (4,0 g, 0,0095 mol) liuotettiin metanoliin (80 ml), lisättiin NaOH:n 1 N vesiliuosta (25 ml) ja saippuoitumisen päätyttyä (TLC-seuranta) seos tehtiin happamaksi 1 N HCl:lla (25 ml). Saostunut tuote suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin. Saanto: 3,0 g.

Esimerkki 4

N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yylimetoksikarbonyyli]glysiini

a) Reaktio isosyanaatin kanssa

Esimerkissä 1 saatu tuote (5,5 g, 0,018 mol) liuotettiin dikloorimetaaniin (5 ml), lisättiin etyyli-isosyanaattoasetaattia (3,2 g, 0,025 mol) ja trietyyliamiinia (noin 4 pisaraa) ja seos kuumennettiin lämpötilaan 50 - 60 °C samalla sekoittaen. Reaktion päätyttyä (TLC-seuranta) seos väkevöitiin ja käsiteltiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseosta. Saanto: 7,2 g öljymäistä tuotetta.

b) Etyyliesterin saippuointi

Vaiheessa a saatu tuote (7,2 g) saippuoitiin, kuten esimerkissä 3 on kuvattu, ylimäärällä 1 N NaOH-liuosta ja eristettiin hapotuksen jälkeen kiteisessä muodossa. Saanto: 4,56 g.

Esimerkki 6

3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yylifosfonihappo

Esimerkissä 5 saatua tuotetta (5,0 g, 0,013 mol) käsiteltiin huoneenlämpötilassa liuoksella (100 ml), joka

sisälsi 33 % HBr:a etikkahapossa, kunnes reaktio oli mennyt loppuun (TLC-seuranta). Väkevöinnin jälkeen jäänyttä jäännöstä sekoitettiin t-butyylimetyylieeterin kanssa. Saanto: 3,15 g.

Esimerkki 7

3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yylifosfonihapon monometyyliesteri

Esimerkissä 5 saatu tuote (5,0 g, 0,013 mol) liuotettiin huoneenlämpötilassa metanoliin (100 ml), lisättiin 30 ml 1 N NaOH-liuosta ja seosta sekoitettiin 15 tuntia (TLC-seuranta). Hapotuksen (1 N HCl) jälkeen seos uutettiin dikloorimetaanilla, orgaaninen faasi pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivattiin ja väkevöitiin. Jäännös kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 3,4 g.

Esimerkit 21 ja 22 (vaihtoehtoinen synteesi)

Etikkahappo-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-oksatsolin-5-yyli]etyyliesteri

Esimerkissä 19 tai 20 saatu tuote (2,5 g, 0,008 mol) liuotettiin dikloorimetaanin (100 ml) ja pyridiinin (6 ml) seokseen. 4-dimetyyliaminipyridiinin (125 mg) lisäyksen jälkeen lisättiin pisaroittain ja samalla jäillä jäähdyttäen asetyylikloridia (1,35 ml, 0,024 mol) liuotettuna dikloorimetaaniin (10 ml), ja reaktion päätyttyä (TLC-seuranta) seos pestiin vedellä, kaliumvetysulfaatin vesiliuoksella ja vedellä, kuivattiin ja väkevöitiin. Jäljelle jäänyt öljy kyettiin kiteyttämään t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta.

Esimerkki 33

{1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]-1-metyylietoksi}etikkahapon etyyliesteri

Esimerkissä 29 saatu tuote (10,0 g, 0,03 mol), joka oli liuotettu vedettömään dimetyyliformamidiin (40 ml), lisättiin suojakaasun alla ja samalla jäillä jäähdyttäen pisaroittain suspensioon, joka sisälsi natriumhydridiä

(1,06 g, 0,044 mol) vedettömässä dimetyyliformamidissa (30 ml). 30 lisäminuutin (ilman jäähdytystä) kuluttua lisättiin pisaroittain bromietikkahapon etyyliesteriä (10,8 g, 0,044 mol) liuotettuna vedettömään dimetyyliformamidiin (30 ml), ja seosta jälkisekoitettiin vielä 4 tuntia. Reaktioseos kaadettiin jään sekaan ja uutettiin etyyliasetaatilla, ja orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin ja väkevöitiin. Öljymäinen jäännös kiteytettiin liuotebensiinistä. Saanto: 6,8 g.

Esimerkki 34

{1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]-1-metyylietoksi}etikkahappo

Esimerkissä 33 saatu tuote (3,7 g, 0,009 mol) saippuoitiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla. Saanto: 2,9 g.

Esimerkki 36

2-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetoksi]-2-metyylipropionihappo

Esimerkissä 35 saatu tuote (9,5 g, 0,023 mol) saippuoitiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla. Saanto: 6,6 g.

Esimerkki 37

N-metyylihydroksamoyyli-2-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetoksi]-2-metyylipropionaatti

Esimerkissä 36 saatu tuote (4,0 g, 0,01 mol) muunnettiin kirjallisuudessa (EP 0 199 151) esitetyn ohjeen mukaisesti johdannaisekseen oksaalihappokloridilla ja N-metyylihydroksyyliamiinilla. Tuote kiteytettiin t-butyylimetyylieetteristä. Saanto: 2,7 g.

Esimerkki 38

2-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetoksi]-N-(1H-tetratsol-5-yyli)isovoihappoamidi

Esimerkissä 36 saatu tuote (6,0 g, 0,015 mol) muunnettiin kirjallisuudessa [J. Org. Chem. 34 (1969) 2766 - 2767] esitetyn ohjeen mukaisesti johdannaisekseen piitetrakloridilla (1,7 ml, 0,015 mol) ja 5-aminotetratsolilla

(1,25 g, 0,015 mol) vedettömässä pyridiinissä. Tuote kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 3,9 g.

Esimerkki 39

N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetoksikarbonyyli]glysiinin metyyliesteri

Esimerkissä 24 saadun tuotteen (14,0 g, 0,046 mol) annettiin reagoida esimerkkiä 4a vastaavalla tavalla. Jäljelle jäänyt öljy puhdistettiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseosta (1:4). Saanto: 16,4 g.

Esimerkki 40

N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetoksikarbonyyli]glysiini

Esimerkissä 39 saatu tuote (7,1 g, 0,06 mol) saippuoitiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla. Saanto: 4,1 g.

Esimerkki 41

N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylipropoksikarbonyyli]glysiinin etyyliesteri

Esimerkissä 26 saadun tuotteen (8,0 g, 0,024 mol) annettiin reagoida esimerkkiä 4a vastaavalla tavalla. Jäljelle jäänyt öljy puhdistettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta kiteyttämällä. Saanto: 6,1 g.

Esimerkki 42

N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylipropoksikarbonyyli]glysiini

Esimerkissä 41 saatu tuote (4,0 g, 0,0089 mol) saippuoitiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla. Saanto: 2,8 g.

Esimerkki 43

N-[2-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylietoksikarbonyyli]glysiini

Esimerkissä 25 saadun tuotteen (6,25 g) annettiin reagoida esimerkkiä 4a vastaavalla tavalla. Jäljelle jäänyt tuote saippuoitiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla,

ja tuote puhdistettiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina t-butyylimetyylieetteriä ja kiteyttämällä se lopuksi t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 3,8 g.

Esimerkki 45

3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylipropionihappo

Esimerkissä 44 saatu tuote (4,3 g, 0,011 mol) saippuoitiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla. Saanto: 3,0 g.

Esimerkki 46

3-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]-N-(1H-tetratsol-5-yyli)isopropionihappoamidi

Esimerkissä 45 saatu tuote (7,0 g, 0,02 mol) muunnettiin esimerkkiä 38 vastaavalla tavalla johdannaisekseen piitetrakloridilla ja 5-aminotetratsolilla vedettömässä pyridiinissä. Tuote kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 6,5 g.

Esimerkki 47

3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyliakryylihappo

a) Swernin hapetus aldehydiksi

Oksalyylikloridi (25,4 g, 0,2 mol) laitettiin valmiiksi vedettömään dikloorimetaaniin (250 ml) suojakaasun alla lämpötilassa -60 °C, ja sen jälkeen lisättiin pisaroittain dimetyylisulfoksidia (31,2 ml, 0,44 mol) liuotettuna vedettömään dikloorimetaaniin (20 ml). 30 minuutin kuluttua lisättiin lämpötilassa -50 °C pisaroittain 45 minuutin aikana esimerkissä 24 saatu tuote (30,3 g, 0,1 mol) liuotettuna vedettömän dikloorimetaanin (200 ml) ja dimetyyliformamidin (20 ml) seokseen, ja seosta jälkisekoitettiin 20 minuuttia. Trietyyliamiinin (55,6 ml, 0,4 mol) lisäyksen jälkeen jäähdytys poistettiin, jälkisekoitettiin 1 tunti huoneenlämpötilassa ja seos pestiin vedellä, sitruunahapon laimealla vesiliuoksella ja NaCl-liuoksella, kuivattiin ja väkevöitiin. Jäljelle jäänyt öljy puhdistet-

tiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseosta (1:9) ja kiteytettiin liuotebensiinistä. Saanto: 16,4 g.

b) Olefinointi

Natriumhydridi (0,77 g, 0,032 mol) laitettiin valmiiksi vedettömään tetrahydrofuraaniin (40 ml) suojakaasun alla lämpötilassa 0 °C, lisättiin pisaroittain dietyylifosfonoetikkahapon metyyliesteriä (5,05 g, 0,024 mol) liuotettuna vedettömään tetrahydrofuraaniin (50 ml), muodostunutta suspensiota jälkisekoitettiin 1 tunti lämpötilassa 0 °C, sitten lisättiin pisaroittain esimerkin 47a tuotetta (4,8 g, 0,016 mol) liuotettuna vedettömään tetrahydrofuraaniin (50 ml), seosta jälkisekoitettiin vielä 2 tuntia, se kaadettiin jääveteen ja uutettiin useaan kertaan dikloorimetaanilla ja orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin ja väkevöitiin. Tuote kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 4,2 g.

c) Saippuointi

Esimerkissä 47b saatu tuote (3,7 g, 0,01 mol) saippuoitiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla. Saanto: 3,3 g.

Esimerkki 49

N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetyyli]trifluorimetaanisulfonamidi

Esimerkissä 48 saadun tuotteen emäsmuotoon (3,6 g, 0,012 mol), joka oli liuotettuna vedettömään dikloorimetaaniin (50 ml) ja jota jäähdytettiin jäillä, lisättiin trifluorimetaanisulfonihappoanhydridiä (3,95 g, 0,014 mol) ja sen jälkeen N-etyylimorfoliinia (2,2 ml, 0,017 ml), seosta sekoitettiin yön yli, se pestiin vedellä, sitruunahapon laimealla vesiliuoksella ja NaCl-liuoksella, kuivattiin ja väkevöitiin. Jäljelle jäänyt öljy puhdistettiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseosta (3:1) ja kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 2,1 g.

Esimerkki 50

N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetyyli]oksalaamihapon etyyliesteri

Esimerkissä 48 saadun tuotteen emäsmuoto (9,1 g, 0,03 mol) asyloitiin vedettömässä tetrahydrofuraanissa ja samalla jäillä jäähdyttäen klooriformyylimuurahaishapon etyyliesterin (3,9 ml, 0,035 mol) ja trietyyliamiinin (9,7 ml, 0,07 mol) avulla kirjallisuudessa [J. Med. Chem. 34 (1991) 600] esitetyn ohjeen mukaisesti. Jääveden lisäyksen ja etyyliasetaatilla uuton jälkeen tehtiin pesu vedellä, sitruunahapon laimealla vesiliuoksella ja NaCl-liuoksella, kuivaus ja väkevöinti. Jäljelle jäänyt öljy kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 9,1 g.

Esimerkki 51

N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetyyli]oksalaamihappo

Esimerkissä 50 saatu tuote (5,0 g, 0,12 mol) saippuoitiin esimerkkiä 4b vastaavalla tavalla. Öljymäinen tuote eristettiin uuttamalla dikloorimetaanilla, pesemällä vedellä ja NaCl-liuoksella, kuivaamalla ja väkevöimällä. Jäljelle jäänyt amorfinen tuote kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 3,4 g.

Esimerkki 52

5-metyyli-isoksatsoli-4-karboksyylihappo[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetyyli]-amidi

Esimerkissä 48 saadun tuotteen emäsmuoto (5,0 g, 0,0165 mol) laitettiin valmiiksi vedettömään tetrahydrofuraaniin (80 ml), jota jäähdytettiin jäillä, yhdessä N-etyylimorfoliinin (2,2 ml, 0,017 mol) kanssa, lisättiin pisaroittain 5-metyyli-isoksatsol-3-yylikarboksyylihappokloridia (2,5 g, 0,017 mol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (10 ml) ja seosta jälkisekoitettiin 5 tuntia huoneenlämpötilassa. Jääveden lisäyksen ja dikloorimetaanilla uu-

ton jälkeen tehtiin pesu vedellä, sitruunahapon laimealla vesiliuoksella ja NaCl-liuoksella, kuivaus ja väkevöinti. Saatu öljy puhdistettiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseosta (1:1) ja kiteytettiin liuotebensiinistä. Saanto: 4,9 g.

Esimerkki 53

2-syaani-3-hydroksibut-2-eenikarboksyylihappo[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetyyli]amidi

Esimerkissä 52 saatu tuote liuotettiin vedettömään tetrahydrofuraaniin (50 ml), jäillä samalla jäähdyttäen lisättiin 1 N NaOH-liuosta (20 ml), reaktion päätyttyä (TLC-seuranta) seos tehtiin happamaksi 1 N HCl-liuoksella (22 ml) ja uutettiin dikloorimetaanilla ja orgaaninen faasi pestiin, kuivattiin ja väkevöitiin. Jäännös kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 3,3 g.

Esimerkki 54

{3-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetyyli]ureido}etikkahapon etyyliesteri

Esimerkissä 48 saadun tuotteen emäsmuoto (14,2 g, 0,047 mol) kuumennettiin sellaisenaan etyyli-isosyanaattoasetaatin (6,5 g, 0,05 mol) kanssa lämpötilaan 50 - 60 °C samalla sekoittaen. Reaktion päätyttyä (TLC-seuranta) seos väkevöitiin ja jäännös kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto 11,3 g.

Esimerkki 55

L-fenyylialanyyli-N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetyyli]amidihydrokloridi

a) Asylointi N-(t-butoksikarbonyyli)fenyylialaniinilla

N-(t-butoksikarbonyyli)fenyylialaniini (5,3 g, 0,02 mol) liuotettiin vedettömään tetrahydrofuraaniin (100 ml), lisättiin disykloheksyylikarbodi-imidiä (4,5 g, 0,022 mol)

ja 1-hydroksibentsotriatsolihydraattia (3,1 g, 0,02 mol) ja sekoitettiin noin 45 minuuttia. Saostunut urea poistettiin suodattamalla. N-etyylimorfoliinin (2,3 ml, 0,018 mol) lisäyksen jälkeen lisättiin pisaroittain esimerkissä 48 saatu tuote (6,25 g, 0,015 mol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (50 ml). 4 lisätunnin kuluttua tuote eristettiin lisäämällä etyyliasetaattia, pesemällä 0,1 N HCl-liuoksella ja kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivaamalla ja väkevöimällä. Raakatuote puhdistettiin edelleen kromatografisesti silikageelillä (t-butyylimetyylieetteri). Saanto: 8,9 g N-t-butoksikarbonyylisuojattua tuotetta öljynä.

b) Suojausryhmän poisto

Suojausryhmän poisto ja muunto hydrokloridisuolaksi tehtiin käsittelemällä trifluorietikkahapolla (25 ml) dikloorimetaanissa (150 ml), väkevöimällä ja moneen kertaan haihduttamalla vetykloridin eetteriliuoksen lisäyksen jälkeen ja sen jälkeen liuotebensiinin kanssa sekoittamalla. Saanto: 6,3 g amorfista hydrokloridia.

Esimerkki 56

{3-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yylimetyyli]ureido}etikkahappo

Esimerkissä 54 saatu tuote (6,5 g, 0,015 mol) saippuoitiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla. Saanto: 5,7 g.

Esimerkki 57

2-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]vinyylifosfonihapon dietyyliesteri

Reaktio toteutettiin kirjallisuudessa [J. Med. Chem. 32 (1989) 2171] esitetyn ohjeen mukaisesti vedettömässä tetrahydrofuraanissa käyttämällä lähtöaineina esimerkissä 47a saatua tuotetta (6,4 g, 0,021 mol), tetraetyylimetyleenidifosfonaattia (6,25 ml, 0,025 mol) ja 2,5 M butyylilitiumliuosta (9,6 ml, 0,024 mol). Reaktion päätyttyä reaktioseos kaadettiin jääveteen ja uutettiin dikloorimetaanilla ja orgaaninen faasi pestiin vedellä,

kuivattiin ja väkevöitiin. Tuote kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 7,9 g.

Esimerkki 58

2-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]vinyylifosfonihappo

Esimerkissä 57 saatua tuotetta (4,0 g, 0,009 mol) sekoitettiin trimetyylibromisilaanin (3,9 ml, 0,03 mol) kanssa vedettömässä dikloorimetaanissa (300 ml) suojakaasun alla huoneenlämpötilassa, kunnes reaktio oli mennyt loppuun (TLC-seuranta). Veden (0,5 ml) lisäyksen jälkeen seos väkevöitiin, ja jäännös liuotettiin useaan kertaan metanoliin ja väkevöitiin alipaineessa. Öljyä sekoitettiin t-butyylimetyylieetterin kanssa, kunnes jäljelle jäi kiteinen jäännös. Saanto: 3,0 g.

Esimerkki 59

3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-5-asetyyli-isoksatsoli

Esimerkissä 28 saadulle tuotteelle (5,0 g, 0,016 mol) tehtiin Swernin hapetus esimerkkiä 47a vastaavalla tavalla. Saanto: 3,88 g.

Esimerkki 60

3-(4-pyridyyli)-5-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsoliini

a) 2,6-di-t-butyyli-4-vinyylifenoli

Tämän olefiinin synteesi on tunnettu [P. Grosso ja O. Vogl, J. Macromol. Sci. Chem. A23 (1986) 1041 - 1056].

b) Hydroksamoyylikloridi nitriilioksidin esiasteena

4-pyridyylihydroksamoyylikloridihydrokloridi valmistettiin kirjallisuudessa (Bull. Soc. Chim. France 1962, 2215) esitetyn ohjeen mukaisesti klooraamalla pyridiini-4-karbaldoksiimi.

c) Sykloadditio

Esimerkin 60a tuote (11,6 g, 0,05 mol) ja esimerkin 60b tuote (9,7 g, 0,05 mol) laitettiin valmiiksi dikloorimetaaniin (500 ml), ja sitten lisättiin pisaroittain kuu-

den tunnin aikana liuos, joka sisälsi trietyyliamiinia (20,9 ml, 0,15 mol) dikloorimetaanissa (200 ml). Loppukäsittely tehtiin kuten esimerkissä 1. Saanto 13,1 g.

Esimerkki 61

3-(2-tiatsolyyli)-5-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsoliini

2-tiatsolyylikarbaldoksiimi (valmistus: A. Dondoni, Synthesis 1987, 998 - 1001) kloorattiin, kuten esimerkissä 1 on kuvattu, t-butyylihypokloriitilla dikloorimetaani-dimetyyliformamidiseoksessa (1:1), sitten lisättiin esimerkissä 60a saatua olefiinia (16,3 g, 0,07 mol) ja toteutettiin sykloadditio esimerkin 1 mukaisesti. Jäljelle jäänyt öljy puhdistettiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseosta (1:2) ja kiteytettiin pienen määrän vettä sisältävästä metanolista. Saanto: 6,4 g.

Esimerkki 62

3-karboksi-5-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsoliini

a) Hydroksamoyylikloridi nitriilioksidin esiasteena

Kloorioksi-iminoetikkahapon etyyliesteri valmistettiin glysiinin etyyliesteristä kirjallisuudessa [G. S. Skinner, J. Am. Chem. Soc. 46 (1924) 731] esitetyn ohjeen mukaisesti.

b) Sykloadditio etoksikarbonyylinitriilioksidia käyttäen

Esimerkissä 62 saatu tuote (4,55 g, 0,03 mol), joka oli liuotettu dikloorimetaaniin (80 ml), lisättiin 6 tunnin aikana pisaroittain liuokseen, joka sisälsi esimerkissä 60a saatua olefiinia (4,65 g, 0,02 mol) ja trietyyliamiinia (5,6 ml, 0,04 mol) dikloorimetaanissa (100 ml). Loppukäsittely tehtiin esimerkin 1 mukaisesti. Saanto: 4,8 g.

c) Etyyliesterin saippuointi

Saippuointi ja loppukäsittely tehtiin esimerkkiä 3 vastaavalla tavalla. Esimerkissä 62b saadusta tuotteesta

(6,0 g, 0,017 mol) saatiin 3,55 g kiteistä karboksyylihappoa.

Seuraavien esimerkkien 63 ja 65 sykloadditiovaihetta varten nitrovoihappokomponentit dehydratoitiin muunnelmalla Mukaiyaman menetelmästä [J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 5339 - 5342]. Syntetisointitie, joka lähtee akryylihappojohdoksista ja nitrometaanista, sellaisille johdoksille, joita ei ole kaupan, on esitetty alla nitrovoihapon t-butyyliesterin valmistuksen yhteydessä. Käyttämällä sopivalla tavalla substituoituja vinyylifosfonihappo- ja vinyylifosfiinihappoestereitä voidaan tätä menetelmää soveltaa myös 4-nitropropyylifosfiinihappojohdoksiin ja -fosfonihappojohdoksiin.

Esimerkki 63

5-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-3-yylipropionihappo

a) Nitrovoihapon t-butyyliesteri

Akryylihapon t-butyyliesteri (537 ml, 3,7 mol) lisättiin pisaroittain nitrometaanista (2,0 l) ja 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eenistä (DBU) etukäteen muodostettuun liuokseen hauteen lämpötilan ollessa 70 °C, jolloin akryylihappojäämien vaikutuksesta mahdollisesti alenemaan pyrkivä pH-arvo pidettiin vakiona lisäämällä sopivia määriä DBU:ta. Eksotermisen reaktion päätyttyä (lämpötila kohosi arvoon 90 °C) seoksen annettiin jäähtyä 60 minuuttia, se pestiin useaan kertaan suolahapon laimealla vesiliuoksella ja vedellä, kuivattiin ja väkevöitiin alipaineessa, jolloin jäi jäljelle 660 g punertavanruskeaa öljyä, joka puhdistettiin tislaamalla (kp_5: 90 °C).

Samalla tavalla valmistettiin seuraavat nitroyhdisteet:

3-nitropropyylifosfonihapon dimetyyliesteri ja dietyyliesteri (vinyylifosfonihappoestereistä)

3-nitropropyyli-P-metyylifosfiinihapon etyyliesteri (vinyyli-P-metyylifosfiinihapon etyyliesteristä).

b) Sykloadditio

Esimerkissä 60a saatu olefiini (7,0 g, 0,03 mol) sekoitettiin yhdessä trietyyliamiinin (0,5 ml) ja fenyleenidi-isosyanaatin (6,4 g, 0,04 mol) kanssa etukäteen tolueeniin (80 ml) lämpötilassa 50 °C. Vaiheessa a kuvattu 4-nitrovoihapon t-butyyliesteri (7,6 g, 0,04 mol) ja trietyyliamiini (0,2 ml) liuotettiin tolueeniin (80 ml) ja lisättiin pisaroittain 5 tunnin aikana. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli, ja saostunut urea poistettiin imusuodattamalla ja pestiin dikloorimetaanilla. Väkevöinnin jälkeen jäi jäljelle öljymäinen raakatuote, joka puhdistettiin tarkemmin kromatografisesti silikageelillä (eluentti: liuotebensiinin ja t-butyylimetyylieetterin seos).

c) Karboksyyliryhmää suojaavan ryhmän poisto

Vaiheen b tuotetta (5 g, 0,012 mol) käsiteltiin dikloorimetaanissa (80 ml) huoneenlämpötilassa trifluorietikkahapolla (20 ml), kunnes reaktio meni loppuun (noin 3 tuntia). Väkevöinnin jälkeen jäännöstä sekoitettiin t-butyylimetyylieetterin kanssa, jolloin saatiin 3,6 g kiteistä tuotetta.

Esimerkki 64

5-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsoliini-3-propionihappo-N-(1H-tetratsol-5-yyli)amidi

Esimerkissä 63 saatu tuote (5,0 g, 0,15 mol) muunnettiin esimerkkiä 38 vastaavalla tavalla johdannaisekseen piitetrakloridilla ja 5-aminotetratsolilla vedettömässä pyridiinissä. Tuote kiteytettiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 3,5 g.

Esimerkki 65

{2-[5-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-3-yyli]etyyli}metyylifosfiinihappo

Sykloadditio toteutettiin esimerkin 63 mukaisesti käyttämällä lähtöaineena 3-nitropropyyli-P-metyylifosfii-

nihapon etyyliesteriä. Fosfiiniesteriryhmän poisto tehtiin emäksellä esimerkin 7 mukaisesti.

Esimerkki 70

L-fenyylialaniini-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]etyyliesterihydrokloridi

a) Asylointi N-(t-butoksifkarbonyyli)fenyylialaniinilla

N-(t-butoksifkarbonyyli)fenyylialaniini (2,65 g, 0,01 mol) liuotettiin vedettömään tetrahydrofuraaniin (50 ml), sitten lisättiin hydroksibentsotriatsolihydraattia (1,53 g, 0,01 mol) ja disykloheksyylikarbodi-imidiä (2,27 grammaa, 0,011 mol). 4-dimetyyliaminopyridiinin (0,12 g) lisäyksen jälkeen lisättiin pisaroittain esimerkissä 28 saatu tuote (3,17 g, 0,01 mol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (25 ml). Kahden lisätunnin kuluttua tehtiin loppukäsittely seuraavasti: Etyyliasetaatin lisäys, pesu 0,1 N NaOH-liuoksella, 0,1 N HCl-liuoksella ja kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivaus ja väkevöinti. Raakatuote puhdistettiin edelleen kromatografisesti silikageelillä (liuotebensiini-butyylimetyylieetteriseos, 5:1). Saanto: 3,15 g N-t-butoksikarbonyylisuojattua tuotetta.

b) Suojausryhmän poisto

Suojausryhmän poisto ja muunto hydrokloridisuolaksi tehtiin käsittelemällä trifluorietikkahapolla (10 ml) dikloorimetaanissa (50 ml), väkevöimällä ja moneen kertaan haihduttamalla HCl:n eetteriliuoksen lisäyksen jälkeen ja sen jälkeen t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksen kanssa sekoittamalla. Saanto: 2,2 g.

Esimerkit 71 ja 72

L-fenyylialaniini-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]etyyliesterihydrokloridi

a) Suojausryhmän poisto

Esimerkissä 70a saatu tuote (3,0 g) käsiteltiin trifluorietikkahapolla (vastaavasti kuin esimerkissä 70b). Saanto: 2,8 g raakatuotetta.

b) Isomeerien erotus

Raakatuote erotettiin diastereomeereiksi käsittelemällä se useaan kertaan kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina dikloorimetaani-t-butyylimetyylieetteriseosta (1:10), johon oli lisätty 1 % trietyyliamiinia. Saanto: 0,7 - 0,8 g kumpaakin öljymäistä tuotetta, joita nimitetään seuraavassa isomeeriksi A (jolla on suurempi R_f-arvo) ja isomeeriksi B (jolla on pienempi R_f-arvo). HPLC:n avulla määritetty puhtausaste oli kummassakin tapauksessa yli 95 %. Muunto hydrokloridisuolaksi tehtiin kummankin isomeerin tapauksessa esimerkissä 70b kuvatulla tavalla. Molemmat isomeerit kyettiin kiteyttämään dikloorimetaani-t-butyylimetyylieetteriseoksesta.

Esimerkki 71 (isomeeri A): $[\alpha]^D_{20}$ = +56,1° (c = 1, etanolissa)

Esimerkki 72 (isomeeri B): $[\alpha]^D_{20}$ = -30,8° (c = 1, etanolissa)

Esimerkki 73

L-fenyylialaniini-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesterihydrokloridi

a) Asylointi N-(t-butoksifkarbonyyli)fenyylialaniinilla

Synteesi toteutettiin esimerkin 70a mukaisesti käyttämällä lähtöaineena esimerkissä 19 saatua tuotetta (ras. erytro-isomeeria, 3,2 g, 0,01 mol). Saanto: 3,5 g N-t-butoksikarbonyylisuojattua tuotetta.

b) Suojausryhmän poisto

Suojausryhmä poistettiin esimerkkiä 70b vastaavalla tavalla. Saanto: 2,6 g isomeeriseosta (raseemisen isoksatsoliinin käytön johdosta).

Esimerkit 74 ja 75

L-fenyylialaniini-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesterihydrokloridi

a) Isomeerien erotus

Esimerkissä 73a saatu tuote (2,5 g) erotettiin diastereomeereiksi käsittelemällä se useaan kertaan kromato-

grafisesti silikageelillä käyttäen eluenttina liuotebensiini-t-butyylimetyylieetteriseosta (5:1). Saanto: 0,6 - 0,7 g kumpaakin öljymäistä tuotetta, joita nimitetään seuraavassa isomeeriksi A (jolla on suurempi R_f-arvo) ja isomeeriksi B (jolla on pienempi R_f-arvo). HPLC:n avulla määritetty puhtausaste oli kummassakin tapauksessa yli 95 %.

b) Suojausryhmän poisto

Suojausryhmän poisto ja muunto hydrokloridisuolaksi tehtiin kummankin isomeerin tapauksessa esimerkissä 70b kuvatulla tavalla.

Esimerkki 74 (isomeeri A): $[\alpha]^D_{20}$ = +31,6° (c = 1, etanolissa)

Esimerkki 75 (isomeeri B): $[\alpha]^D_{20}$ = -59,7° (c = 1, etanolissa)

Esimerkki 76

Glysiini-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-isoksatsol-5-yyli]etyyliesterihydrokloridi

Synteesi toteutettiin esimerkin 70 mukaisesti käyttämällä lähtöaineina N-BOC-glysiiniä (2,1 g, 0,012 mol) ja esimerkissä 28 saatua tuotetta (ras. erytro-isomeeria; 3,2 g, 0,01 mol). Suojausryhmän poiston ja hydrokloridisuolaksi muunnon jälkeen saatiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta kiinteää amorfista tuotetta. Saanto: 2,6 g.

Esimerkki 77

Glysiini-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesterihydrokloridi

Synteesi toteutettiin esimerkin 70 mukaisesti käyttämällä lähtöaineina N-BOC-glysiiniä (2,1 g, 0,012 mol) ja esimerkissä 19 saatua tuotetta (3,2 g, 0,01 mol). Suojausryhmän poiston ja hydrokloridisuolaksi muunnon jälkeen saatiin t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta kiinteää amorfista tuotetta. Saanto: 2,3 g.

Esimerkki 81

Heksadekaanihappo-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesteri (erytro-isomeeri)

Esimerkissä 19 saatu tuote (3,2 g, 0,01 mol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (60 ml). 4-dimetyyliaminopyridiinin (125 mg) ja N-etyylimorfoliinin (3,05 ml, 0,024 mol) lisäyksen jälkeen lisättiin pisaroittain ja samalla jäillä jäähdyttäen heksadekaanihappokloridia (5,5 g, 0,02 mol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (30 ml), ja reaktion päätyttyä (TLC-seuranta) seos pestiin vedellä, kaliumvetysulfaatin vesiliuoksella ja vedellä, kuivattiin ja väkevöitiin. Jäljelle jäänyt öljy puhdistettiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina liuotebensiini-t-butyylimetyylieetteriseosta. Saanto: 1,9 g.

Esimerkki 82

Di-O-asetyyli-L-viinihappo-N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]metyyliamidi

Esimerkissä 48 saatu tuote (4,2 g, 0,01 mol) sekoitettiin yhdessä 4-dimetyyliaminopyridiinin (0,12 g) ja N-etyylimorfoliinin (4,5 ml, 0,035 mol) kanssa etukäteen tetrahydrofuraaniin (250 ml), ja seokseen lisättiin huoneenlämpötilassa 0,5 tunnin aikana pisaroittain ja samalla sekoittaen (+)-di-O-asetyyli-L-viinihappoanhydridiä (3,3 grammaa, 0,015 mol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (60 ml). Sen jälkeen kun seosta oli pidetty vielä 4 tuntia huoneenlämpötilassa, lisättiin 1 N HCl-liuosta (50 ml), vettä (500 ml) ja etyyliasetaattia (500 ml) ja faasien erotuksen jälkeen tehtiin pesu vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivaus ja väkevöinti. Jäännös puhdistettiin kromatografisesti silikageelillä käyttäen eluenttina t-butyylimetyylieetteriä ja kiteytettiin sitten t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 4,9 g. $[\alpha]^{D}_{20}$ = -1,4° (c = 1, etanolissa)

Esimerkki 83

L-viinihappo-N-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)isoksatsol-5-yyli]metyyliamidi

Esimerkissä 82 saatu tuote (1,56 g, 0,03 mol) liuotettiin metanoliin (200 ml) ja lisättiin hienoksi jauhettua kaliumkarbonaattia (0,84 g, 0,06 mol). Seosta sekoitettiin yön yli, ja se tehtiin happamaksi sitruunahapon vesiliuoksella ja uutettiin useaan kertaan etyyliasetaatilla. Kuivauksen ja väkevöinnin jälkeen jäänyt öljy kiteytettiin. Saanto: 1,25 g. $[\alpha]^{D}_{20}$ = +21,5° (c = 1, etanolissa).

Esimerkki 84

3-oksovoihappo-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesteri

Esimerkissä 19 saatu tuote (1,6 g) liuotettiin yhdessä 4-dimetyyliaminopyridiinin (noin 12 mg) kanssa vedettömään tetrahydrofuraaniin (80 ml) jäillä samalla jäähdyttäen, ja liuokseen lisättiin pisaroittain diketeeniä (0,46 ml, 0,006 mol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (15 ml). Tunnin kuluttua jäähaude poistettiin ja seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Väkevöinnin jälkeen jäännös liuotettiin vesi-etyyliasetaattiseokseen, ja orgaaninen faasi kuivattiin ja väkevöitiin. Sen jälkeen tehtiin kiteytys t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta. Saanto: 1,05 g vaaleankeltaisia kiteitä.

Esimerkki 85

Fosforihappodifenyyli-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesteri

Esimerkissä 19 saatu tuote (3,2 g, 0,01 mol) liuotettiin yhdessä 4-dimetyyliaminopyridiinin (0,12 g) ja N-etyylimorfoliinin (1,4 ml, 11 mmol) kanssa vedettömään tetrahydrofuraaniin (60 ml), ja liuokseen lisättiin huoneenlämpötilassa pisaroittain fosforihappodifenyyliesterikloridia (2,95 g, 11 mmol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (10 ml). 4 tunnin kuluttua lisättiin sitruunahapon vesi-

liuosta ja etyyliasetaattia, orgaaninen faasi kuivattiin ja väkevöitiin ja jäännös kiteytettiin. Saanto: 4,7 g kiteistä tuotetta.

Esimerkit 86 ja 87

4-(4-morfolinyyli)metyylibentsoehappo-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesterihydrokloridi (86: erytro-isomeeri; 87: treo-isomeeri)

a) 4-kloorimetyylibentsoyylibut-3-en-2-yyliesteri

Ras. 1-buten-3-olia (7,2 g, 0,1 mol) sekoitettiin yhdessä kloorimetyylibentsoyylikloridin (20,5 g, 0,108 mol), N-etyylimorfoliinin (14 g, 0,11 mol) ja 4-dimetyyliaminopyridiinin (1,2 g) kanssa vedettömässä tetrahydrofuraanissa (200 ml) 24 tuntia. Dikloorimetaanin ja sitruunahapon vesiliuoksen lisäyksen jälkeen faasit erotettiin ja orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin ja väkevöitiin. Jäännöstä trituroitiin liuotebentseenin kanssa ja saostunut pieni osuus kiintoainetta poistettiin. Haihdutuksen jälkeen tuote voitiin eristää öljynä.

b) Reaktio toteutettiin esimerkkiä 1 vastaavalla tavalla käyttämällä lähtöaineina aldoksiimia (7,5 g, 0,03 mol) ja esimerkissä 86a saatua tuotetta (7,6 g, 0,034 mol). Aluksi öljymäinen raakatuote puhdistettiin kromatografisesti silikageelillä (liuotebensiini-etyyliasetaatti, 9:1). Saanto: 3,7 g ras. erytro- ja treo-isomeerin seosta.

c) Reaktio morfoliinin kanssa

Vaiheessa b saatu tuote (3,6 g, 7,6 mmol) liuotettiin asetoniin, lisättiin morfoliinia (1,3 ml, 0,015 mol) ja kaliumjodidia (0,27 g, 1,6 mmol) ja seosta sekoitettiin 2 vuorokautta huoneenlämpötilassa. Väkevöinnin jälkeen jäännös liuotettiin vesi-etyyliasetaattiseokseen ja orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin ja väkevöitiin. Jäljelle jäi 4 g tuotetta diastereomeerien seoksena (isomeerien seos noin 60:40).

d) Isomeerien erotus

Vaiheessa c saatu raakatuote liuotettiin t-butyylimetyylieetteriin (noin 200 ml), ja liuokseen lisättiin etanoliin tehtyä 5 M vetykloridiliuosta (8 ml) ja diklooorimetaania (noin 30 ml). Saostunut hydrokloridi eristettiin ja kiteytettiin uudelleen isopropanolista, jolloin erytro-diastereomeeri kiteytyi ensin ja voitiin isopropanolista edelleen kiteyttämällä rikastaa sellaiseksi, että diastereomeerien suhde oli yli 95:5. Saanto: 0,75 g.

Yhdistetyistä emäliuoksista voitiin eristää myös treo-diastereomeeri useaan kertaan kiteyttämällä.

Esimerkki 88

L-tyrosyyli-1-[3-(3,5-di-t-butyyli-4-hydroksifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesteri (ras. 5,5'-erytro-isomeeriseos)

a) Asylointi N,O-di(t-butoksikarbonyyli)-L-tyrosiinilla

N,O-di(t-butoksikarbonyyli)-L-tyrosiini (7,6 g, 0,02 mol) liuotettiin vedettömään tetrahydrofuraaniin (100 ml), lisättiin 1-hydroksibentsotriatsolia (2,7 g, 0,02 mol) ja disykloheksyylikarbodi-imidiä (4,5 g, 0,022 mol), seosta sekoitettiin sitten noin 45 minuuttia ja saostunut urea poistettiin suodattamalla. N-etyylimorfoliinin (2,3 ml, 0,018 mol) ja dimetyyliaminopyridiinin (0,24 g, 0,002 mol) lisäyksen jälkeen lisättiin pisaroittain esimerkissä 19 saatu tuote (4,8 g, 0,015 mol) liuotettuna tetrahydrofuraaniin (80 ml). Sen jälkeen kun seosta oli sekoitettu 24 tuntia huoneenlämpötilassa, tehtiin loppukäsittely lisäämällä etyyliasetaattia, pesemällä 0,1 N NaOH-liuoksella, 0,1 N HCl-liuoksella ja kylläisellä NaCl-liuoksella, kuivaamalla ja väkevöimällä. Raakatuote puhdistettiin edelleen kromatografisesti silikageelillä (t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseos). Saanto: 10,5 g N-t-butoksikarbonyylisuojattua tuotetta öljynä.

b) Suojausryhmän poisto

Suojausryhmä poistettiin esimerkkiä 70b vastaavalla tavalla. Emäksen vapautuksen jälkeen tehtiin lisäpuhdistus kromatografisesti silikageelillä (t-butyylimetyylieetteri-dikloorimetaani-metanoliseos, 10:9:1). Saanto: 1,6 g amorfista kiinteää ainetta.

Esimerkki 89

3-(3,5-di-t-butyyli-4-hydroksifenyyli)-5-(1,2-dihydroksietyyli)-2-isoksatsoliini (ras. erytro-isomeeri)

Esimerkissä 16 saatu tuote (2,9 g) liuotettiin dioksaanin (50 ml) ja veden (10 ml) seokseen, lisättiin perkloorihapon 70-%:ista vesiliuosta (0,75 ml) ja seosta sekoitettiin 18 tuntia huoneenlämpötilassa. Natriumkarbonaatin 5-%:isen vesiliuoksen (20 ml) ja veden (150 ml) lisäyksen jälkeen seos uutettiin useaan kertaan etyyliasetaatilla ja orgaaninen faasi pestiin, kuivattiin ja väkevöitiin. t-butyylimetyylieetteri-liuotebensiiniseoksesta kiteyttämällä tuote kyettiin saamaan puhtaassa muodossa. Saanto: 1,3 g.

Esimerkki 90

3-(3,5-di-t-butyyli-4-hydroksifenyyli)-5-(1,2-dihydroksietyyli)-2-isoksatsoliini (ras. treo-isomeeri)

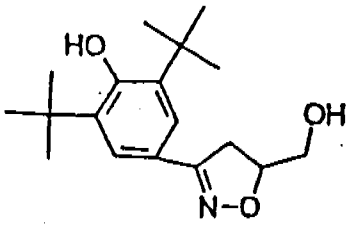
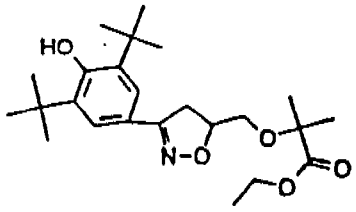
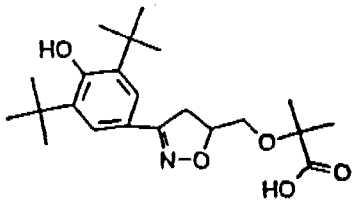
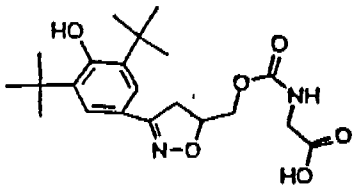
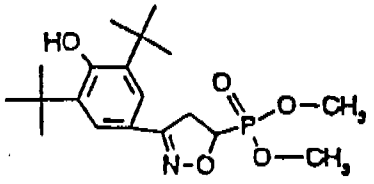
Valmistus toteutettiin esimerkkiä 89 vastaavalla tavalla käyttämällä lähtöaineena esimerkissä 17 saatua tuotetta (2,4 g). Saanto: 1,25 g kiteistä tuotetta.

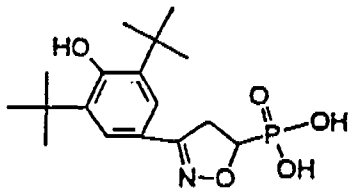
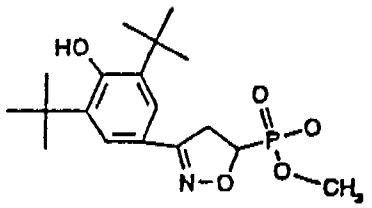
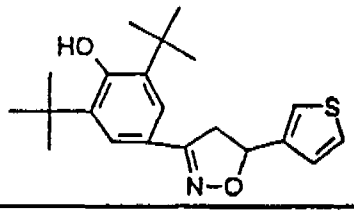
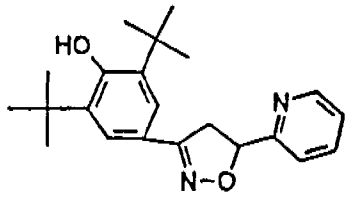
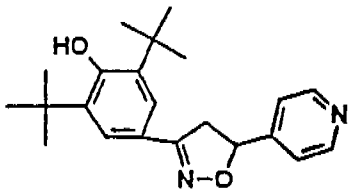
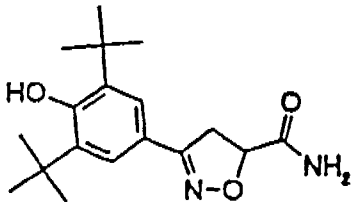
Esimerkki 91

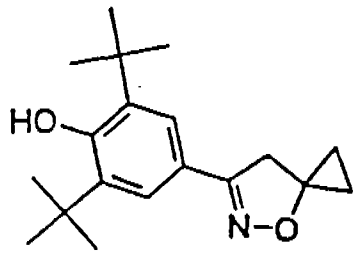
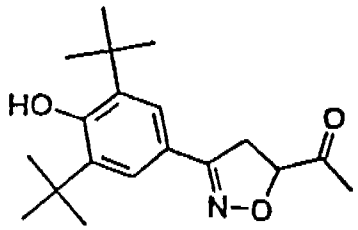
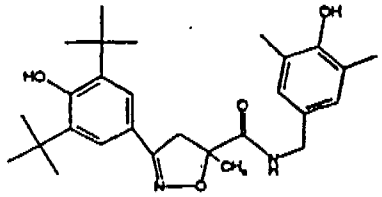
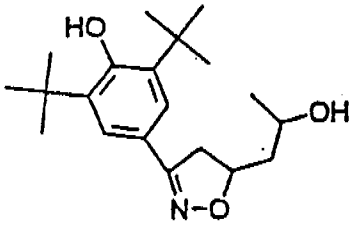
4-(4-metyylipiperatsin-1-yylimetyylibentsoehappo-1-[3-(4-hydroksi-3,5-di-t-butyylifenyyli)-2-isoksatsolin-5-yyli]etyyliesteridihydrobromidi (erytro-isomeeri)

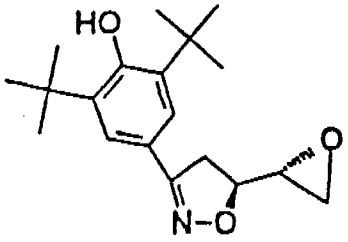
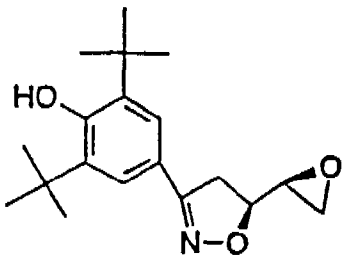
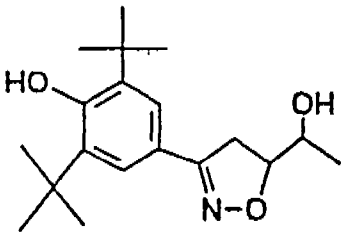
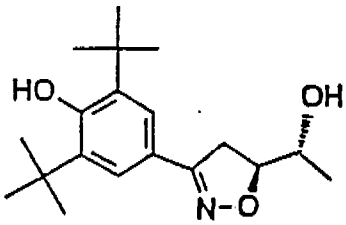
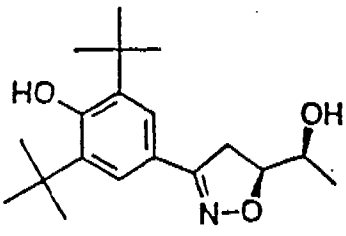
Valmistus toteutettiin esimerkkiä 86 vastaavalla tavalla. Diastereomeerien rikastus vaiheessa b tehtiin jakokiteyttämällä. Vaiheessa c käytettiin morfoliinin sijasta N-metyylipiperatsiinia. Hydrobromidien saostuksen jälkeen isomeerien rikastusaste oli vaiheessa d yli 95 %. Saanto: 1,9 g erytro-tuotetta (vaiheessa b lähtöaineen määrä oli 4,7 g).

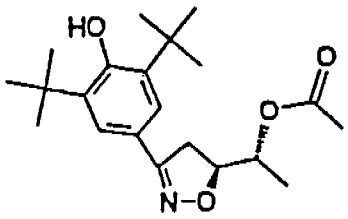
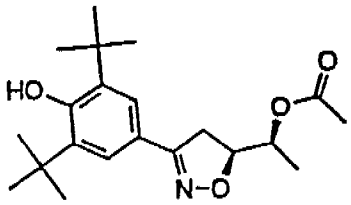
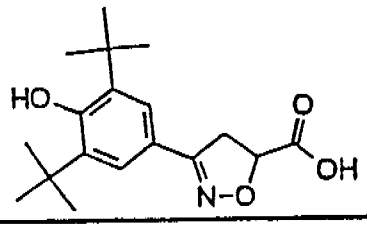
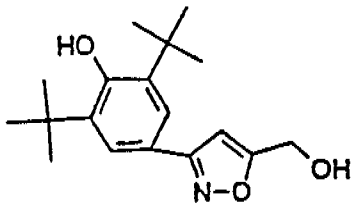
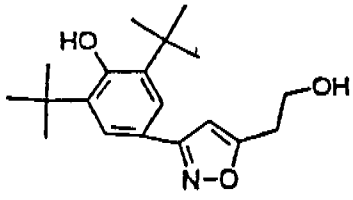
Taulukko 1

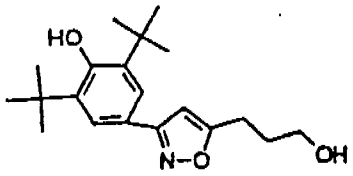
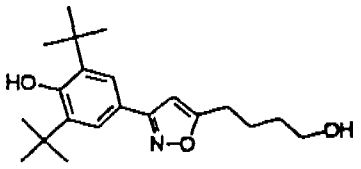
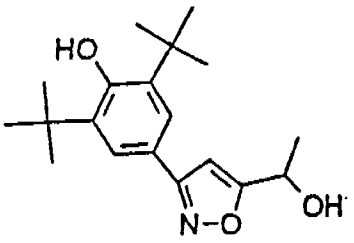
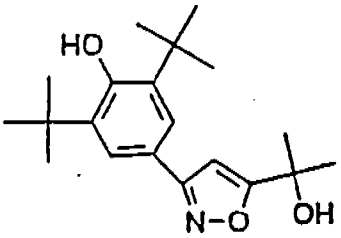
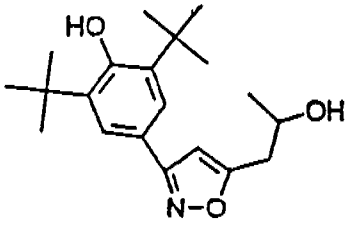
Esim.	Rakenne	Liuote	^{1}H-NMR	Sp. (°C)
1		CDCl3	1,45 (s, 18H) 2,05 (tb, 1H) 3,16-3,45 (m, 2H) 3,55-3,95 (m, 2H) 4,83 (m, 1H) 5,49 (s, 1H) 7,5 (s, 2H)	132-135
2		CDCl3	1,26 (t, 3H) 1,43-1-46 (sb, 24 H) 3,3-3,68 (m, 4H) 4,18 (q, 2H) 4,86 (m, 1H) 5,49 (s, 1H) 7,52 (s, 2H)	86-88
3		CDCl3	1,46 (s, 18H) 1,48 ja 1,50 (mol.s, 3H) 3,15-3,52 (m, 2H) 3,61 (d, 2H) 4,89 (m, 1H) 5,50 (s, 1H) 7,50 (s, 2H)	183-186
4		CDCl3	1,39 (s, 18H) 3,05-3,70 (m, 4H) 3,95-4,19 (m, 2H) 4,82 (m, 1H) 7,40 (s, 2H) 7,58 (tb, 1H)	124-132
5		CDCl3	1,45 (s, 18H) 3,58-3,78 (m, 2H) 3,82-3,95 (2d, mol. 3H) 4,88 (m, 1H) 5,52 (sb, 2H) 7,50 (s, 2H)	196

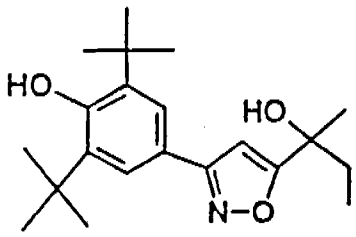
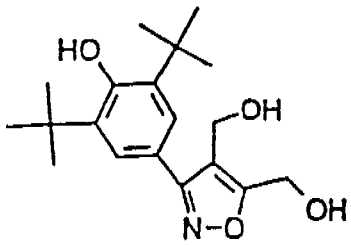
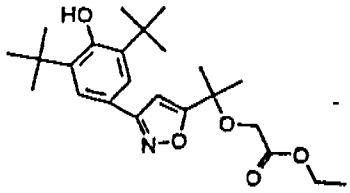
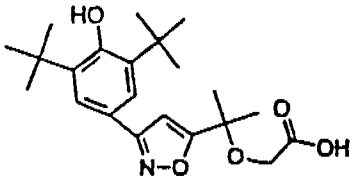
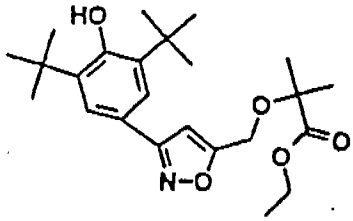
6		DMSO-d6	1,39 (s, 18H) 3,25-3,85 (m, 2H) 4,62 (m, 1H) 7,39 (s, 2H) 11,0 (sb, 2H)	214 (haj.)
7		DMSO-d6	1,39 (s, 18H) 3,25-3,95 (m, 5H, sis.d 3H kohdassa 3,65) 4,76 (m, 1H) 7,40 (s, 2H) 7,48 (sb, 1H)	183-186
8		DMSO-d6	1,39 (s, 18H) 3,34-3,86 (m, 2H) 5,70 (m, 1H) 7,13 (m, 1H) 7,40-7,58 (m, 4H)	121-125
9		DMSO-d6	1,39 (s, 18H) 3,59-3,94 (m, 2H) 5,72 (m, 1H) 7,30-7,55 (m, 5H) 7,82 (m, 1H) 8,57 (m, 1H)	149-150
10		DMSO-d6	1,39 (s, 18H) 3,29-3,44 ja 3,82-4,0 (mol. m, 1H) 5,73 (m, 1H) 7,35-7,47 (m, 5H) 8,57 (m, 2H)	179-180
11		DMSO-d6	1,39 (s, 18H) 3,40-3,75 (m, 2H) 4,99 (m, 1H) 7,41 (s,2H) 7,44 (sb, 1H) 7,60 (sb, 1H)	258-262

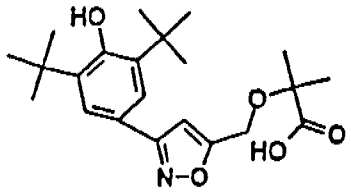
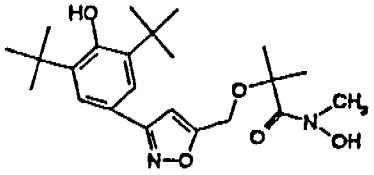
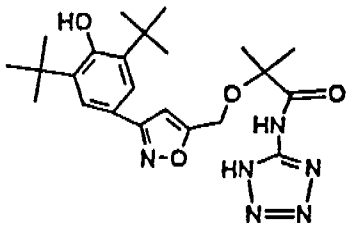
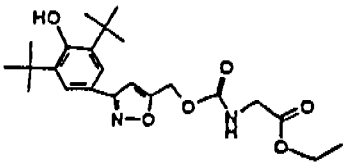
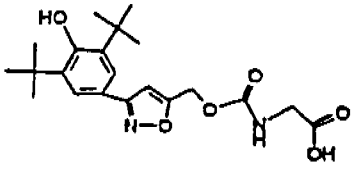
12		CDCl3	0,81 (m, 2H) 1,21 (m, 2H) 1,46 (s, 18H) 3,41 (s, 2H) 5,47 (s, 1H) 7,50 (s, 2H)	149-151
13		CDCl3	1,40 (s, 18H) 2,31 (s, 3H) 3,35-3,64 (m, 2H) 4,94 (m, 1H) 5,47 (s, 1H) 7,45 (s, 2H)	94
14		CDCl3	1,44 (s, 18H) 1,74 (s, 3H) 2,18 (s, 6H) 3,24 (d, 1H) 3,88 (d, 1H) 4,14-4,43 (m, 2H) 4,70 (s, 1H) 5,52 (s, 1H) 6,84 (s, 2H) 7,13 (tb, 1H) 7,47 (s, 2H)	194
15		CDCl3	1,34-1,28 (2d, 3H) 1,45 (s, 18H) 1,58-2,04 (m, 3H) 2,93-3,10 ja 3,38-3,58 (mol.m, 1H) 4,12 u. 4,90 (mol.m, 1H) 5,47 ja 5,48 (mol.s, 0,5H) 7,49 ja 7,50 (mol.s, 1H)	131-133

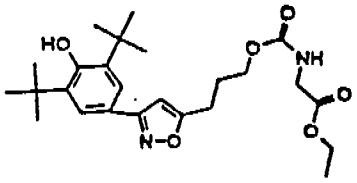
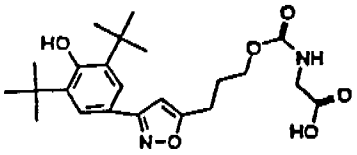
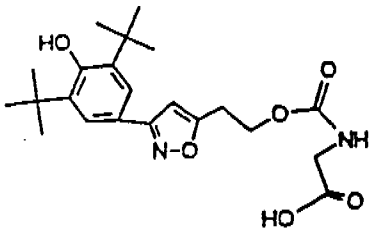
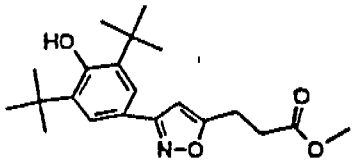
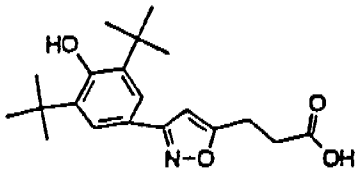
16		CDCl3	1,46 (s, 18H) 2,72, 2,89 ja 3,16 (mol. m, 1H) 3,21-3,52 (m, 2H) 4,61 (m, 1H) 5,50 (s, 1H) 7,51 (s, 2H)	148-153
17		CDCl3	1,45 (s, 18H) 2,84 (d, 2H) 3,18-3,57 (m, 3H) 4,73 (m, 1H) 5,48 (s, 1H) 7,49 (s, 2H)	123-126
18		DMSO-d6	1,06-1,11 (2d, 3H) 1,40 (s, 18H) 3,08-3,43 (m, 2H) 3,52-3,80 (m, 1H) 4,31-4,55 (m, 1H) 4,81-4,96 (2db, 1H, OH) 7,36 (sb, 1H) 7,40 ja 7,41 (mol. s, 1H)	126-146
19		DMSO-d6	1,07 (d, 3H) 1,39 (s, 18H) 3,15-3,41 (m, 3H) 3,62 (m, 1H) 4,38 (m, 1H) 4,90 (d, 1H) 7,38 (s, 2H)	161
20		DMSO-d6	1,07 (d, 3H) 1,38 (s, 18H) 3,05-3,45 (m, 3H) 3,66 (m, 1H) 4,44 (m, 1H) 4,85 (d, 1H) 7,38 (s, 2H)	134-135

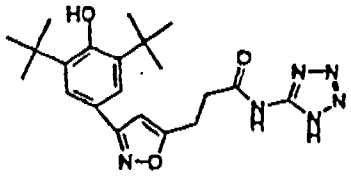
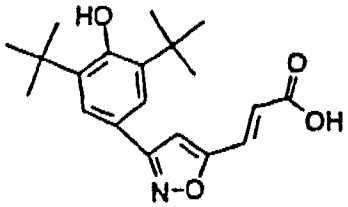
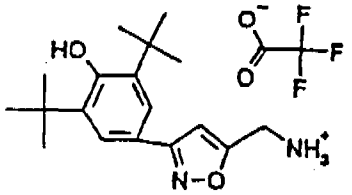
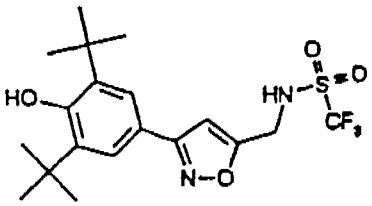
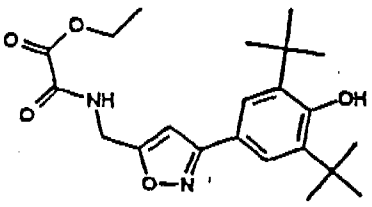
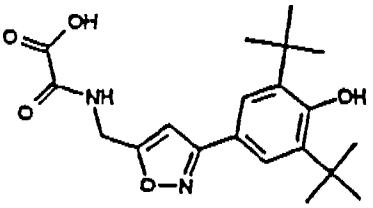
21		CDCl3	1,30 (d, 3H) 1,46 (s, 18H) 2,07 (s, 3H) 3,05-3,50 (m, 2H) 4,72 (m, 1H) 5,07 (m, 1H) 5,48 (s, 1H) 7,49 (s, 2H)	149-151
22		CDCl3	1,32 (d, 3H) 1,46 (s, 18H) 2,06 (s, 3H) 3,02-3,48 (m, 2H) 4,73 (m, 1H) 5,09 (m, 1H) 5,48 (s, 1H) 7,49 (s, 2H)	128-130
23		MeOH-d4	1,44 (s, 18H) 3,50-3,85 (m, 2H) 4,93 (sb, hapan H) 5,13 (m, 1H) 7,50 (s, 2H)	176-178 (haj.)
24		MeOH-d4	1,47 (s, 18H) 4,70 (s, 2H) 4,88 (sb, hapan H) 6,67 (s, 1H) 7,62 (s, 2H)	149-155
25		DMSO-d6	1,42 (s, 18H) 2,92 (t, 2H) 3,75 (m, 2H) 4,90 (tb, 1H)) 6,72 (s, 1H) 7,33 (sb, 1H) 7,54 (s, 2H)	125

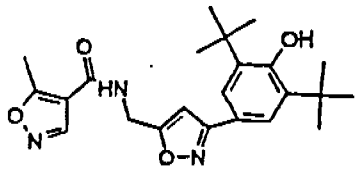
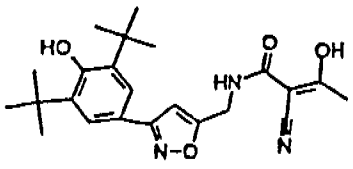
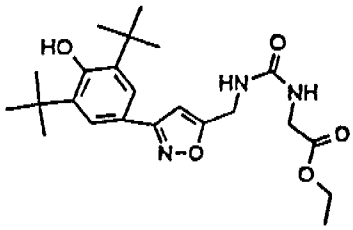
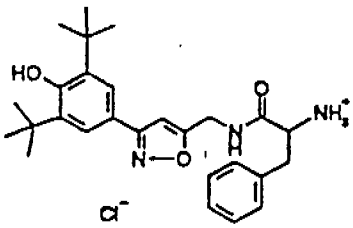
26		CDCl3	1,48 (s, 18H) 2,02 (m, 2H) 2,91 (t, 2H) 3,75 (t, 2H) 5,43 (s, 1H) 6,26 (s, 1H) 7,59 (s, 2H)	133-135
27		DMSO-d6	1,3-1,59 (m, 20H) 1,71 (m, 2H) 2,77 (t, 2H) 3,41 (m, 2H) 4,45 (tb, 1H)) 6,71 (s, 1H) 7,35 (sb, 1H) 7,54 (s, 2H)	82
28		DMSO-d6	1,36-1,53 (s, 18H ja d, 3H) 4,89 (m, 1H) 5,75 (db, 1H) 6,79 (s, 1H) 7,38 (sb, 1H) 7,56 (s, 2H)	123-124
29		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 1,52 (s, 6H) 5,62 (sb, 1H) 6,74 (s, 1H) 7,36 (sb, 1H) 7,55 (s, 2H)	142
30		CDCl3	1,32 (d, 3H) 1,48 (s, 18H) 1,80 (db, 1H) 2,95 (d, 2H) 4,24 (m, 1H) 5,44 (s, 1H) 6,36 (s, 1H) 7,60 (s, 2H)	125-132

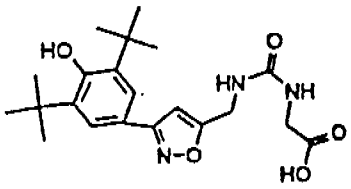
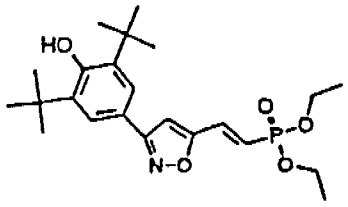
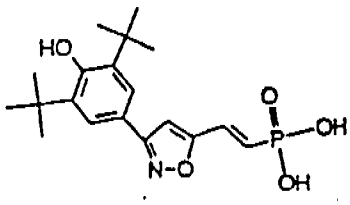
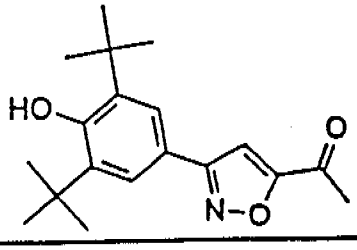
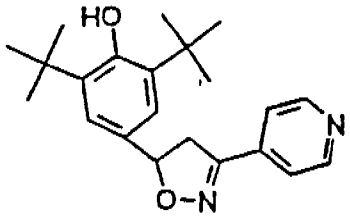
31		DMSO-d6	0,82 (t, 3H) 1,44 (s, 18H) 1,48 (s, 3H) 1,80 (q, 2H) 5,50 (sb, 1H) 6,74 (s, 1H) 7,35 (sb, 1H) 7,57 (s, 2H)	150-151
32		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 4,41 ja4,63 (mol.d, 2H) 5,11 ja5,52 (mol.tb, 1H) 7,34 (sb, 1H) 7,66 (s, 2H)	191-195 (haj.)
33		CDCl3	1,33 (t, 3H) 1,45 (s, 18H) 1,68 (s, 6H) 2,19 (sb, 1H) 4,32 (q, 2H) 4,37 (s, 2H) 6,43 (s, 1H) 7,67 (s, 2H)	124
34		DMSO-d6	1,42 (s, 18H) 1,53 (s, 6H) 4,30 (s, 2H) 5,65 (sb, 1H) 6,91 (s, 1H) 7,72 (s, 2H) 13,1 (sb, 1H)	209-210
35		CDCl3	1,30 (t, 3H) 1,47 (s, 18H) 1,53 (s, 6H) 4,23 (q, 2H) 4,65 (s, 2H) 5,48 (s, 1H) 6,54 (s, 1H) 7,61 (s, 2H)	67-68

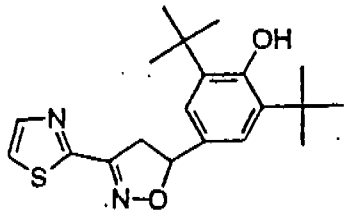
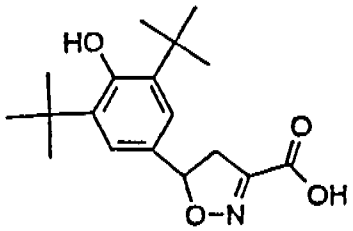
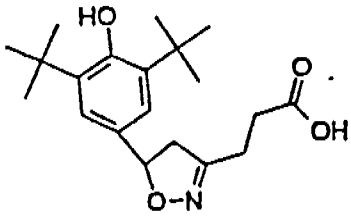
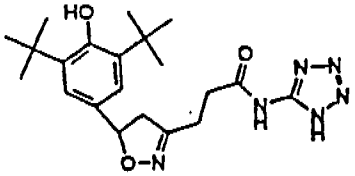
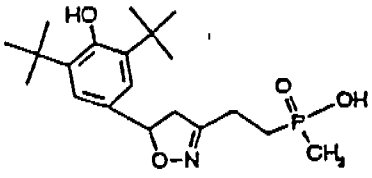
36		CDCl3	1,48 (s, 18H) 1,59 (s, 6H) 4,70 (s, 2H) 5,45 (sb, 1H) 6,54 (s, 1H) 7,61 (s, 2H)	182-185
37		CDCl3	1,48 (s, 18H) 1,59 (s, 6H) 3,60 (sb, 3H) 4,53 (sb, 2H) 5,47 (sb, 1H) 6,50 (s, 1H) 7,60 (s, 2H) 8,50 (sb, 1H)	107-113
38		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 1,54 (s, 6H) 4,69 (sb, 2H) 6,99 (s, 1H) 7,41 (sb, 1H) 7,56 (s, 2H) 11,80 (sb, 1H)	247-249 (haj.)
39		CDCl3	1,28 (t, 3H) 1,47 (s, 18H) 3,98 (d, 2H) 4,21 (q, 2H) 5,23 (sb, 2H) 5,40 (tb, 1H) 5,46 (s, 1H) 6,58 (s, 1H) 7,60 (s, 2H)	(öljy)
40		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 3,40 (sb, 2H) 3,71 (d, 2H) 5,20 (sb, 2H) 6,99 (s, 1H) 7,56 (s, 2H) 7,80 (tb, 1H) 12,65 (sb, 1H)	185-188

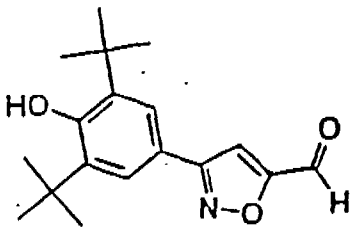
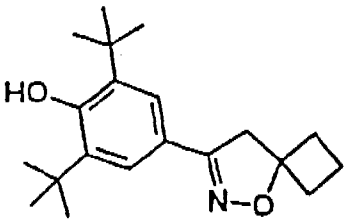
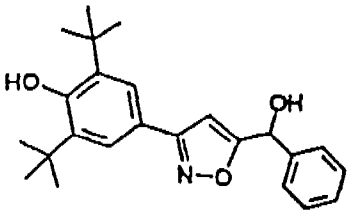
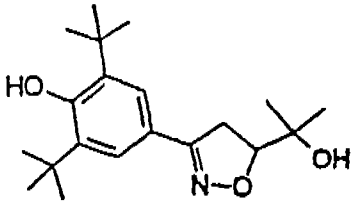
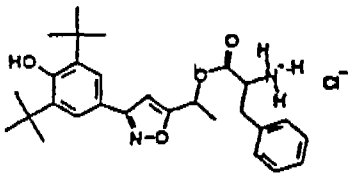
41		CDCl3	1,29 (t, 3H) 1,48 (s, 18H) 2,10 (m, 2H) 2,88 (t, 2H) 3,98 (d, 2H) 4,11-4,30 (m, 4H) 5,20 (tb, 1H) 5,44 (s, 1H) 6,27 (s, 1H) 7,59 (s, 2H)	86
42		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 1,99 (m, 2H) 2,82 (tb, 2H) 3,67 (d, 2H) 4,06 (tb, 2H) 6,77 (s, 1H) 7,33 (sb, 1H) 7,45 (tb, 1H) 7,55 (s, 2H) 12,55 (sb, 1H)	201-203
43		DMSO-d6	1,42 (s, 18H) 3,10 (tb, 2H) 3,63 (d, 2H) 4,29 (tb, 2H) 6,80 (s, 1H) 7,35 (sb, 1H) 7,54 (s, 2H ja tb, 1H) 12,55 (sb, 1H)	152-155
44		CDCl3	1,48 (s, 18H) 2,79 ja 3,12 (mol.t, 2H) 3,71 (s, 3H) 5,43 (s, 1H)) 6,28 (s, 1H) 7,58 (s, 2H)	89
45		DMSO-d6	1,42 (s, 18H) 2,71 ja 2,99 (mol.t, 2H) 6,75 (s, 1H) 7,35 (sb, 1H) 7,54 (s, 2H) 12,4 (sb, 1H)	188

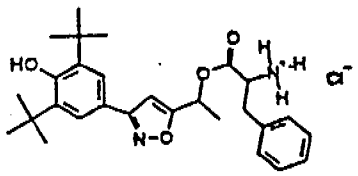
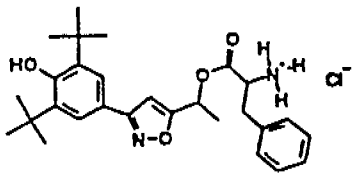
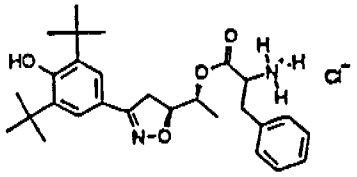
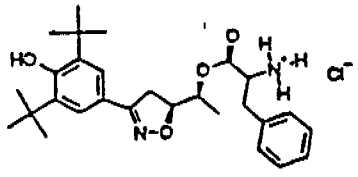
46		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 2,95 ja 3,15 (mol.tb, 2H) 6,75 (s, 1H) 7,38 (s, 1H) 7,54 (s, 2H) 12,2 (sb, 1H)	249 (haj.)
47		DMSO-d6	1,44 (s, 18H) 6,65 ja 7,51 (mol.d, 1H) 7,49 (s, 1H) 7,60(s, 2H) 13,0 (sb, 1H)	206-208
48		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 4,33 (s, 2H) 7,06 (s, 1H) 7,52 (sb, 1H) 7,55 (s, 2H) 8,65 (sb, hapan H)	194
49		CDCl3	1,48 (s, 18H) 4,60 (s, 2H) 5,51 (s, 1H) 6,55 (s, 1H) 7,58 (s, 2H)	163-165
50		CDCl3	1,35 -1,50 (s, 18H ja t, 3H) 4,38 (q, 2H) 4,69 (d, 2H) 5,46 (s, 1H) 6,49 (s, 1H) 7,55 (s ja tb, 3H)	124-126
51		DMSO-d6	1,41 (s, 18H) 4,48 (d, 2H) 6,81 (s, 1H) 7,40 (sb, 1H) 7,55 (s, 2H) 9,50 (tb, 1H) 13,7 (sb, 1H)	165 (haj.)

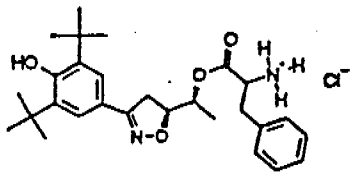
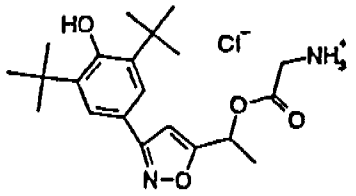
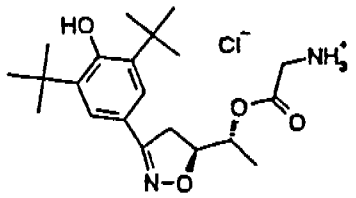
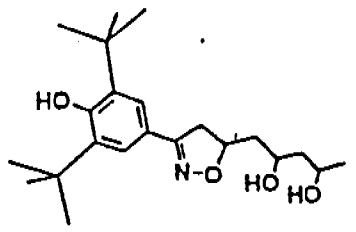
52		CDCl3	1,46 (s, 18H) 2,73 (s, 3H) 4,72 (d, 2H) 5,47 (s, 1H) 6,51 (s, 1H tb, 1H) 7,57 (s, 2H) 8,41 (s, 1H)	146-148
53		CDCl3	1,47 (s, 18H) 2,31 (s, 3H) 4,67 (d, 2H) 5,46 (s, 1H) 6,46 (s, 1H) 6,51 (tb, 1H) 7,58 (s, 2H) 15,3 (sb, 1H)	178-180
54		CDCl3	1,25 (t, 3H) 1,46 (s, 18H) 4,0 (d, 2H) 4,18 (q, 2H) 4,54 (d, 2H) 5,38 (tb, 1H) 5,45 (s, 1H) 5,54 (tb, 1H) 6,47 (s, 1H) 7,57 (s, 2H)	145-150
55		DMSO-d6	1,44 (s, 18H) 3,0-3,22 (m, 2H) 4,07 (tb, 1H) 4,45 (db, 2H) 6,75 (s, 1H) 7,15-7.35 (m, 5H) 7,54 (s, 2H) 8,05 (sb, hapanH) 9,35 (tb, 1H)	98-138 (amorfinen)

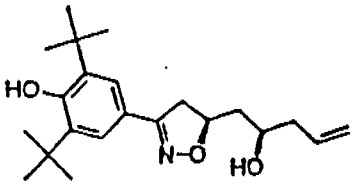
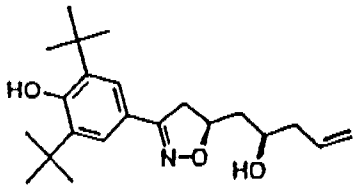
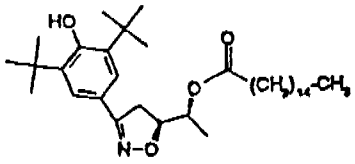
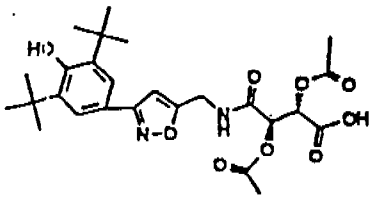
56		DMSO-d6	1,42 (s, 18H) 3,73 (d, 2H) 4,37 (d, 2H) 6,40 (tb, 1H) 6,68 (s, 1H) 6,85 (tb, 1H) 7,40 (sb, 1H) 7,53 (s, 2H)	159-165
57		DMSO-d6	1,29 (t, 6H) 1,43 (s, 18H) 4,0-4,15 (m, 2H) 6,75 (t, 1H) 7,35 (dd, 1H) 7,47 (d, 1H) 7,59 (s, 2H)	119-125
58		DMSO-d6	1,44 (s, 18H) 6,68 (dd, 1H) 7,15 (dd, 1H) 7,39 (s, 1H) 7,60 (s, 2H) 9,3-10,0 (sb,hapan H)	247-249 (haj.)
59		CDCl3	1,49 (s, 18H) 2,65 (s, 3H) 5,53 (s, 1H) 7,17 (s, 1H) 7,64 (s, 2H)	161-162
60		CDCl3	1,44 (s, 18H) 3,25-3,41ja 3,60-3,75 (mol. m, 1H) 5,31 (s, 1H) 5,71 (m, 1H) 7,17 (s, 2H) 7,57 ja8,70(mol.m, 2H)	191-193

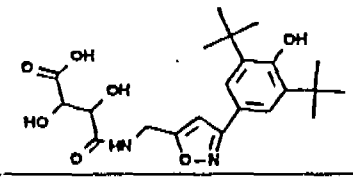
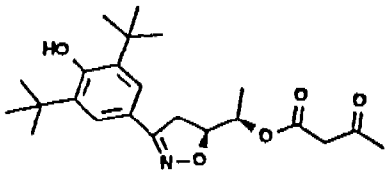
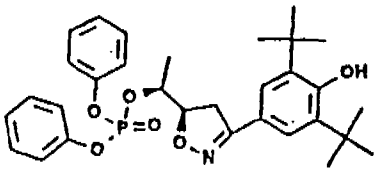
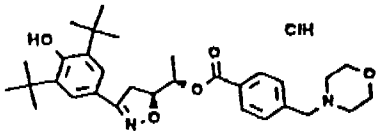
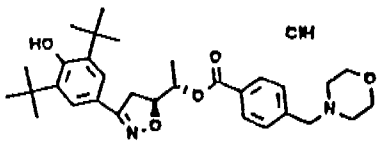
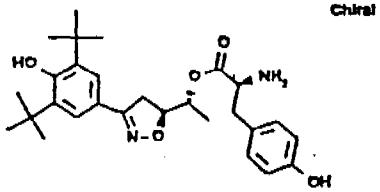
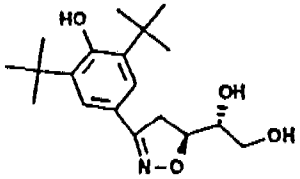
61		DMSO-d6	1,39 (s, 18H) 3,35-3,55 ja 3,81-3,99 (mol.m, 1H) 5,73 (m, 1H) 7,11 (s, 1H) 7,16 (s, 2H) 7,92 ja 8,02 (mol.d, 2H)	89-91
62		CDCl3	1,44 (s, 18H) 3,17-3,33 ja 3,51-3,67 (mol.m, 1H) 5,33 (sb, 1H) 5,78 (m, 1H) 7,13 (s, 2H) 6,7-7,5 (sb, hapan H)	151-153
63		CDCl3	1,43 (s, 18H) 2,60-2,82 (m, 4H) 2,90-3,05 ja 3,20-3,38 (mol.m, 1H) 5,25 (sb, 1H) 5,49 (m, 1H) 7,13 (s, 2H) 6,1-7,6 (sb, hapan H)	171-174
64		CDCl3	1,20 (s, 18H) 2,47-2,88 (m, 5H) 3,06-3,25 (m, 1H) 4,25 (sb, hapan H) 5,28 (m, 1H) 6,89 (s, 2H)	220-224
65		CDCl3	1,43 (s, 18H) 1,53 (d, 3H) 2,0-2,21 (m, 2H) 2,55-2,79 (m, 2H) 2,90-3,05 ja 3,20-3,39 (mol.m, 1H) 5,35 (sb, hapan H) 5,48 (m, 1H) 7,13 (s, 2H)	182-184 (haj.)

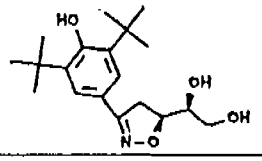
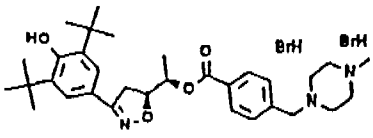
66		CDCl3	1,49 (s, 18H) 5,54 (s, 1H) 7,25 (s, 2H) 10,02 (s, 1H)	127
67		CDCl3	1,35-1-95 (m, 2H ja s, 18H) 2,1-2,3 (m, 2H) 2,45-2,67 (m, 2H) 3,39 (s, 2H) 5,46 (s, 1H) 7,49 (s, 2H)	121-122
68		CDCl3	1,47 (s, 18H) 2,8 (sb, 1H) 5,45 (sb, 1H) 5,95 (s, 1H) 6,44 (s, 1H) 7,3-7,5 (m, 5H) 7,59 (s, 2H)	140
69		CDCl3	1,23 ja 1,35 (mol.s, 3H) 1,45 (s, 18H) 2,06 sb, 1H) 3,15-3,43 (m, 2H) 4,53 (m, 1H) 5,48 (sb, 1H) 7,50 (s, 2H)	139
70		DMSO-d6	1,3-1,65 (2s, 18H ja 2d, 3H) 2,95-3,3 (m, 2H) 4,42 (tb, 1H) 5,9-6,13 (m, 1H) 6,98 ja 7,02 (2s, 1H) 7,1-7,55 (m, 5H ja 2s, 2H) 8,4 (sb, 3H)	105-125 (haj.)

71		DMSO-d6	1,3-1,45 (s, 18H ja d, 3H) 3,04-3,3 (m, 2H) 4,38 (tb, 1H) 5,93-6,08 (m, 1H) 7,11 (s, 1H) 7,28-7,41 (m, 5H) 7,56 (s, 2H) 8,4 (sb, 3H)	105-115 (haj.)
72		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 1,63 (d, 3H) 3,0-3,25 (m, 2H) 4,41 (tb, 1H) 6,05-6,14 (m, 1H) 7,0 (s, 1H) 7,1-7,28 (m, 5H) 7,56 (s, 2H) 8,72 (sb, 3H)	190
73		DMSO-d6	1,02 ja 1,23 (mol.d, 1,5H) 1,35 ja 1,40 (mol.s, 9H) 2,85-3,57 (m, 4H) 4,1-4,3 (m, 1H) 4,54-4,78 (m, 1H) 4,95-5,15 (m, 1H) 7,1-7,48 (m, 5H ja 2d, (mol.1H) 8,55 (sb, 3H)	210-215
74		DMSO-d6	1,02 (d, 3H) 1,40 (s, 18H) 2,90-3,50 (m, 4H) 4,1-4,25 (m, 1H) 4,58-4,73 (m, 1H) 4,90-5,04 (m, 1H) 7,1-7,31 (m, 5H) 7,37 (s, 2H) 8,79 (sb, 3H)	207

75		DMSO-d6	1,23 (d, 3H) 1,35 (s, 18H) 2,95-3,06 (d, 2H) 3,20-3,57 (m, 2H) 4,25 (t, 1H) 4,63-4,78 (m, 1H) 5,08-5,15 (m, 1H) 7,1-7,3 (m, 5H) 7,38 (s, 2H) 8,40 (sb, 3H)	193
76		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 1,66 (d, 3H) 3,93 (sb, 2H) 6,13 (q, 1H) 7,17 (s, 1H) 7,45 (sb, 1H) 7,57 (s, 2H) 8,60 (sb, 3H)	70-85 (haj.)
77		DMSO-d6	1,23 (d, 3H) 1,40 (s, 18H) 3,22-3,90 (m, 4H) 4,65-4,85 (m, 1H) 5,0-5,18 (m, 1H) 7,40 (s, 2H) 7,47 (sb, 1H) 8,40 (sb, 3H)	90-110 (haj.)
78		CDCl3	1,22 (d, 3H) 1,45 (s, 18H) 1,50-2.05 (m, 4H) 2,97-3,12 ja 3,40-3,57 (mol.m, 1H) 3,2-3,8 (sb, 2H) 4,0-4,28 (m, 2H) 4,82-5,02 (m, 1H) 5,50 (s, 1H) 7,49 (s, 2H)	144-145

79		CDCl3	1,45 (s, 18H) 1,50-2,0 (m, 2H) 2,2-2,35 (m, 2H) 2,6 (sb, 1H) 3,07-3,16 ja 3,40-3,56 (mol. m, 1H) 3,85-4,05 (m, 1H) 4,8-5,0 (m, 1H) 5,08-5,23 (m, 2H) 5,50 (s, 1H) 5,7-5-95 (m, 1H) 7,49 (s, 2H)	103-105
80		CDCl3	1,45 (s, 18H) 1,55-2,45 (m, 5H) 2,95-3,10 ja 3,40-3,56 (mol. m, 1H) 3,91-4,05 (m, 1H) 4,87-5,05 (m, 1H) 5,08-5,23 (m, 2H) 5,48 (s, 1H) 5,7-5-95 (m, 1H) 7,49 (s, 2H)	115-118
81		CDCl3	0,88 (t, 3H), 1,15-1,7 (m, 27 H ja s, 18 H kohdassa 1,46) 2.3 (t, 2H) 3,05-3-25 ja 3,3-3,47 (mol. m, 1H) 4,6-4-75 (m, 1H) 4,98-5,12 (m, 1H) 5,48 (s, 1H) 7,48 (s, 2H)	Öljy
82		CdCl3	1,47 (s, 18 H) 2,06 ja 2,21 (mol. s, 3H) 4,45-4,81 (m, 2H) 5,48 (sb, 1H) 5,64 ja 5,83 (mol.d, 2H) 6,49 (s, 1H) 6,85 (t, 1H) 7,56 (s, 2H)	88-92 (haj.)

Esim.	Rakenne	Liuote	1-H-NMR	Sp.
83		DMSO-d6	1,43 (s, 18H) 4,30-4,51 (m, 4H) 6,69 (s, 1H) 7,39 (sb, 1H) 7,52 (s, 2H) 8,48 (tb, 1H)	125-154
84		CDCL3	1,34 (d, 3H) 1,46 (s, 9H) 2,25 (s, 3H) 3,13-3,49 (m, 2H) 3,45 (s, 2H) 4,62-4,77 (m, 1H) 5,03-5,18 (m, 1H) 5,49 (sb, 1H) 7,49 (s, 2H)	102
85		DMSO-d6	1,31 (d, 3H) 1,40 (s, 18H) 3,18-3,60 (m, 2H) 4,69-4,95 (m, 2H) 7,13-7,48 (m, 12H)	118
86		DMSO-d6	1,32 (d, 3H) 1,38 (s, 18H) 2,95-3,98 (m, 10H) 4,38 (sb, 2H) 4,76-4,91 (m, 1H) 5,19-5,28 (m, 1H) 7,40 (s, 2H) 7,43 (sb, 1H) 7,73 (d, 2H) 7,94 (d, 2H) 11,79 (sb, 1H)	241-243 (haj.)
87		DMSO-d6	1,32-1,45 (d, 3H ja s, 18H) 2,95-4,00 (m, 10H) 4,40 (db, 2H) 4,74-4,91 (m, 1H) 5,09-5,23 (m, 1H) 7,41 (s, 2H) 7,43 (sb, 1H) 7,76 (d, 2H) 8,00 (d, 2H) 11,50 (sb, 1H)	248-255 (haj.)
88		CDCL3	1,25 ja 1,30(mol.d, 1.5H) 1,41 ja 1,44(mol.s, 9H) 2,65-3,71 (m, 5H) 4,65-4,82 (m, 1H) 5,04-5,22 (m, 1H) 5,49 (sb, 1H) 6,55-6,68 (m, 2H) 6,85-6,97 (m, 2H) 7,47 ja 7,49(mol.s, 1H)	110-135
89		DMSO-d6	1,41 (s, 9H) 3,26-3,63 (m, 5H) 4,52-4,71 (m, 1H ja sb, 1H) 5,02 (d, 1H) 7,37 (s, 1H) 7,41 (s, 2H)	155

Esim.	Rakenne	Liuote	1-H-NMR	Sp.
90		DMSO-d6	1,40 (s, 9H) 3,14-3,52 (m, 5H) 4,56-4,72 (m, 2H) 4,85 (d, 1H) 7,36 (s, 1H) 7,39 (s, 2H)	129
91		DMSO-d6	1,32 (d, 3H) 1,41 (s, 18H) 2,87 (sb, 3H) 3,10-3,68 (m, 10H) 4,27 (sb, 2H) 4,79-4,92 (m, 1H) 5,21-5,33 (m, 1H) 7,45 (s, 2H) 7,47 (sb, 1H) 7,61 (d, 2H) 7,96 (d, 2H) 10,0 (sb, 1H)	195-198

Farmakologiset kokeet

Yhdisteet, joilla on kaava I, tutkittiin niiden arvokkaiden tulehduksenvastaisten, astmanvastaisten ja immuunimoduloivien ominaisuuksien ja hyvän siedettävyyden karakterisoimiseksi käyttämällä seuraavia koejärjestelyjä, jotka tunnetusti soveltuvat erityisen hyvin sellaisten antireumaattisten yhdisteiden vaikutuksen laadun arviointiin.

Polymorfonukleaaristen leukosyyttien (PMNL) eristys ihmisen ääreisverestä testejä 1 ja 2 varten

10 ml ihmisen verta laimennettiin 10 ml:lla HBSS:ää (Serva) ja yhdistettiin 15 ml:n kanssa Lymphorepiä (Dr. Molter GmbH, Heidelberg), joka muodosti alemman kerroksen. Suoritettiin 25 minuutin sentrifugointi kiihtyvyydellä 400·G [1 600 kierrosta/minuutti (min^{-1}), Minifuge 2, Heraeus, Osterode]. Tällöin muodostui kolme faasia: Ylin koostuu plasmasta ja trombosyyteistä, keskimmäinen faasi on Lymphorepiä. Näiden kahden faasin välissä on valkea, yksitumaisista soluista koostuva rengas. Alin faasi koostuu erytrosyyteistä, jotka ovat valkean PMNL-kerroksen peittämiä. Ylin faasi samoin kuin Lymphorep ja valkea ren-

gas poistettiin varovasti ruiskulla. Jäljelle jäänyt sakka suspendoitiin varovasti uudelleen liuokseen (15 ml), joka sisälsi 3 % dekstraania PM16:ssa (M = 485 000; Sigma, Deisenhofen). Suspensio jätettiin sitten tunniksi seisomaan huoneenlämpötilaan. Erytrosyytit laskeutuivat tällöin, kun taas PMNL jäi supernatanttiin. Supernatantti erotettiin ja laimennettiin suunnilleen yhtä suurella tilavuudella PM16:ta, ja sitä sentrifugoitiin 15 minuuttia kiihtyvyydellä 400·G. Jos PMNL-sakka sattuu olemaan voimakkaasti erytrosyyteillä kontaminoitunut, hypotoninen lyysi on välttämätön. Sitä varten sakka suspendoitiin uudelleen 750 µl:aan vettä. Täsmälleen 15 sekunnin kuluttua tehtiin laimennus noin 7 ml:lla PM16:ta ja sentrifugoitiin 10 minuuttia kiihtyvyydellä 400·G. Tarvittaessa tämä lyysi toistettiin vielä kerran. Muussa tapauksessa PMNL-sakka suspendoitiin uudelleen sopivaan väliaineeseen.

Testi 1: Proteolyyttisen aktiivisuuden vapautus

250 µl:n erää PMNL:ää [$5 \cdot 10^6$ solua/ml PBS, jota oli täydennetty glukoosilla (7,5 mmol/l)] inkuboitiin 1 µl:n kanssa testattavaa ainetta 20 minuuttia 37 °C:n lämpötilassa. Sitten lisättiin 1 µl sytokalasiini B:tä (5 µg/ml testiseosta) ja inkuboitiin vielä 5 minuuttia lämpötilassa 37 °C. Sen jälkeen kun oli lisätty 1 µl tuumorinekroositekijä α:aa [TNF; 30 ng/ml testiseosta], inkubointia jatkettiin 5 minuuttia. Vapautus käynnistettiin 1 µl:lla fMLP:tä (10 nmol/l testiseosta). Sen jälkeen kun seosta oli pidetty 60 minuuttia lämpötilassa 37 °C, reaktio päätettiin jäähdyttämällä näytteet lämpötilaan 0 °C. Näytteet sentrifugoitiin ja supernatantti erotettiin ja jäädytettiin. Sytokalasiini ja fMLP liuotettiin DMSO:iin ja TNF laimennettiin puskuriliuoksella. 50 µl supernatanttia sekoitettiin 96-syvennyksisellä mikromaljalla 175 µl:n kanssa puskuriliuosta (100 mM HEPES, pH 7,5; 500 mmol NaCl:a/l). Sen jälkeen kun oli lisätty 25 µl substraattia (metoksisukkinyyli-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-p-nitroanilidi) kustakin sy-

vennyksestä mitattiin ekstinktiot aallonpituudella 405 nm 0, 5, 10, 15, 30 ja 60 minuutin kuluttua.

Testi 2: Happiradikaalien vapautus

PMNL suspendoitiin glukoosilla (7,5 mmol/l) täydennettyyn PBS:ään (Dulbecco) ($5 \cdot 10^6$ solua/ml). On kiinnitettävä huomiota siihen, että PMNL on vapaa erytrosyyteistä. Puolimikrokyvetissä sekoitettiin keskenään 100 µl PMNL:ää, 700 µl PBS:ää (glukoosilla täydennettynä) ja 100 µl sytokromi C:tä (9,38 mg/ml PBS + glukoosi). fMLP:n indusoimaa hapen vapautumista varten sekoitettiin keskenään 100 µl PMNL:ää, 500 µl PBS:ää (glukoosilla täydennettynä), 100 µl sytokalasiini B:tä ($1 \cdot 10^{-6}$ M), 100 µl TNF:ää (0,05 ng) ja 100 µl sytokromi C:tä (9,38 mg/ml PBS + glukoosi). Mittaukset tehtiin kaksisädefotometrillä (Perkin-Elmer 552 S) aallonpituudella 550 nm. Mittausalue oli 0 - 1 ekstinktioyksikköä. Kyvettien lämpötila pidettiin termostaatin avulla arvossa 37 °C. Referenssikyvetti sisälsi lisäksi 10 µl SOD:tä (6 mg SOD/ml PBS + glukoosi). Viiden minuutin esivirtauksen jälkeen reaktio käynnistettiin 100 µl:lla indusointiainetta. Reaktio käynnistettiin $1 \cdot 10^{-7}$ M fMLP:llä.

Testi 3: Verisolujen LTB_4:n muodostus

Valkoisten verisolujen eristys:

40 ml ihmisen verta sekoitettiin 6 ml:n kanssa 6-prosenttista dekstraaniliuosta [dekstraani (M = 480 000) PM16:ssa]. Sen jälkeen kun seosta oli pidetty 1 tunti huoneenlämpötilassa, valkosoluista koostuva supernatantti erotettiin ja laimennettiin yhtä suurella tilavuudella PM16:ta ja sitä sentrifugoitiin 15 minuuttia kiihtyvyydellä 300·G (1 600 min^{-1}). Sakka suspendoitiin ensin uudelleen noin 5 - 6 ml:aan PM16:ta ja sen jälkeen, kun solujen lukumäärä oli määritetty Coulter-laskurilla, solujen määrä säädettiin arvoon 10^7 solua/ml.

Testiseos koostui 0,24 ml:sta solususpensiota, 0,03 ml:sta liuosta, joka sisälsi $CaCl_2$:n (20 mmol/l) ja $MgCl_2$:n (5 mmol/l), ja 5 µl:sta testattavaa ainetta. Sen jälkeen

kun seosta oli esi-inkuboitu 15 minuuttia lämpötilassa 37 °C, reaktio käynnistettiin 0,03 ml:lla A23187:n ja glutationin seosta (100 µg A23187:ää/ml; 15,4 µg glutationia/ml). Sen jälkeen kun testiseosta oli inkuboitu 5 minuuttia lämpötilassa 37 °C, inkubointi päätettiin jäähdyttämällä näytteet välittömästi lämpötilaan 0 °C. Eppendorff-sentrifugissa suoritetun 2 minuutin sentrifugoinnin (0 °C) jälkeen supernatantti erotettiin ja tutkittiin kromatografisesti.

Suurpainenestekromatografia (HPLC):

HPLC-laitteisto koostui Kratos-pumpusta (Spectroflow 400), jäähdytettävästä automaattisesta näyteinjektorista BT 7041 (Biotronik), jossa oli 75 µl:n näytesilmukka, Nucleosil C_{18} -kolonnista (100 x 3 mm, Chrompack-täyte, jonka hiukkaskoko oli 5 µm), UV-detektorista (Kratos) Spectroflow 757 (aallonpituus 280 nm, mittausalue 0,1 AUFS, aikavakio 0,5 s) ja Spectra-Physics-integraattorista (SP 4270). Eluentti (725 ml metanolia, 275 ml vettä ja 0,1 ml etikkahappoa) syötettiin virtausnopeudella 0,7 ml/minuutti paineen ollessa noin 100 baaria.

Huomautuksia:

On osoittautunut hyödylliseksi tehdä ennen varsinaisten mittausten aloittamista mittaus ylimääräisestä vertailunäytteestä. Tällöin voidaan testata käytettävä mittausalue ja mahdollisesti muuttaa sitä. Ehdottoman välttämätöntä on mitata testattavat aineet kulloisinakin testauspitoisuuksina (esim. 10^{-5} mol/l) PM16:ssa myös ennen soluinkubaatteja, koska testattavat aineet saattavat peittää LTB_4-huipun. Mikäli näin tapahtuu, on käytettävä pienempää pitoisuutta.

Testi 4: Sytokiinin vapautumisen stimulointi

Yksitumaisten solujen eristys ihmisen verestä:

10 ml ihmisen verta, joka oli stabiloitu 1 ml:lla 3,8-prosenttista natriumsitraattiliuosta, laimennettiin 10 ml:lla PM16:ta (Serva, Heidelberg) ja yhdistettiin

15 ml:n kanssa Lymphorepiä (Dr. Molter GmbH, Heidelberg), joka muodosti alemman kerroksen. Näytteitä sentrifugoitiin huoneenlämpötilassa 40 minuuttia kiihtyvyydellä 400·G (1 600 min^{-1}, Minifuge 2, Heraeus, Osterode). Yksitumaiset solut ovat tällöin havaittavissa valkeana renkaana Lymphorepin ja plasman rajalla. Tämä rengas poistettiin varovasti ruiskulla ja laimennettiin yhtä suurella tilavuudella PM16:ta, ja sitä sentrifugoitiin 10 minuuttia kiihtyvyydellä 400·G. Sakka pestiin noin 10 ml:lla RPMI 1640:tä [jota oli täydennetty L-glukamiinilla (300 mg/l), Gibco, Eggenstein) (Wallis 1986). Sen jälkeen kun solut oli suspendoitu uudelleen noin 1 ml:aan RPMI 1640:tä [johon oli lisätty L-glukamiinia (300 mg/l), HEPES:ää (25 mmol/l), streptomysiiniä (100 µg/ml) ja penisilliiniä (100 µg/ml)], solutiheys määritettiin Coulter JT -laskurilla (Coulter Diagnostics) ja säädettiin arvoon $5 \cdot 10^6$/ml. Solut koostuvat tyypillisesti 90-%:isesti lymfosyyteistä ja 10-%:isesti monosyyteistä.

230 µl:n erää yksitumaisia soluja inkuboitiin 10 µl:n kanssa testattavaa ainetta [1 µmol/l DMSO-vesiseoksessa (1:10)] ja 1 µl:n kanssa lipopolysakkaridia (LPS; 500 µg liuotettuna 1 ml:aan DMSO:ta ja laimennettuna ennen testin aloittamista vedellä suhteessa 1:10, peräisin *Salmonella abortus equista*, Sigma, Deisenhofen) 20 - 22 tuntia 37 °C:n lämpötilassa; CO_2-pitoisuus 5 % (IL-6:n tapauksessa 5 tuntia). Näytteet jäähdytettiin jäähauteessa lämpötilaan 0 °C ja sentrifugoitiin Sigma-sentrifugissa (2 min, 2 000 min^{-1}). Pienistä eristä supernatanttia tehtiin määritykset ELISA-laitteella (Biermann, Bad Nauheim). Lyhenne IL tarkoittaa interleukiinia ja THF tuumorinekroositekijää.

Testi 5: Syklo-oksigenaasista riippuvainen trombosyyttien aggregaatio

Runsaasti verihiutaleita sisältävä plasma (PRP):

Ihmisen vereen sekoitettiin hyytymisen estämiseksi 3,8-prosenttista natriumsitraattiliuosta (1/10 veren tilavuudesta). Sitten suoritettiin 20 minuutin sentrifugointi kiihtyvyydellä 105·G ja supernatantti (PRP) erotettiin. 200 µl:n erää PRP:tä esi-inkuboitiin PAP4-aggregometrissä (BioData) 30 µl:n kanssa testattavaa ainetta 10 minuuttia lämpötilassa 37 °C. Testattava aine liuotettiin orgaanisen liuotteeseen ja laimennettiin puskuriliuoksella (50 mM TisHCl, pH 8,0; 90 mmol NaCl:a/l) suhteessa 1:30. Aggregoituminen laukaistiin 20 µl:lla indusointiainetta. Aggregoitumisen aikana näytteitä sekoitettiin nopeudella 800 min^{-1}. Indusointiaineena käytettiin arakidonihappoa (5 mg/-ml).

Yhteenveto testien 1 - 3 tuloksista on esitetty taulukossa 2. Taulukossa esitetyt arvot osoittavat käytetyn pitoisuuden yksikköinä µmol/l ja lisäksi mitatun reaktiivisuuden prosentteina suhteessa vertailukokeeseen, jota vastaa arvo 100 %. Testissä 4 on lisäksi ilmoitettu käytetty interleukiini.

Taulukko 2

Esimerkki	Testi 1	Testi 2	Testi 3	Testi 4	Testi 5
1			10μM 92		10μM 93
3					100μM 98
5					100μM 98
7					100μM 95
8			10μM 15 1μM 93		100μM 91
9	100μM 64		10μM 0 1μM 56	IL-1 10μM 73 IL-6 10μM 93 TNFσ 10μM 63	100μM 92
10			10μM 20 1μM 89	TNFσ 10μM 78	100μM 98
13	100μM 20 10μM 77	25μM 22 10μM 65			10μM 98
14					10μM100
18				IL-1σ 100 μM 36 10μM 89	
19	100μM 20 10μM 78	10μM 94			10μM 100
20					10μM 100
24				IL-1 10μM 86	10μM 94
25			10μM 29 1μM 85	IL-1σ 10μM 62 ILβ 10μM 93 TNFσ 10μM 82	10μM 86
26				TNFσ 10μM 88	10μM 94
27					100μM 97

Esimerkki	Testi 1	Testi 2	Testi 3	Testi 4	Testi 5
28	10μM 59 1μM 97	25μM 8 10μM 60	10μM 0 1μM 14	IL-1σ 10μM 93	10μM 93
31					100μM 100
32	100μM 34 10μM 72 1μM 84				
34					100μM 98
35				IL-1σ 10μM 84	100μM 94
36			10μM 93		100μM 87
38				IL-1σ 1μM 89 IL-1β 1μM 85	100μM 90
39					100μM 98
41	100μM 78	50μM 36 5μM 75	10μM 13	TNFσ 10μM 89	100μM 95
43			10μM 93		100μM 99
44					10μM 99
45					100μM 98
46				IL-1σ 1μM 77 IL-1β 1μM 85 TNFσ 10μM 79	100μM 90
47	100μM 17 10μM 38 1μM 85			IL-1σ 10μM 72 1μM 89 TNFσ 10μM 64	
49	100μM 19 10μM 23 1μM 88	50μM 12 5μM 80	10μM 0 1μM 90	IL-6 1μM 91 TNFσ 10μM 91	
57					100μM 99

Esimerkki	Testi 1	Testi 2	Testi 3	Testi 4	Testi 5
58					100μM 99
59	100μM 35 10μM 61 1μM 91	10μM 48 1μM 135			
60			10μM 88		
61	100μM 80		10μM 3	IL-1α 1μM 94 TNFα 10μM 68	100μM 94
63	100μM 66 10μM 88	50μM 79	10μM 91	IL-1α 10μM 75 IL-1β 10μM 77	
64	100μM 72 10μM 96			IL-1 10μM 68 1μM 85 IL-1 10μM 82	100μM 97
70		10μM 22			
71	10μM 42 1μM 79				25μM 97
72	10μM 51 1μM 82				25μM 100
73		10μM 9 1μM 100			25μM 100
74	10μM 64				25μM 95
75	10μM 49 1μM 89				25μM 98
76	100μM 9 10μM 68				25μM 99
77	100μM 30 10μM 74				25μM 100
78					50μM 94
79					100μM 96
80					50μM 97

Esimerkki	Testi 1	Testi 2	Testi 3	Testi 4	Testi 5
81					100µM100
82					100µM 93
85					100µM 94

Taulukon tulkinta esimerkin 9 osalta:

Sen jälkeen kun lisätään 100 µl esimerkin 9 mukaista inhibiittoria, vapautuu 64 % proteolyyttisestä aktiivisuudesta (testi 1). Ilman inhibiittoria vastaavasti 100 % proteolyyttisestä aktiivisuudesta.

Tulokset

Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat tehokkaita tulehdusta ehkäiseviä aineita, sillä niillä on selviä biologisia vaikutuksia proteolyyttisen aktiivisuuden (testi 1) ja aktiivisen hapen (testi 2) vapautumista sekä leukotrieeni B_4:n synteesiä (testi 3) ihmisen leukosyyttijärjestelmässä inhiboivina aineina. Erilaisten sytokiinien vapautuminen ihmisen elimistössä yksitumaisista soluista (testi 4) vähenee myös. Erityisesti mainittakoon, ettei yhdisteillä ole minkäänlaista inhibitorista vaikutusta ihmisen syklooksigenaasista riippuvaiseen trombosyyttijärjestelmään (testi 5). Ei-toivottuja sivuvaikutuksia (verenvuotoajan pitenemistä, haavaumien muodostumista mahalaukkuun tai suolistoon, munuaistoksisuutta) ei siis ole odotettavissa.

Testi 6: Artriitinvastaisen vaikutuksen testaus adjuvanttiartriittimallilla

Koe-eläiminä käytettiin urosrottia, jotka olivat Wistar-Lewis-kantaa (Mollegaard, Tanska). Niiden ruumiinpaino oli 160 - 200 g. Freundin adjuvantin [= 0,6 mg *Mycobacterium butyricum* -suspensiota (Difco Lab., Detroit, MI, USA)/ml raskasta kirkasta parafiiniöljyä (Merck, Darmstadt); 0,1 ml] subplantaarinen injektointi hännän juureen johti 10. - 14. testipäivänä immuunipatologisiin prosesseihin ja kroonisiin tulehduksiin, erityisesti artriittisten ja periartriittisten oireiden muodossa, ruumiin muissa

kohdissa (sekundaariset leesiot). Eläimille annettiin perusrehua Altromin-R (Altrogge-yhtiö, Lage) ja vesijohtovettä *ad libitum*. Koe-eläimille annettiin 14. päivästä alkaen testin loppuun kodeiinianalgeettia 60 mg/kg. Testattavia aineitä annettiin päivittäin (yhteensä 17 päivän ajan), adjuvantin antopäivästä alkaen, suun kautta CMC-suspensiona injektointimäärän ollessa 1 ml/100 g ruumiinpainoa. Ensimmäisenä ja 18. testipäivänä määritettiin molempien takakäpälien tilavuus ja ruumiinpaino. Vaikutuksen kriteerinä toimi käpälien tilavuuden lisääntymisen alenema suhteessa hoitoa saamattomaan vertailuryhmään, jolloin laskettiin keskiarvo kummastakin takakäpälästä. Yhteenveto tuloksista on esitetty taulukossa 3.

Testi 7: Astmanvastaisen vaikutuksen testaus

Astmanvastaisen vaikutuksen testaukseen käytettiin nukutettuja marsuja, jotka tarjoavat mahdollisuuden PAF:n injektointiin kanyloimalla *Vena jugularis*. Testivalmisteet annettiin myös laskimonsisäisesti (i.v) 5 minuuttia ennen PAF:n antamista saman laskimokanyylin kautta verisuoneen tai pohjukaissuolensisäisesti (i.d.) leikkauksella pohjukaissuoleen tehdyn ja kanyloidun aukon kautta 15 minuuttia ennen PAF:ää. Rekisteröitiin keuhkoputkien laajuus Overflow-pneumogrammissa ennen valmisteen antamista ja sen jälkeen. Arviointi: ED_{50} yksikköinä mg/kg (i.d.) suhteessa PAF:n indusoimaan astmakohtaukseen. Yhteenveto tuloksista on esitetty taulukossa 3.

Testi 8: Kasvainsolujen proliferaation esto

Testattavien aineiden proliferaatiota estävän vaikutuksen määrittämiseen käytettiin kasvainsolulinjaa 20-10-5S [hybridoomasolulinja, hankittu ATCC:stä (American Type Culture Collection), joka tuottaa hiiren T-solujen vastaista vasta-ainetta]. Soluja viljeltiin seerumittomissa olosuhteissa CG-alustalla [Cell-Growth-Medium = Iscove-ATL (+ albumiini + transferriini + lipidi), Vitromex-yhtiö, Vilshofen] lämpötilassa 37 °C ja 5 % CO_2:a sisältävässä atmosfäärissä. Testiseokseen käytettiin ainoastaan so-

luja, jotka olivat logaritmisessa kasvuvaiheessa. Tutkittavia aineita pipetoitiin erilaisiksi pitoisuuksiksi (1 - 50 µmol/l) yhdessä 20-10-5S-solujen ($4 \cdot 10^3$) kanssa pyöreäpohjaisiin mikromaljoihin (kokonaistilavuus alustan kera 200 µl). 48 tunnin inkuboinnin (37 °C ja 5 % CO_2:a) jälkeen maljoihin lisättiin 25 µl tritioitua tymidiiniä (= 0,25 µCi/testierä, ominaisaktiivisuus 23 Ci/mmol). Seuraavien 16 tunnin aikana tuli radioisotoopilla leimattu tymidiini sisällytetyksi kasvavien solujen DNA:han. Seokset imusuodatettiin lasikuitusuodatinta käyttäen, ja sisällytetyksi tullut radioaktiivisuus määritettiin ß-laskurilla (Beta-Plate-System 1205, Wallac-yhtiö). IC_{50}-arvot (50-%:ista inhibitiota vastaava pitoisuus) laskettiin käyttämällä perusteena sisällytetyksi tullutta radioaktiivisuutta suhteessa positiiviseen vertailunäytteeseen (testiseos ilman tutkittavaa ainetta) verrattuna, ja niistä on esitetty yhteenveto taulukossa 3.

Taulukko 3

Esimerkki	Testi 6	Testi 6	Testi 7	Testi 8
	Annos (mg/kg)	Käpälän til. (inhibitio-%)	ED_{50} (mg/kg)	IC_{50} (µM)
1	50	70	10-50i.d.	5-10
3				10
4				30
5			< 10i.d.	
6			n.50i.d.	
7			10-30i.d.	
8	50	67	ca.10i.d.	< 5
9			n.50.i.d.	
11				< 5
12	50	82		10
13	50	84	n. 50.i.d.	6.10
14			10-50i-d-	
15	50	60		8-15
16				30
17				8-15

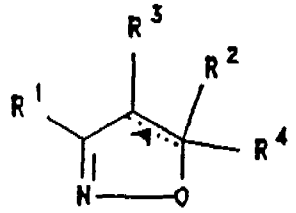
Esimerkki	Testi 6	Testi 6	Testi 7	Testi 8
	Annos (mg/kg)	Käpälän til. (inhibitio-%)	ED_{50} (mg/kg)	IC_{50} (μM)
18				5-10
19	25	85		<5
20	25	67	n.50i.d.	<5
22	50	74		
24	50	43		<5
25	50	44	3-10i.d.	<5
26				<5
27	50	71		<5
28	50	74		<5
29				<5
30	50	63		5-10
33				<5
37				<5
39				30
40			1-3i.d.	<5
41				<5
42				5-10
44				5-10
45				5-10
47			10-50i.d.	5-10
48	50	60	10-50i.d.	5-10
49			n.50i.d.	5-10
52			3-10i.d.	<5
53	25	48	10-50i.d.	8-10
54			1-3i.d.	5-10
55	50	47		<5
56			n.50.i.d.	

Esimerkki	Testi 6	Testi 6	Testi 7	Testi 8
	Annos (mg/kg)	Käpälän til. (inhibitio-%)	ED_{50} (mg/kg)	IC_{50} (μM)
57				<5
59			1-3i.d.	30
66	25	59		<5
67	50	53		<5
69	50	83		5-10
70	25	59		5
71	25	66		5-10
72	25	60		5-10
73	50	73		
74	25	60		5-10
75	25	76		5-10
76	50	70		20
77	50	82		20
78				5-10
79				5-10
80				5-10
81	50	67		
83	50	39		
84	25	49		
85				<5
86	20	70		<5
87	20	50		<5
88				10
89	50	36		20
90	50	36		30

Merkki < tarkoittaa pienempi kuin.

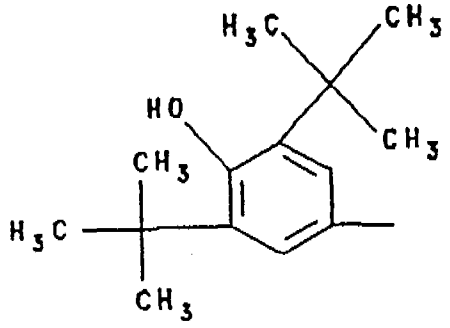
Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, jolla on kaava (I),



(I)

ja/tai kaavan (I) mukaisen yhdisteen fysiologisesti siedettävissä oleva suola ja/tai kaavan (I) mukaisen yhdisteen stereoisomeerinen muoto, jossa kaavassa toisella ryhmistä R^1 ja R^2 on kaavan (II) mukainen merkitys



(II)

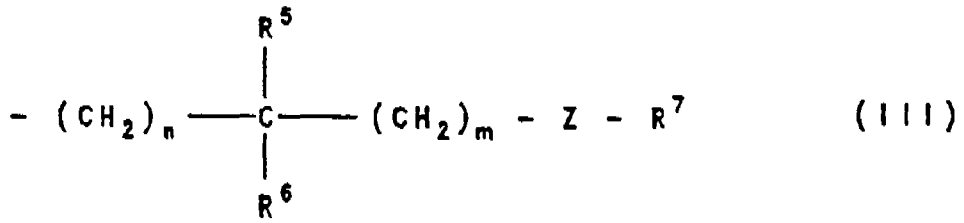
ja toisella jokin seuraavista merkityksistä:

a) pyridyyli,

b) tiofenyyli,

c) tiatsolyyli,

d) ryhmä, jolla on kaava (III),



(III)

jossa

n tarkoittaa lukua 0, 1, 2, 3, 4, 5 tai 6,

m tarkoittaa lukua 0, 1, 2, 3 tai 4,

Z on

1) -O- tai

2) -NH-,

R^5 ja R^6 ovat kumpikin itsenäisesti

1) vetyatomi,

2) C_{1-4}-alkyyli,

3) C_{2-4}-alkenyyli,

4) C_{2-4}-alkynyyli,

5) fenyyli tai

6) OH ja

R^7 on

1) vetyatomi,

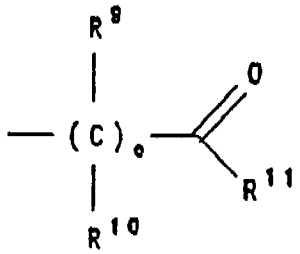
2) aminohaposta peräisin oleva ryhmä,

3) trifluorimetyylisulfonyyli,

4) $-O-P(O)(OH)_2$,

5) $-O-P(O)(OH)_2$, joka on mono- tai diesteröity fenyyli- tai C_{1-6}-alkyyliryhmällä, tai

6) ryhmä, jolla on kaava (IV),



(IV)

jossa

o on 0 tai 1,

ryhmillä R^9 ja R^{10} on toisistaan riippumattomasti merkitys

1) vetyatomi tai

2) C_{1-4}-alkyyli,

R^{11} on

1) OH,

2) $-O-C_{1-4}$-alkyyli,

3) C_{1-20}-alkyyli,

4) C_{1-20}-alkyyli, joka sisältää yhden tai useamman substituentin, joka/joista kukin itsenäisesti voi olla

4.1. -COOH,

4.2. -OH,

4.3. -O-asetyyli tai

4.4. =O,

5) -COOH,

6) $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-C_{1-4}$-alkyyli,

7) N-glysyyli,

8) N-glysyyli-C_{1-4}-alkyyliesteri,

9) N-C_{1-4}-alkyylihydroksyyliamino,

10) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino,

11) 5-metyyli-isoksatsol-4-yyli,

12) 1-syaani-2-hydroksi-1-propenyyli,

13) fenyyli tai

14) fenyyli, joka on substituoitu yhdellä tai useammalla ryhmällä

14.1. C_{1-4}-alkyyli-N(R^{12})(R^{13})

jossa ryhmillä R^{12} ja R^{13} on toisistaan riippumatto-masti jokin seuraavista merkityksistä:

1) vetyatomi,

2) C_{1-4}-alkyyli,

3) fenyyli-C_{1-2}-alkyyli,

4) R^{12} ja R^{13} muodostavat yhdessä niitä yhdistävän typpiatomin kanssa 5 - 7-jäsenisen heterosyklisen ryhmä, joka on substituoimaton tai 1 - 3 C_{1-4}-alkyyliryhmällä subs-tituoitu ja jossa hiiliatomi voi olla korvautunut rikki-, happi- tai typpiatomilla, ja

5) aminohaposta peräisin oleva ryhmä,

tai R^6 ja R^7 ovat sitoutuneet toisiinsa ja ovat yhdessä 1 - 3 CH_2-ryhmää;

e) ryhmä, jolla on kaava (V),

$$-Q_1-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R^8 \qquad (V)$$

jossa Q_1 on

1) $-(CH_2)_m-$, jossa m on 0, 1, 2, 3 tai 4, tai

2) -CH=CH- ja

R^8 on

1) vetyatomi,

2) C_{1-4}-alkyyli,

3) OH,

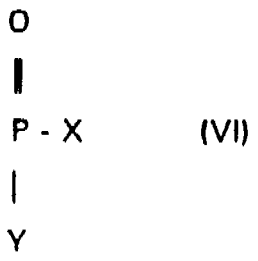
4) $-O-C_{1-4}$-alkyyli,

5) NH_2,

6) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino tai

7) N-(3,5-dimetyyli-4-hydroksibentsyyli)amino; ja

f) ryhmä, jolla on kaava (VI),



(VI)

jossa Q_2 on

1) $-(CH_2)_m-$, jossa m on 0, 1, 2, 3 tai 4, tai

2) -CH=CH- ja

X ja Y ovat kumpikin itsenäisesti

1) C_{1-4}-alkyyli,

2) $-O-C_{1-4}$-alkyyli tai

3) OH;

...A... on mahdollinen kaksoissidos sillä rajoituksella, että kaksoissidos ja ryhmä R^4 eivät voi olla läsnä samanaikaisesti;

R^4 on

1) vetyatomi tai

2) C_{1-6}-alkyyli tai

R^2 ja R^4 muodostavat yhdessä sen hiiliatomin kanssa, johon ne ovat sitoutuneet, alifaattisen renkaan, joka koostuu 3, 4 tai 5 hiiliatomista; ja

R^3 on

1) vetyatomi,

2) C_{1-4}-alkyyli tai

3) hydroksi-C_{1-4}-alkyyli.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, jolla on kaava (I), jossa toisella ryhmistä R^1 ja R^2 on kaavan (II) mukainen merkitys ja toisella jokin seuraavista merkityksistä:

a) 2-pyridyyli,

b) 4-pyridyyli,

c) tiofen-3-yyli,

d) 2-tiatsolyyli

e) ryhmä, jolla on kaava (III), jossa

n on luku 0, 1, 2, 3 tai 4,

m on luku 0 tai 1 ja

Z on

1) -O- tai

2) -NH-,

R^5 ja R^6 ovat kumpikin itsenäisesti

1) vetyatomi,

2) C_{1-2}-alkyyli,

3) fenyyli tai

4) OH tai

R^6 ja R^7 ovat sitoutuneet toisiinsa ja muodostavat yhdessä metyleeniryhmän tai

R^7 on

1) vetyatomi,

2) trifluorimetyylisulfonyyli,

3) jokin aminohapporyhmistä Gly, Phe, Ala, Lys, Tyr ja Ser tai

4) ryhmä, jolla on kaava (IV), jossa

o on 0 tai 1,

ryhmillä R^9 ja R^{10} on toisistaan riippumattomasti merkitys

1) vetyatomi tai

2) metyyli,

R^{11} on

1) OH,

2) -O-C_{1-4}-alkyyli,

3) C_{1-18}-alkyyli,

4) C_{1-6}-alkyyli, joka sisältää yhden tai useamman substituentin, joka/joista kukin itsenäisesti voi olla

4.1. -COOH,

4.2. -OH tai

4.3. -O-asetyyli,

5) -COOH,

6) -C(=O)-O-C_{1-4}-alkyyli,

7) N-glysyyli,

8) N-glysyyli-C_{1-4}-alkyyliesteri,

9) N-metyylihydroksyyliamino,

10) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino,

11) 5-metyyli-isoksatsol-4-yyli,

12) 1-syaani-2-hydroksi-1-propenyyli tai

13) fenyyli, joka on substituoitu

13.1. 4-(4-morfolinyyli)metyyliryhmällä;

f) ryhmä, jolla on kaava (V), jossa

Q_1 on

1) -$(CH_2)_m$-, jossa m on 0, 1 tai 2, tai

2) -CH=CH- ja

R^8 on

1) vetyatomi,

2) metyyli,

3) OH,

4) -O-C_{1-2}-alkyyli,

5) amino,

6) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino tai

7) N-(3,5-dimetyyli-4-hydroksibentsyyli)amino; ja

g) ryhmä, jolla on kaava (VI), jossa

Q_2 on

1) -$(CH_2)_m$-, jossa m on 0, 1 tai 2, tai

2) -CH=CH- ja

X ja Y ovat kumpikin itsenäisesti

1) metyyli,

2) -O-C_{1-2}-alkyyli tai

3) OH;

...A... on mahdollinen kaksoissidos sillä rajoituksella, että kaksoissidos ja ryhmä R^4 eivät voi olla läsnä samanaikaisesti;

R^4 on

1) vetyatomi tai

2) C_{1-2}-alkyyli tai

R^2 ja R^4 muodostavat yhdessä sen hiiliatomin kanssa, johon ne ovat sitoutuneet, alifaattisen renkaan, joka koostuu 3, 4 tai 5 hiiliatomista; ja

R^3 on

1) vetyatomi,

2) metyyli tai

3) hydroksimetyyli.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen yhdiste, jolla on kaava (I), jossa toisella ryhmistä R^1 ja R^2 on kaavan (II) mukainen merkitys ja toisella jokin seuraavista merkityksistä:

a) 2-pyridyyli,

b) 4-pyridyyli,

c) tiofen-3-yyli,

d) 2-tiatsolyyli

e) ryhmä, jolla on kaava (III), jossa

n on luku 0, 1, 2, 3 tai 4,

m on luku 0 tai 1 ja

Z on

1) -O- tai

2) -NH-,

R^5 ja R^6 ovat kumpikin itsenäisesti

1) vetyatomi,

2) C_{1-2}-alkyyli tai

3) fenyyli tai

R^6 ja R^7 ovat sitoutuneet toisiinsa ja muodostavat yhdessä metyleeniryhmän tai

R^7 on

1) vetyatomi,

2) trifluorimetyylisulfonyyli,

3) jokin aminohapporyhmistä Gly, Lys ja Phe tai

4) ryhmä, jolla on kaava (IV), jossa

o on 0 tai 1,

ryhmillä R^9 ja R^{10} on toisistaan riippumattomasti merkitys

1) vetyatomi tai

2) metyyli,

R^{11} on

1) OH,

2) -O-metyyli tai -O-etyyli,

3) C_{1-18}-alkyyli,

4) C_{1-6}-alkyyli, joka sisältää yhden tai useamman substituentin, joka/joista kukin itsenäisesti voi olla

4.1. -COOH,

4.2. -OH tai

4.3. -O-asetyyli,

5) -COOH,

6) $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-C_{1-2}$-alkyyli,

7) N-glysyyli,

8) N-glysyyli-C_{1-2}-alkyyliesteri,

9) N-metyylihydroksyyliamino,

10) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino,

11) 5-metyyli-isoksatsol-4-yyli tai

12) 1-syaani-2-hydroksi-1-propenyyli;

f) ryhmä, jolla on kaava (V), jossa

Q_1 on

1) $-(CH_2)_m-$, jossa m on 0, 1 tai 2, tai

2) -CH=CH- ja

R^8 on

1) vetyatomi,
2) metyyli,
3) OH,
4) -O-metyyli,
5) amino,
6) N-(1H-tetratsol-5-yyli)amino tai
7) N-(3,5-dimetyyli-4-hydroksibentsyyli)amino; ja

g) ryhmä, jolla on kaava (VI), jossa

Q_2 on

1) $-(CH_2)_m-$, jossa m on 0 tai 2, tai
2) -CH=CH- ja

X ja Y ovat kumpikin itsenäisesti

1) metyyli,
2) $-O-C_{1-2}$-alkyyli tai
3) OH;

...A... on mahdollinen kaksoissidos sillä rajoituksella, että kaksoissidos ja ryhmä R^4 eivät voi olla läsnä samanaikaisesti;

R^4 on

1) vetyatomi tai
2) metyyli tai

R^2 ja R^4 muodostavat yhdessä sen hiiliatomin kanssa, johon ne ovat sitoutuneet, alifaattisen renkaan, joka koostuu 3, 4 tai 5 hiiliatomista; ja

R^3 on

1) vetyatomi tai
2) hydroksimetyyli.

4. Menetelmä 2-isoksatsoliinin tai isoksatsolin, jolla on kaava (I), ja/tai kaavan (I) mukaisen yhdisteen stereoisomeerisen muodon ja/tai kaavan (I) mukaisen yhdisteen fysiologisesti siedettävissä olevan suolan valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) primaarinen nitroyhdiste muunnetaan isosyanaatin ja katalyyttisen trietyyliamiinimäärän avulla tai hydrok-

saamihappokloridi, joka on saatu aikaan klooraamalla vastaava aldoksiimi, muunnetaan orgaanisella tai epäorgaanisella emäksellä vastaavaksi nitriilioksidiksi ja tämän välituotteena saatavan nitriilioksidin annetaan puhdistamatta reagoida sopivalla tavalla substituoidun olefiinin tai alkyynin kanssa (1,3-dipolaarinen sykloadditioreaktio), jolloin saadaan 2-isoksatsoliini tai isoksatsoli, jolla on kaava (I), ja muodostunut tuote mahdollisesti puhdistetaan kiteyttämällä tai kromatografisesti; tai

b) menetelmällä (a) tai (o) valmistettu karboksyylihappoesteri, jolla on kaava (I), tai menetelmällä (h) tai (k) molekyyliin lisäksi muodostettu esteriryhmä saippuoidaan karboksyylihapoksi; tai

c) menetelmällä (a) tai (o) valmistettu karboksyylihapon alkyyliesteri, jolla on kaava (I), muunnetaan sopivalla tavalla substituoidulla, primaarisella tai sekundaarisella amiinilla vastaavaksi amidiksi; tai

d) menetelmällä (a) tai (o) valmistettu fosfiinihapon monoalkyyli- tai fosfonihapon dialkyyliesteri, jolla on kaava (I), saippuoidaan fosfonihappopuoliesteriksi, fosfonihapoksi tai fosfiinihapoksi; tai

e) menetelmällä (b) aikaansaatu karboksyylihappo muunnetaan ensin aktivoiduksi happojohdokseksi, joka sen jälkeen esteröidään alkoholilla tai muunnetaan primaarisella tai sekundaarisella amiinilla vastaavaksi amidiksi tai N-alkyloidulla hydroksyyliamiinilla vastaavaksi hydroksyyliamidiksi;

f) menetelmässä (a), (b), (h), (e), (o) tai (g) välivaiheena muodostettu tai mukana kuljetettu N- tai O-atomia suojaava ryhmä poistetaan tai muodostettu tai mukana kuljetettu karboksyyli-, fosfiini-, fosfoni- tai fosforihappoesteri saippuoidaan sopivalla tavalla ja saadaan aikaan yhdiste, jolla on kaava (I); tai

g) menetelmällä (f) tai (o) aikaansaatu yhdiste, joka sisältää vapaan aminoryhmän, muunnetaan reaktiolla

isosyanaatin kanssa vastaavaksi ureajohdokseksi tai reaktiolla aktivoidun karboksyylihappojohdoksen tai N-suojatun aminohapon kanssa vastaavaksi amidiksi tai reaktiolla sulfonihappokloridin kanssa vastaavaksi sulfonamidiksi; tai

h) menetelmällä (a), (o) tai (f) aikaansaatu yhdiste, joka sisältää vapaan alkoholiryhmän, muunnetaan reaktiolla isosyanaatin kanssa vastaavaksi uretaaniksi tai reaktiolla sellaisen karboksyylihappojohdoksen, joka sisältää aktivoidun karboksyylihapon ja mahdollisesti muita funktionaalisia ryhmiä, tai vastaavan N-suojatun aminohappojohdoksen kanssa vastaavaksi esteriksi tai reaktiolla diketeenin kanssa vastaavaksi 3-oksobutyraatiksi tai reaktiolla halogeeniyhdisteen kanssa, kuten α-halogeenikarboksyylihapon kanssa, vastaavaksi eetteriksi; tai

i) menetelmällä (a), (o) tai (f) aikaansaatu yhdiste, joka sisältää primaarisen tai sekundaarisen alkoholiryhmän, hapetetaan aldehydiksi tai ketoniksi; tai

k) menetelmällä (i) valmistettu karbonyyliyhdiste muunnetaan reaktiolla emäksen ja dialkyylifosfonoetikkahappoesterin kanssa vastaavaksi krotonihappojohdokseksi tai reaktiolla tetra-alkyylimetyleenidifosfonaatin kanssa vastaavaksi trans(2-dialkoksifosfono)vinyylijohdokseksi; tai

l) sykloadditiossa muodostunut epoksidiryhmä muunnetaan vastaavaksi 1,2-dioliksi; tai

m) menetelmällä (g) valmistettu amidi, joka sisältää 3H-isoksatsolirenkaan, muunnetaan vastaavaksi substituoiduksi 2-syaani-3-hydroksikrotonihappoamidiksi käsittelemällä se emäksellä renkaan avaamiseksi; tai

n) jollakin menetelmistä (a) - (m) valmistettu yhdiste, jolla on kaava (I) ja joka kemiallisen rakenteensa johdosta esiintyy enantiomeerisessa muodossa, erotetaan puhtaiksi enantiomeereiksi muodostamalla suoloja enantiomeerisesti puhtaiden happojen tai emästen kanssa, kromatografisesti käyttämällä kiraalisia stationaarifaaseja tai

muodostamalla johdoksia kiraalisten, enantiomeerisesti puhtaiden yhdisteiden avulla, kuten aminohappojen avulla, erottamalla siten aikaansaadut diastereomeerit ja poistamalla kiraalinen apuryhmä; tai

o) sykloadditiolla kiraaliseen tai raseemiseen olefiiniin aikaansaatu kaavan (I) mukaisten 2-isoksatsoliinidiastereomeerien seos erotetaan kromatografisesti silikageelipylväässä puhtaiksi diastereomeereiksi; tai

p) jollakin menetelmistä (a) - (o) valmistettu yhdiste, jolla on kaava (I), joko eristetään vapaassa muodossa tai, jos siinä esiintyy happamia tai emäksisiä ryhmiä, mahdollisesti muunnetaan fysiologisesti hyväksyttäväksi suolakseen: tai

q) menetelmällä (h) valmistettu yhdiste, joka sisältää toisenkin funktionaalisen ryhmän, kuten halogeenimetyyliryhmän, alkyloidaan primaarisella tai sekundaarisella aminoryhmällä tai eetteröidään alkoholilla.

5. Lääke, joka sisältää vaikuttavan määrän ainakin yhtä patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaista tai patenttivaatimuksen 4 mukaisesti aikaansaatua yhdistettä, jolla on kaava (I), ja/tai kaavan (I) mukaisen yhdisteen fysiologisesti siedettävissä olevaa suolaa ja/tai kaavan (I) mukaisen yhdisteen stereoisomeerista muotoa fysiologisesti hyväksyttävien apu- ja kantaja-aineiden, mahdollisesti muiden lisäaineiden ja/tai muiden vaikuttavien aineiden ohella.

6. Ainakin yhden patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaisen yhdisteen, jolla on kaava (I), käyttö astmasairauksien, tulehdusten ja/tai autoimmuunisairauksien ennaltaehkäisyyn ja hoitoon soveltuvien lääkkeiden valmistamiseen.

7. Menetelmä patenttivaatimuksen 5 mukaisen lääkkeen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että ainakin yksi patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen yhdiste, jolla on kaava (I), ja/tai kaavan (I) mukaisen yhdisteen

fysiologisesti siedettävissä oleva suola ja/tai kaavan (I) mukaisen yhdisteen stereoisomeerinen muoto ja/tai patenttivaatimuksen 4 mukaisella menetelmällä aikaansaatu yhdiste, jolla on kaava (I), yhdistetään fysiologisesti hyväksyttävien apu- ja kantaja-aineiden ja mahdollisesti muiden lisäaineiden ja/tai muiden vaikuttavien aineiden kanssa sopivaksi antomuodoksi.