

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 981956 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **981956**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C07D401/06
A61K 31/445**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.06.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.09.1998**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **11.09.1998**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **19.06.1992 PCT/US1992/004973**
Internationell ansökan - International
application

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

17.07.1991 US 731577

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, NY 10017, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Welch, Jr., Willard McKowan, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

2-(4-hydroksipiperidino)-1-alkanolijohdannaisia verettömyyden vastaisi a aineina

2-(4-hydroxipiperidino)-1-alkanolderivat som antiiskemiska medel

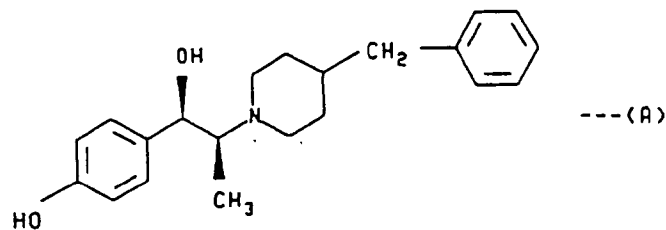
(62) Jakamalla erotettu hakemuksesta - Avdelad från ansökan - Divided from application: **940192**

2-(4-hydroksipiperidino)-1-alkanolijohdannaisia verettömyyden vastaisina aineina

Keksinnön tausta

5 Esillä oleva keksintö koskee hermosolua suojaavia (verettömyyttä estäviä, eksitatorisen aminohapon reseptoria salpaavia) 2-(4-hydroksipiperidino)-1-alkanolijohdannaisia, jotka määritellään edempänä olevalla kaavalla (I); niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja; menetelmää
10 näiden yhdisteiden käyttämiseksi hoidettaessa halvausta, aivoihin ja selkäyttimeen kohdistuvaa traumaattista vauriota sekä hermojen rappeumasairauksia, kuten (ei kuitenkaan näihin rajoittuen) vanhuuden tylsistymisiä, kuten Alzheimerin tautia, Huntingtonin tautia ja Parkinsonin tautia
15 nisäkkäissä, erityisesti ihmisissä; sekä tiettyjä niiden välituotteita.

Ifenprodiili (A) on raseeminen, niin sanottu dl-erythro-yhdiste, jonka suhteellinen stereokemiallinen kaava on



25 jota markkinoidaan verenpainetta alentavana aineena, joka käyttökelpoisuus on joillakin läheisillä analogeilla. Carron et al., US-patentti 3 509 164; Carron et al., Drug Res., v. 21, s. 1992 - 1999 (1971). Myöhemmin ifenprodiililla on osoitettu olevan verettömyyden vastaista ja eksitatorisen aminohapon reseptoria salpaavaa vaikutusta. Gotti et al., J. Pharm. Exp. Therap., v. 247, s. 1211 - 21
30 (1988); Carter et al., loc. cit., s. 1222 - 32 (1988).

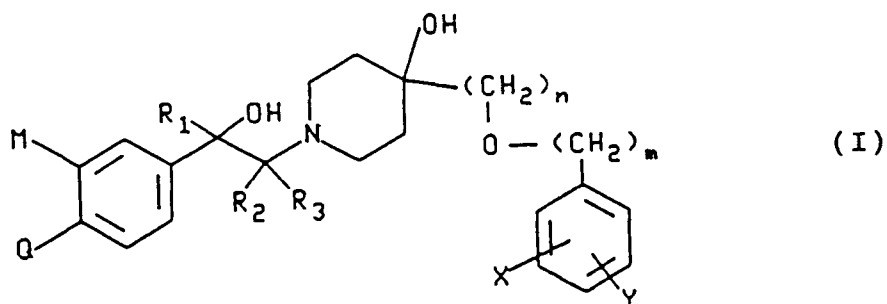
Katso myös FR-patentti 2 546 166 ja EPO-julkaisu
35 EP-A1-351 282, joka on julkaistu 17. tammikuuta 1990. Pää-

määränä, johon esillä olevassa keksinnössä oleellisilta osin päästiin, on ollut löytää yhdisteitä, joilla on hermosoluja suojaavaa vaikutusta suuressa määrin ja samanaikaisesti vähentynyt tai ei merkittävää verenpainetta alentavaa vaikutusta.

Joidenkin 1-fenyyli-3-(4-aryyli-4-asyylioksi-piperidino)-1-propanolien on myös raportoitu olevan käyttökelpoisia kipulääkkeinä, US-patentti 3 294 804; 1-[4-(amino- ja -hydroksialkyyli)fenyyli]-2-(4-tolyyli-piperatsino)-1-alkanolien ja -alkanonien on raportoitu omaavan kipulääke-, verenpainetta alentavaa, psykotrooppista tai tulehdusvastaisista vaikutusta, japanilainen Kokai 53-02 474 (CA 89:43498y; Derwent Abs. 14858A) ja 53-59 675 (CA 89:146938w; Derwent Abs. 48671A); ja 2-piperidino-1-alkanoli johdannaisien on raportoitu vaikuttavan verettömyyden vastaisina aineina, EP 398 578-A ja Der 90-350 327/47.

Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö koskee yhdisteitä, joiden kaava on



jossa R_1 , R_2 ja R_3 valitaan kukin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyyli ja substituoitu fenyyli, jossa substituentit mainitussa substituoitussa fenyyliä valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: hydroksi, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino, nitro ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

tai R_1 ja R_2 muodostavat yhdessä metyleeni-, etyleeni-, propyleeni- tai butyleeniryhmän;

m on 0 - 2;

n on 1 tai 2;

- 5 X ja Y valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä, alkyili, jossa on 1 - 4 hiiltä, hydroksi, amino, nitro ja substituoitu fenoksi, jossa mainitussa fenoksissa oleva substituentti valitaan ryhmästä,
- 10 joka koostuu seuraavista: vety, hydroksi, alkyili, jossa on 1 - 4 hiiltä, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, nitro, amino ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

- M ja Q valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, hydroksi, amino, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, nitro, alkyili, jossa on 1 - 4 hiiltä, alkoksi,
- 15 jossa on 1 - 4 hiiltä, N,N-dialkyili-amino, jossa on neljä hiiltä kummassakin mainitussa alkyilissä, N-alkyli-amino, jossa on 1 - 4 hiiltä, $NHCOR_4$, $NHCOOR_5$ ja $NHSO_2R_6$;

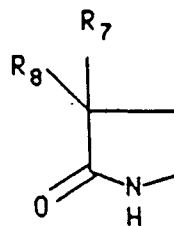
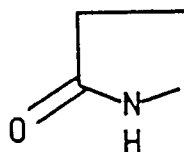
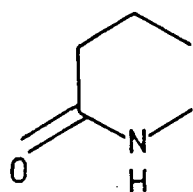
- jossa R_4 valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety,
- 20 alkyili, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyyli ja substituoitu fenyyli, jossa mainitussa fenyyliissä oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: hydroksi, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino, nitro, alkyili, jossa on 1 - 4 hiiltä, ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;
- 25

ja jossa R_5 ja R_6 valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: alkyili, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyyli ja substituoitu fenyyli, jossa substituoitussa fenyyliissä oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: hydroksi, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino, nitro, alkyili, jossa on 1 - 4 hiiltä, ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

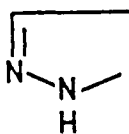
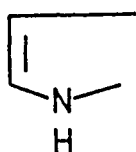
30

tai M ja Q muodostavat yhdessä kahdenarvoisen radikaalin Z, jossa Z valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista:

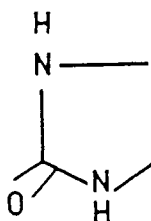
5



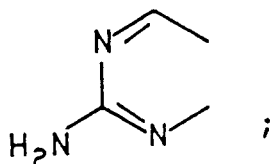
10



15



ja



20

jossa R_7 ja R_8 valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu vedystä ja metyylistä;

sekä näiden yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä happoadditiosuoloja.

25

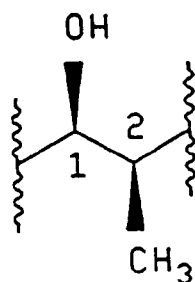
Ilmaisun "farmaseuttisesti hyväksyttävät happoadditiosuolat" on tarkoitus käsittää, mutta ei rajoittua näihin, suoloja, kuten hydrokloridi, hydrobromidi, hydrojodidi, nitraatti, vetysulfaatti, divetyfosfaatti, mesylaatti, maleaatti ja sukkinaatti. Tällaiset suolat valmistetaan tunnetulla tavalla siten, että yhdisteen (I) vapaa emäsmuoto saatetaan reagoimaan sopivan hapon, tavallisesti yhden mooliekvivalentin kanssa, ja liuottimessa. Suolat, jotka eivät saostu suoraan, eristetään tavallisesti haihuttamalla liuotin ja/tai lisäämällä ei-liuotinta suodattamisen jälkeen.

30

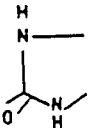
Edullinen esillä olevan keksinnön mukaisten yhdisteiden ryhmä käsittää yhdisteitä, joissa M ja Q muodosta-

vat radikaalin Z, jossa Z on , R_1 ja R_2 ovat vetyjä

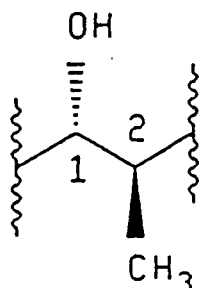
ja R_3 on metyyli, ja yhdisteillä on $1r^*$ -, $2s^*$ - tai erytro-stereokemia propanoliketjun 1- ja 2-asemissa, se on



Toinen edullinen keksinnön mukaisten yhdisteiden ryhmä käsittää yhdisteitä, joissa M ja Q muodostavat radi-

kaalin Z, jossa Z on , R_1 ja R_2 ovat vetyjä ja R_3

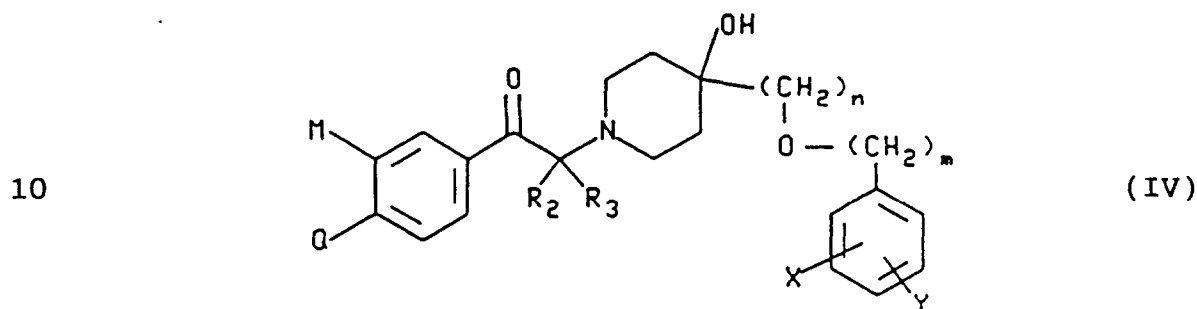
on metyyli, ja yhdisteillä on $1s^*$ -, $2s^*$ - tai treo-stereokemia propanoliketjun 1- ja 2-asemissa, se on



Esillä oleva keksintö koskee myös farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät kaavan I mukaista keksinnön yhdistettä, sekä menetelmiä, joilla hoidetaan nisäkästä, erityisesti ihmistä, joka kärsii keskushermostollisesta häiriöstä, ja menetelmässä mainitulle nisäkkäälle annetaan hermosolua suojaava tehokas määrä kaavan (I) mukaista yhdistettä. Mainitut koostumukset ja menetelmät ovat erityisesti arvokkaita hoidettaessa aivoihin ja selkäyttimeen

kohdistuvaa traumaattista vauriota, halvausta, Alzheimerin tautia, Parkinsonin tautia, Huntingtonin tautia ja vastavia keskushermostollisia häiriöitä.

5 Esillä oleva keksintö koskee edelleen välituoteyhdisteitä, joiden kaava on



15 jossa R_2 ja R_3 valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyylili ja substituoitu fenyylili, jossa mainitussa substituoitussa fenyylissä oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: hydroksi, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino, 20 nitro ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

m on 0 - 2;

n on 1 tai 2;

25 X ja Y valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, hydroksi, amino, nitro ja substituoitu fenoksi, jossa mainitussa substituoitussa fenoksissa oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, hydroksi, 30 alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, nitro, amino ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

35 M ja Q valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, hydroksi, amino, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, nitro, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä, N,N-dialkyyliamino, jossa on 1 - 4

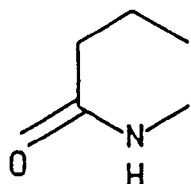
hiiltä kummassakin mainitussa alkyyliissä, N-alkyyliamino, jossa on 1 - 4 hiiltä, NHCOR_4 , NHCOOR_5 ja NHSO_2R_6 ;

jossa R_4 valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyyli ja substituoitu fenyyli, jossa mainitussa substituoitussa fenyyliissä oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: hydroksi, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino, nitro, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

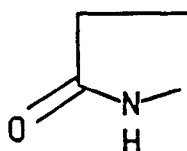
ja jossa R_5 ja R_6 valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyyli ja substituoitu fenyyli, jossa mainitussa substituoitussa fenyyliissä oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: hydroksi, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino, nitro, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

tai M ja Q muodostavat yhdessä valittuina kahdenarvoisen radikaalin Z, jossa Z valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista:

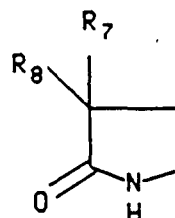
20



,

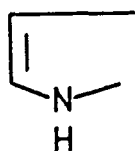


,

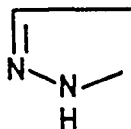


,

25

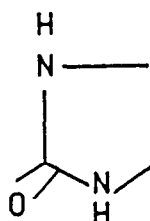


,

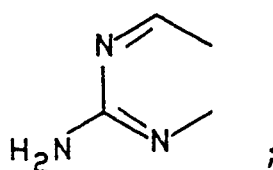


,

30



ja



;

35

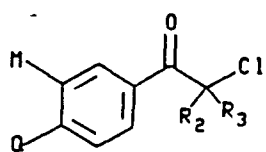
ja jossa R_7 ja R_8 valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu vedystä ja metyylistä.

5 Riippuen $R_1:n$, $R_2:n$ ja $R_3:n$ tarkoista arvoista, kaavan (I) mukaisilla yhdisteillä voi olla yksi tai kaksi asymmetristä keskusta ja siten ne voivat esiintyä erilaisissa isomeerimuodoissa. Kaikki tällaiset isomeerit kuuluvat tämän keksinnön suojapiiriin. Yksittäiset isomeerit voidaan erottaa klassisilla menetelmillä, jotka alan asiantuntijat tietävät.

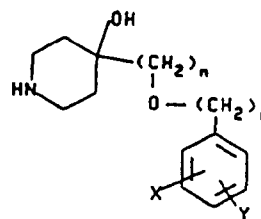
10 **Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus**

Esillä olevan keksinnön yhdisteet, joilla on edellä määriteltä kaava (I), valmistetaan helposti ja yleisesti reaktiolla, jossa klooriyhdiste (II) saatetaan reagoimaan piperidiinin (III) kanssa, sen jälkeen pelkistetään synty-
15 nyt ketoni (IV) alkoholiksi edempänä yksityiskohtaisesti esitetyllä tavalla.

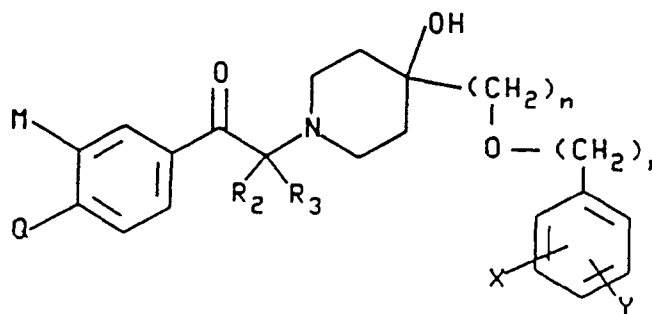
Prekursori-ketonit valmistetaan aluksi tavallisesti siten, että niiden $-OH-$ ja $-NH_2-$ substituenttiryhmät ovat suojatussa muodossa, eli $-OA_1-$ tai $-NHA_2-$ ryhminä kaavan
20 (IV) mukaisissa yhdisteissä. A_1 ja A_2 määritetään edempänä. Tällaisia suojattuja ketoneja muodostetaan tavallisesti siten, että saatetaan sopivasti substituoitu 2-halogeeni-1-alkanoni (II) reagoimaan sopivasti substituoidun piperidinojohdannaisen (III) kanssa, esim.



(II)



(III)



(IV)

Yhdisteen (II) reaktio yhdisteen (III) kanssa suoritetaan olosuhteissa, jotka ovat yleisesti tyypillisiä nukleofiillisille korvausreaktioille. Kun näitä kahta reagoivaa ainetta on saatavilla noin ekvivalentit määrät, voidaan käyttää lähes tai suurin piirtein mooliekvivalentteja; joskin, kun toista on helpommin saatavilla, yleensä on edullista käyttää tätä ylimäärin, jotta tämä kaksimolekyylinen reaktio saataisiin kulkemaan loppuun lyhyemmässä ajassa. Reaktio suoritetaan tavallisesti siten, että mukana on vähintään yksi mooliekvivalentti emästä, itse piperidiinijohdannaista, jos sitä on helposti saatavissa, mutta useammin tertiaarista amiinia, jonka emäsvahvuus on vähintään verrattavissa nukleofiilliseen piperidiiniin; sekä inertissä liuottimessa, kuten etanolissa. Haluttaessa reaktiota katalysoidaan lisäämällä korkeintaan yksi mooliekvivalentti tai enemmän jodidisuolaa (esim. NaI, KI).

Lämpötila ei ole kriittisen tarkka, mutta tavallisesti se on jonkin verran kohotettu, jotta reaktio saadaan kulke-
maan loppuun lyhyemmässä ajassa, mutta se ei ole niin kor-
kea, että se johtaa kohtuuttomaan hajoamiseen. Lämpötila,
5 joka on 50 - 120 °C, on tavallisesti tyydyttävä. Tarkoi-
tuksenmukaisesti lämpötila on reaktioseoksen palautusjääh-
dytyslämpötila.

Kuten edellä olevassa kappaleessa ja muualla tässä
hakemuksessa on käytetty, ilmaisulla "reaktioonertti liuo-
10 tin" tarkoitetaan liuotinta, joka ei reagoi lähtöaineiden,
reagenssien, välituotteiden tai tuotteiden kanssa tavalla,
joka vaikuttaa heikentävästi halutun tuotteen saantoon.

Haluttaessa ketonivälituotteista (IV), joissa OH-
ja NH₂-ryhmät ovat suojatussa muodossa (OA₁ tai NHA₂), voi-
15 daan poistaa suojaus tässä vaiheessa tunnetuilla menetel-
millä.

Esimerkiksi, kun A₁ on tri-isopropyyylisilyyli tai
tert-butyylidimetyylisilyyli, suojaryhmä poistetaan tar-
koituksenmukaisesti reaktiolla tetrabutyyliammoniumfluori-
20 din kanssa (tavallisesti suurin piirtein 2 mooliekviva-
lenttia) reaktioonertissä liuottimessa, kuten tetrahydro-
furaanissa. Kun A₁ on bentsyyli tai A₂ on bentsyylioksikar-
bonyyli, suojaryhmä poistetaan tavallisesti tunnetulla
hydrauksella jalometallikatalyytin kanssa reaktioonertissä
25 liuottimessa, esim. käyttäen 10 % Pd/C:tä katalyyttinä,
edullisesti alhaisissa paineissa (esim. 1 - 10 atmosfää-
riä) ja lämpötiloissa (esim. 20 - 75 °C) ja tavallisesti
reaktioonertissä liuottimessa, kuten metanolissa.

Tavallisesti ketonivälituotteet (IV) muutetaan tar-
koituksenmukaisesti vastaaviksi alkoholeiksi toisella kah-
30 desta tunnetusta pelkistysmenetelmästä, jolloin selektiiv-
isesti saadaan joko treo-yhdisteitä tai erytro-yhdistei-
tä, joiden kaava on (I).

Kuten edellä olevassa kappaleessa ja muualla tässä
35 hakemuksessa on käytetty, termillä "treo" tai 1r*, 2s*

viitataan suhteelliseen stereokemiaan propanoliketjun 1- ja 2-asemissa, se on



10 ja termillä "erythro" tai $1r^*$, $2s^*$ viitataan suhteelliseen stereokemiaan propanoliketjun 1- ja 2-asemissa, se on



20 Haluttujen kaavan (I) mukaisten erythro-yhdisteiden saamiseksi vastaavat ketonivälituotteet (IV) pelkistetään tarkoituksenmukaisesti kaliumboorihydridillä, jota tavallisesti on ylimäärin (esim. enemmän kuin 5 mooliekvivalenttia) jääetikkaetikkahapon läsnä ollessa, proottisessa liuottimessa, kuten etanolissa, tavallisesti lämpötilassa, joka on 15 - 25 °C.

25 Haluttujen kaavan (I) mukaisten treo-yhdisteiden saamiseksi vastaavat ketonivälituotteet (IV) pelkistetään tarkoituksenmukaisesti natriumboorihydridillä, jota tavallisesti on ylimäärin (esim. enemmän kuin 5 mooliekvivalenttia) proottisessa liuottimessa, kuten etanolissa, tavallisesti lämpötilassa, joka on 15 - 25 °C. Syntynyt reaktioseos kromatografoidaan silikageelipylväässä, jolloin saadaan mainitut kaavan (I) mukaiset treo-yhdisteet.

30 Kaikki suojaryhmät, jotka ovat edelleen paikoillaan ketonipelkistyksen jälkeen, poistetaan sitten edellä kuvattujen perusmenetelmien mukaisesti.

Lähtöaineet ja esillä olevan keksinnön yhdisteiden synteesiin tarvittavat reagenssit ovat helposti saatavia joko kaupallisesti, kirjallisuuden menetelmien mukaisesti tai menetelmillä, joista on annettu esimerkkejä edempänä olevissa valmistuksissa.

Esillä olevilla kaavan (I) mukaisilla yhdisteillä on selektiivistä hermosoluja suojaavaa vaikutusta, joka perustuu niiden verettömyyden vastaiseen vaikutukseen ja niiden kykyyn salvata eksitatoristen aminohappojen reseptoreja, ja samaan aikaan niillä on vähentynyt tai ei merkittävä verenpainetta alentava vaikutus. Esillä olevien yhdisteiden verettömyyden vastainen vaikutus määritetään yhdellä tai useammalla menetelmällä, jotka ovat kuvanneet yksityiskohtaisesti aikaisemmin Gotti et al. ja Carter et al., joihin viitattiin edellä, tai vastaavilla menetelmillä.

Esillä olevan keksinnön yhdisteiden kyky salvata eksitatoristen aminohappojen reseptoreita osoitetaan lääkeaineiden kykynä pelastaa rottasikiön hermosoluja viljelmässä, joka on altistettu eksitotoksiselle aminohappoglutamataatille. Seuraavana tyypillinen menetelmä.

Osa I: Solujen eristäminen:

Rotista, joiden raskaus on kestänyt 17 päivää, poistetaan alkiot ja ne laitetaan Tyroden liuokseen. Aivot poistetaan sitten ja laitetaan tuoreeseen Tyroden liuokseen. Käyttäen hienoja iirisveitsiä taka-aivot ja talamus poistetaan. Etuaivot erotetaan sitten kahdeksi aivopuoliskoksi. Seuraavaksi aivokalvot poistetaan varovasti. Aivoturso näkyy tummentuneena poimuttuneena alueena aivokuoren reunan sisäpuolella. Aivoturso leikataan varovasti pois lopusta kudoksesta ja laitetaan maljalla erilliseen paikkaan. Kun kaikki leikkely on suoritettu, erillään oleva aivotursokudos jauhetaan 1 mm:n kappaleiksi. Nämä kappaleet poistetaan Pasteur-pipettiä käyttäen ja laitetaan steriiliin putkeen. Tyroden liuos imetään va-

rovasti pois ja lisätään Tyroden liuosta, jossa ei ole kalsiumia eikä magnesiumia. Kudos pestään kolme kertaa Tyroden liuoksella, jossa ei ole kalsiumia eikä magnesiumia. Tätä viimeistä pesuliuosta inkuboidaan 15 minuuttia 37 °C:ssa. Puskuri poistetaan jälleen ja sen tilalle laitetaan 1 ml tuoretta Tyroden liuosta, jossa ei ole kalsiumia eikä magnesiumia. Tässä vaiheessa lisätään trypsiiniä 0,1 % (100 µl 10 mg/ml steriiliä kantaliuosta). Putkea inkuboidaan yksi tunti 37 °C:ssa. Trypsiini-inkuboinnin jälkeen kudos pestään seerumilla, jossa on ravintoliuosta, trypsiinin vaikutuksen lopettamiseksi. Kudos suspendoidaan uudelleen 1 ml:aan tuoretta kasvatusliuosta ja jauhetaan kuivaksi hienohuokoisella Pasteur-pipetillä.

Solut lasketaan sitten hemosytometriä käyttäen. Sitten solut istutetaan 96-koloisille Falcon Primeria -kudosviljelmälevyille 75 000 solua koloa kohden täydellisessä ravintoliuoksessa. Täydellinen ravintoliuos koostuu minimaalisesta välttämättömästä ravintoliuoksesta (MEM), jossa on Earlen suoloja, 10 % vasikkasikiön seerumia (Hyclone), 10 % hevosen seerumia, L-glutamiinia (2 mM), penisilliini-streptomysiiniä (100 U per ml) ja glukosia (jotta lopulliseksi konsentraatioksi saadaan 21 mM, valmistetaan 100x kantaliuos, joka sisältää 27,8 g per 100 ml). Levyille laitetaan 3. päivänä tuoretta ravintoliuosta. Sitten 6. päivänä viljelmiin lisätään sytosiiniarabinosidia 10 µm tuoreen ravintoliuoksen kanssa. Sitten kaksi päivää myöhemmin sytosiiniarabinosidi poistetaan ja sen tilalle laitetaan ylläpitoravintoliuosta, joka on täydellistä ravintoliuosta, josta puuttuu vasikkasikiön seerumi. Levyjä ravitaan sitten kaksi kertaa viikossa. Kun on kulu-
nut kolme viikkoa leikkelystä, levyjä käytetään glutamaattitoksisuustutkimuksissa, jotta voidaan varmistua siitä, että hermosolut ovat kehittyneet kunnolla viljelmässä.

Osa 2: Glutamaattikäsittely ja glutamaatin jälkeisen lääkeaineen lisäys:

Kun ravintoliuos on ollut kolme viikkoa viljelmässä, se poistetaan soluista ja solut pestään kolme kertaa kloridittomassa kontrolloidussa suolaliuoksessa (CSS-C1). CSS-C1 sisältää 69 mM Na₂SO₄:a, 2,67 mM K₂SO₄:a, 0,33 mM NaPHO₄:a, 0,44 mM KH₂PO₄, 1 mM NaHCO₃:a, 1 mM MgSO₄, 10 mM HEPES:a (N-2-hydroksietyyli-piperatsiini-N¹-2-etaanisulfonihappoa), 2,22 mM glukoosia ja 71 mM sakkaroosia pH:ssa 7,4. Pesun jälkeen glutamaattia lisätään 1 - 3 mM:na CSS-C1-puskurissa, ja sopivissa kontrollikoloissa on glutamaattitonta puskuria. Levyjä inkuboidaan 37 °C:ssa 15 - 20 minuuttia. Glutamaatti-inkuboinnin jälkeen levyt pestään seerumittomalla ravintoliuoksella kahdesti. Koelääkeaineet valmistetaan sopivina konsentraatioina seerumittomaan ravintoliuokseen ja lisätään vastaaviin mikrotiitterilevyn koloihin (100 µl per kolo). Negatiivisiin kontrollikoloihin laitetaan seerumitonta ravintoliuosta, jossa ei ole lääkeainetta. Useisiin glutamaatilla käsiteltyihin koloihin laitetaan myös seerumitonta ravintoliuosta, jossa ei ole lääkeainetta, ja nämä toimivat positiivisinä kontrolleina. Levyä inkuboidaan yön yli 37 °C:ssa ja seuraavana päivänä arvioidaan elinkykyisyyttä käyttäen LDH (laktaatidehydrogenaasi) -koetta ja MTT (metyylitiotetratsolinium) -koetta.

Osa 3: Solujen elinkykyisyyden arvioiminen

100 µl ravintoliuosta poistetaan kustakin levystä ja siirretään puhtaalle levyille, josta arvioidaan vapautuneen LDH:n määrä. Sitten lisätään 100 µl per kolo MTT-liuosta. Tämä MTT-liuos valmistetaan siten, että lisätään 10 µl MTT-kantaliuosta (5 mg/ml PBS:ssa, fosfaattipuskuri-suolaliuoksessa) kuhunkin 100 µl:aan seerumitonta ravintoliuosta. Levyjä inkuboidaan 37 °C:ssa 4 - 6 tuntia. Sitten lisätään kuhunkin koloon 100 µl happo-alkoholiliuosta (0,08 N HCl isopropanolissa) ja koloja sekoitetaan voimak-

kaasti purppuranpunaisten kiteiden liuottamiseksi. Kontrollikoloissa tulisi olla ravintoliuosta, jossa on MTT:tä ja happo-alkoholia, mutta ei soluja. Levyt luetaan sitten mikrolevylukijalla käyttäen kaksoisaallonpituudelle asetettua koesuodatinta aallonpituudella 570 nm ja vertailusuodatinta aallonpituudella 630 nm. Levyt tulee lukea tunnin sisällä.

Poistetusta ravintoliuoksesta tutkitaan sitten LDH. Yhtä suuret tilavuudet poistettuja näytteitä listään LDH-reaktioseokseen. Tähän tapaukseen sopivat kolot yhdistetään, jolloin saadaan 500 µl näytteitä. Kutakin näytettä varten valmistetaan reaktioseos sekoittamalla 480 µl 0,1 M natriumfosfaattipuskuria, pH 7,5, 10 µl natriumpyruvaattia (66 mM) ja 10 µl pelkistettyä NADH (kukin NADH-malja, joka sisältää 5 mg, valmistetaan uudelleen 440 µl:aan 0,1 N NaOH:ta ja tätä käytetään 10 µl näytettä kohden). Näyte lisätään nopeasti reaktioseokseen kyveteissä, ja absorbanssin häviäminen 340 nm:ssä mitataan Beckman DU-8 -spektrofotometrillä.

Ei-toivottu verenpainetta alentava vaikutus määritetään myös tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi Carron et al.:n menetelmillä, joihin myös viitattiin edellä.

Tällaisen selektiivisen hermosoluja suojaavan verettömyyden vastaisen ja eksitatorista aminohappoa salpauksen ominaisuuksiensa vuoksi esillä olevan keksinnön yhdisteet ovat käyttökelpoisia hoidettaessa aivoihin ja selkäyttimeen kohdistuvaa traumaattista vauriota, keskushermostoa rappeuttavia häiriöitä, kuten halvausta, Alzheimerin tautia, Parkinsonin tautia ja Huntingtonin tautia ilman merkittävää samanaikaisesti tapahtuvaa kohtuutonta verenpaineen laskua. Hoidettaessa tällaisia sairauksia systemisesti ihmispotilaassa hermosoluja suojaavalla määrällä kaavan (I) mukaisia yhdisteitä, annostus on tavallisesti noin 0,02 - 10 mg/kg/päivä (1 - 500 mg/päivä tyypilliselle ihmiselle, joka painaa 50 kg) yksittäisenä tai jaet-

tuina annoksina antotavasta riippumatta. Luonnollisesti riippuen yhdisteestä ja yksittäisen sairauden nimenomaisesti luonteesta, hoitava lääkäri voi määrätä näiden rajojen ulkopuolella olevia annoksia. Suun kautta tapahtuva anto on yleensä edullinen. Kuitenkin, jos potilas ei pysty nielemään tai imeytyminen suun kautta tapahtuvanannon jälkeen on muutoin huonontunut, edullinen antotapa on anto ruoansulatuskanavan ulkopuolelle (i.m., i.v.) tai paikallisesti.

Esillä olevan keksinnön yhdisteet annetaan tavallisesti farmaseuttisten koostumusten muodossa, jotka koostumukset käsittävät vähintään yhtä kaavan (I) mukaista yhdistettä yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän vehikkelin tai laimentimen kanssa suhteessa 1:20 - 20:1. Tällaiset koostumukset formuloidaan yleensä tunnetulla tavalla käyttäen hyväksi kiinteitä tai nestemäisiä vehikkeleitä tai laimentimia, jotka sopivat haluttuun antotapaan: suun kautta tapahtuvaa antoa varten tabletteina, kovina tai pehmeinä gelatiinikapseleina, suspensioina, rakeina, jauheina ja vastaavina muotoina; ruoansulatuskanavan ulkopuolelle annettaessa injisoitavina liuoksina tai suspensioina ja vastaavissa muodoissa, ja paikallisesti annettaessa liuosten, lotionien, voiteiden, salvojen ja vastaavien lääkemuotojen muodossa.

Esillä olevaa keksintöä valaistaan seuraavilla esimerkeillä, mutta se ei rajoitu niiden yksityiskohtiin.

Kaikki ei-vesireaktiot suoritettiin kuivassa, hapettomassa työssä mukaavuussyistä ja tavallisesti saantojen maksimoimiseksi. Kaikki liuottimet/laimentimet kuivatettiin standardien julkaistujen menetelmien mukaisesti tai ostettiin esikuivatussa muodossa. Kaikkia reaktioita sekoitettiin joko magneettisesti tai mekaanisesti. NMR-spektrit tallennetaan 300 MHz:ssä ja ne ilmoitetaan ppm:nä alaspäin trimetyylisilaanista. NMR-liuotin oli CDCl_3 . IR-spektrit annetaan mikrometreinä, tavallisesti erittelemällä ainoastaan vahvat signaalit.

Esimerkki 1

(±)-3,4-dihydro-6-(1-hydroksi-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)etyyli)kinoliini-2-(1H)-oni

Seosta, jossa oli 300 mg (1,23 mmol) 4-hydroksi-4-(fenoksimetyyli)piperidiinihydrokloridia, 409 mg (1,84 mmol) 6-(2-klooriasetyyli)-3,4-dihydrokinolin-2(1H)-onia ja 0,514 ml (0,373 g, 3,7 mmol) trietyyliamiinia 25 ml:ssa asetonitriiliä, kuumennettiin 60 °C:ssa yön yli. Liuotin poistettiin sitten tyhjässä ja jäännös jaettiin veden ja etyyliasetaatin kesken, ja orgaaninen kerros pestiin uudelleen vedellä ja suolaliuoksella. Etyyliasetaattikerros kuivattiin suolaliuoksella ja magnesiumsulfaatilla ja liuotin haihdutettiin, jolloin saatiin 3,4-dihydro-6-(1-okso-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)etyyli)kinoliini-2(1H)-onia ruskeana kiinteänä aineena, joka käytettiin seuraavassa pelkistysvaiheessa puhdistamatta.

Edellä oleva ketoni liuotettiin 25 ml:aan absoluuttista etanolia ja lisättiin 500 mg (13,1 ml) NaBH₄:ä vähitellen 20 minuutin aikana. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa neljä tuntia ja sitten liuotin poistettiin ja jäännös jaettiin veden ja etyyliasetaatin kesken. Kuivaamisen jälkeen etyyliasetaatti poistettiin tyhjässä ja jäännös kromatografoitiin silikageelillä, jolloin saatiin tuote, 73 mg (15 %), s.p. 186 - 188 °C. NMR (CD₃OD) δ 1,70 - 2,10 (4H, m), 2,52 - 3,07 (10H, m), 3,33 (2H, s), 3,83 (2H, s), 6,82 - 7,38 (8H, m).

Esimerkki 2

(±)-5-(1-hydroksi-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)etyyli)bentsimidatsolin-2-oni

Seuraamalla esimerkin 1 menetelmää esillä olevan otsikon yhdiste saatiin 4-hydroksi-4-(fenoksimetyyli)piperidiinihydrokloridista (1,23 mmol), 5-(2-klooriasetyyli)-2-hydroksibentsimidatsolistista (1,84 mmol) ja trimetyyliamiinista (3,7 mmol), jotka olivat 25 ml:ssa asetonitriiliä. Syntyneitä ketonia sekoitettiin natriumboorihydridin

5 kanssa (13,1 mmol) absoluuttisessa etanolissa, jolloin saatiin haluttu yhdiste silikageelillä kromatografoinnin jälkeen. Saanto 35 %, s.p. 232 - 235 °C. Anal. Lasketut arvot $C_{21}H_{25}N_3O_4$, H_2O :lle: C, 62,81; H, 6,77; N, 10,46. Saadut arvot: C, 62,98; H, 6,54; N, 10,32.

Esimerkki 3

(±)-5-(1-hydroksi-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)etyyli)-2-oksindoli

10 Seuraamalla esimerkin 1 menetelmää esillä olevan otsikon yhdiste saatiin 4-hydroksi-4-(fenoksimetyyli)piperidiinihydrokloridista (12,3 mmol), 5-(2-klooriasetyyli)-oksindolista (1,84 mmol) ja trietyyliamiinista (3,7 mmol), jotka olivat 25 ml:ssa asetonitriiliä. Syntynyttä ketonia sekoitettiin natriumboorihydridin kanssa (13,1 mmol) abso-

15 luuttisessa etanolissa, jolloin saatiin haluttu yhdiste silikageelillä kromatografoinnin jälkeen. Saanto 40 %, s.p. 171 - 174 °C.

Esimerkki 4

20 (±)-erythro-5-(1-hydroksi-2-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propyyli)bentsimidatsolin-2-oni

Liuosta, jossa oli 933 mg (2,36 mmol) (±)-5-(2-hydroksibentsimidatsolyyli))-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propan-1-onia 10 ml:ssa jäädetikkahappoa ja 50 ml:ssa absoluuttista etanolia, käsiteltiin vähitellen 944 mg:lla (17,84 mmol) kaliumboorihydridiä 15 - 20 °C:ssa, ja syntynyttä liuosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Reaktioseos haihdutettiin sitten kuiviin ja jäännös otettiin talteen mahdollisimman pieneen määrään vettä. Liuoksen pH säädettiin arvoon 7 - 8 kiinteällä

30 $NaHCO_3$:lla, jolloin saostui kiinteää ainetta. Tämä aine ei liennut kloroformiin ja oli suhteellisen liukenematonta etyyliasetaattiin. Tämä kaikki haihdutettiin uudelleen kuiviin ja jäännökset, jotka olivat kiteytyneet, otettiin talteen etanoliin ja suodatettiin suolojen poistamiseksi.

35 Etanoli haihdutettiin ja jäännös otettiin talteen isopro-

panoliin ja sitä käsiteltiin HCl-kaasulla eetterillä, jol-
 loin saostui ei-kiteistä suolaa, joka erotettiin suodatta-
 malla ja kuivattiin kuivassa typpivirtauksessa. Tämä aine
 liuotettiin kuumaan etyyliasetaattiin, jossa oli metano-
 5 lia, ja kirkastettiin väriä poistavalla puuhiilellä, ja
 sitten metanoli keitettiin pois. Jäähdyttämällä saatiin
 väritöntä kiteistä tuotetta, 410 mg (40 %), s.p. 254 -
 255 °C. IR (KBr) 5,90 μm ; NMR (CD_3OD) δ 1,22 (3H, d, J =
 7), 1,95 - 2,09 (2H, m), 2,15 - 2,30 (2H, m), 3,42 - 3,76
 10 (4H, m), 3,91 (2H, s), 5,47 (1H, s), 6,92 - 7,35 (8H, m).

Esimerkki 5

($\pm$)-treo-5-(1-hydroksi-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksi-
 metyyli)piperidinyyli)propyyli)bentsimidatsolin-2-oni

Yhteensä 700 mg (18,4 mmol) natriumboorihydridiä
 15 lisättiin vähitellen suspensioon, jossa oli 325 mg (0,82
 mmol)($\pm$)-1-(5-(2-hydroksibentsimidatsolyyli)-2-(1-(4-hyd-
 roksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propan-1-onia 20
 ml:ssa absoluuttista etanolia, ja reaktiota sekoitettiin
 yön yli huoneenlämpötilassa. Liuotin haihdutettiin sitten
 20 ja jäljelle jäänyt vaahto otettiin talteen etyyliasetaatin
 ja veden väliin, ja vesikerros uutettiin etyyliasetaatil-
 la. Yhdistetyt etyyliasetaattiuutteet kuivattiin ja haih-
 dutettiin, ja jäljelle jäänyt vaahto kromatografoitiin si-
 likageelillä käyttäen 1:1 etanoli/etyyliasetaattia, jol-
 25 loin saatiin tuote valkoisena kiinteänä aineena; s.p.
 >250 °C. NMR (asetoni- d_6) δ 0,79 (3H, d, J = 7), 1,71 -
 1,88 (2H, m), 1,90 - 2,80 (2H, m), 2,48 - 2,88 (4H, m),
 3,01 (1H, t, J=7), 3,88 (2H, s), 4,26 (1H, d, J=7), 6,86 -
 7,32 (8H, m); Anal. Lasketut arvot $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ 1,5 H_2O :lle:
 30 C, 62,24; H, 7,12; N, 9,89. Saadut arvot: C, 61,72; H,
 6,73; N, 9,03.

Esimerkki 6

(±)-erythro-3,4-dihydro-6-(1-hydroksi-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propyyli)kinolin-2(1H)-oni

5 Liuosta, jossa oli 7,13 g (17,5 mmol) (±)-1-(6-(1,2,3,4-tetrahydro-2-oksokinolinyyli))-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propan-1-onia 135 ml:ssa absoluuttista etanolia ja 70 ml:ssa jääetikkahappoa, käsiteltiin vähitellen 6,22 g:lla (115 mmol) KBH_4 :ä 15 -
10 20 °C:ssa, ja sitten sen annettiin lämmitä huoneenlämpötilaan 30 minuuttia. Reaktioseos haihdutettiin kuiviin ja jäännös otettiin talteen jäihin ja kylmään veteen, ja tämä tehtiin emäksiseksi kiinteällä NaHCO_3 :lla. Kiinteä aine, joka saostui, erotettiin suodattamalla, pestiin vedellä ja
15 ilmakuivattiin, jolloin saatiin 3,66 g kiteistä vapaata emästä, s.p. 192 - 196 °C. Suodos uutettiin etyyliasetaatilla ja yhdistetyt uutteet kuivattiin suolaliuoksella ja MgSO_4 :lla ja haihdutettiin, jolloin saatiin vielä 786 mg tuotetta (kokonaissaanto 62 %). 510 mg:n näyte tätä ainetta
20 liuotettiin etyyliasetaattiin ja sitä käsiteltiin liuoksella, jossa oli HCl-kaasua eetterissä, ja näin saatiin 475 mg kiteistä hydrokloridisuolaa, s.p. 214 - 216 °C (hajoaa). IR (KBr) μm ; NMR (CD_3OD) δ 1,15 (3H, d, J = 7), 1,86 - 2,04 (2H, m), 3,52 - 3,66 (2H, m), 3,69 - 3,80 (1H, m), 3,86 (2H, s), 5,34 (1H, s), 6,81 - 6,96 (4H, m),
25 7,17 - 7,28 (4H, m).

Esimerkki 7

(±)-treo-3,4-dihydro-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propyyli)kinolin-2(1H)-oni

30 Yhteensä 1,50 g (39,5 mmol) NaBH_4 :a lisättiin vähitellen suspensioon, jossa oli 700 mg (1,71 mmol) (±)-1-(5-(2-hydroksibentsimidatsolyyli))-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propan-1-onia 20 ml:ssa absoluuttista etanolia, ja reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Liuotin haihdutettiin sitten ja jäljelle
35

jäänyt vaahto otettiin talteen etyyliasetaatin ja veden välille, ja vesikerros uutettiin etyyliasetaatilla. Yhdistetyt uutteet kuivattiin ja haihdutettiin ja jäljelle jäänyt vaahto kromatografoitiin silikageelillä käyttäen 1:1 etanoli/etyyliasetaattia, ja näin saatiin tuote valkoisena kiinteänä aineena, s.p. 192 - 196 °C. Pieni määrä erytro-

5 yhdistettä muodostui tässä pelkistyksessä, ja se voidaan erottaa pylväästä. NMR (CD₃OD) δ 0,82 (3H, d, J = 7), 1,72 - 2,06 (4H, m), 2,50 - 2,82 (6H, m), 2,88 - 3,02 (2H, t, J=7), 3,02 (1H, t, J=7), 3,84 (2H, s), 4,28 (1H, d, J = 7), 6,80 - 7,34 (8H, m); Anal. Lasketut arvot C₂₂H₂₇N₃O₄ 1,5 H₂O:lle: C, 65,88; H, 7,60; N, 6,40. Saadut arvot: C, 65,74; H, 7,09; N, 6,31.

10

Esimerkki 8

15 (±)-erytro-5-(1-hydroksi-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propyyli)oksindoli

Seosta, jossa oli 0,5 g (2,05 mmol) 4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidiinihydrokloridia, 0,5 g (2,25 mmol) 5-(2-klooripropionyli)oksindolia ja 1 ml (0,725 g, 7,18 mmol) trietyyliamiinia 20 ml:ssa asetonitriiliä, kuumentettiin palautusjäähdytyslämpötilassa 24 tuntia. Liuotin poistettiin sitten tyhjässä ja jäännökset jaettiin etyyliasetaatin ja veden kesken. Etyyliasetaattikerros pestiin vedellä ja suolaliuoksella ja kuivattiin MgSO₄:lla ja vä-

20 kevoitiin, jolloin saatiin ketoni kullankeltaisena vaahtona, joka käytettiin seuraavassa reaktiossa puhdistamatta, 537 mg (66 %).

25

Liuosta, jossa oli 500 mg (1,26 mmol) ketonia 20 ml:ssa etanolia, käsiteltiin vähitellen 1,0 g:lla (26,3 mmol) NaBH₄:a, ja syntynyttä seosta sekoitettiin huoneen-

30 lämpötilassa 24 tuntia. Liuotin poistettiin tyhjässä ja jäännökset jaettiin etyyliasetaatin ja veden kesken. Etyyliasetaattikerros pestiin ja kuivattiin suolaliuoksella ja MgSO₄:lla ja haihdutettiin sitten kuiviin. Jäännökset kromatografoitiin silikageelillä käyttäen etyyliasetaattia ja

35

vähitellen kasvavia konsentraatioita etanolia, ja näin saatiin treo-tuote puhtaina fraktioina, 1,21 mg (24 %), s.p. 204 - 207 °C. NMR (DMSO-d₆) δ 0,70 (3H, d, J = 7), 1,58 - 1,92 (4H, m), 2,40 - 2,65 (4H, m), 2,86 (1H, m), 3,32 - 3,40 (2H, m), 3,79 (2H, s), 4,20 (1H, d, J=7), 6,70 - 7,35 (8H, m), 10,34 (1H, s).

Esimerkki 9

(±)-1-(6-(1,2,3,4-tetrahydro-2-oksokinolinyyli))-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propan-1-oni

Suspensiota, jossa oli 8,30 g (34,06 mmol) 4-hydroksi-4-fenoksimetyylipiperidiinihydrokloridia ja 8,09 g (34,06 mmol) 6-(2-kloori-1-propionyli)-1,2,3,4-tetrahydrokinolin-2(1H)-onia 100 ml:ssa asetonitriiliä, käsiteltiin 16,61 ml:lla (12,04 g, 0,12 mmol) trietyyliamiinia ja seosta kuumennettiin palautusjäähdytyslämpötilassa kolme tuntia ja sitten sitä sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa.

Reaktioseos kaadettiin veteen ja uutettiin kolme kertaa etyyliasetaatilla, ja yhdistetyt uutteet kuivattiin sulaliuoksella ja magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin vaahtoa. Tämä vaahto liuotettiin kuumaan metanoliin ja etyyliasetaattiin ja jäähdytettiin, jolloin saatiin kullankeltaista kiinteää ainetta, joka havaittiin lähtöaineklooriketoniksi ja heitettiin pois. Suodokset haihdutettiin ja liuotettiin etyyliasetaattiin, ja lisättiin eetteriä kiteytymisen helpottamiseksi. Tuote suodatettiin ja pestiin eetterillä, jolloin saatiin 8,84 g (63,6 %) tuotetta kermanvärisenä kiinteänä aineena, s.p. 137 - 139 °C. Analyyttinen näyte kiteytettiin kuumasta etyyliasetaatista. NMR (CD₃OD) δ 1,28 (3H, d, J = 7), 1,60 - 1,92 (4H, m), 2,52 - 2,84 (6H, m), 3,00 (2H, t, J = 7), 3,75 (2H, s), 4,22 (1H, q, J=7), 6,82 - 7,00 (4H, m), 7,16 (2H, m), 7,82 - 7,98 (2H, m); Anal. Lasketut arvot

$C_{24}H_{28}N_2O_4$:lle: C, 70,56; H, 6,91; N, 6,86. Saadut arvot: C, 70,16; H, 6,78; N, 6,76.

Esimerkki 10

(±)-1-(5-(2-hydroksibentsimidatsolyyli))-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propan-1-oni

Suspensiota, jossa oli 2,43 g (10,0 mmol) 4-hydroksi-4-fenoksimetyylipiperidiinihydrokloridia ja 2,25 g (10,0 mmol) 5-(2-kloori-1-propionyyli)-2-hydroksibentsimidatsolia 40 ml:ssa asetonitriiliä, käsiteltiin 4,88 ml:lla (3,53 g, 35,0 mmol) trietyyliamiinia, ja reaktioseosta kuumennettiin palautusjäähdytyslämpötilassa 90 minuuttia ja sitten se jätettiin viikonlopuksi huoneenlämpötilaan.

Reaktioseos kaadettiin sitten seokseen, jossa oli vettä ja etyyliasetaattia, ja syntynyt suspendoitu kiinteä aine erotettiin suodattamalla ja todettiin puhtaaksi tuotteeksi, 1,15 g, kuivaamisen jälkeen. Suodos säädettiin pH-arvoon 7,0 ja uutettiin etyyliasetaatilla useita kertoja, jolloin saatiin suolaliuoksella ja $MgSO_4$:lla kuivaamisen jälkeen väritöntä kiinteää ainetta, joka uudelleenkiteytettiin kuumasta etyyliasetaatti/metanolista, jolloin saatiin vielä 560 mg tuotetta (kokonaissaanto 43 %), s.p. 230 - 235 °C (hajoaa). NMR ($CD_3OD/DMSO-d_6$) δ 1,29 (2H, d, $J = 7$), 1,60 - 1,92 (4H, m), 2,54 - 2,84 (4H, m), 3,77 (2H, s), 4,26 (1H, q, $J=7$), 6,86 - 7,10 (6H, m), 7,75 - 7,92 (2H, m).

Esimerkki 11

(±)-1-(5-oksindolyyli))-2-(1-(4-hydroksi-4-fenoksimetyyli)piperidinyyli)propan-1-oni

Seuraamalla valmistuksen 10 menetelmää esillä olevan otsikon yhdiste saatiin 4-hydroksi-4-fenoksimetyylipiperidiinihydrokloridista (10,0 mmol), 5-(2-klooripropionyyli)oksindolistista (10 mmol) ja trietyyliamiinista (35 mmol), jotka olivat 50 ml:ssa asetonitriiliä. Otsikon yhdiste eristettiin kiteyttämällä kuumasta etyyliasetaatti/metanolista, jolloin saatiin amorfista vaahtoa. Saanto

66,4 %. NMR (CDCl_3) δ 1,28 (3H, d, $J = 7$), 1,58 - 1,78 (4H, m), 2,40 - 2,84 (4H, m), 3,54 (2H, s), 3,76 (2H, s), 4,09 (1H, q, $J=7$), 6,78 - 6,96 (3H, m), 7,14 - 7,26 (2H, m), 7,84 - 8,05 (3H, m), 9,52 (1H, leveä s), 9,64 (1H, leveä s).

Valmistus 1

3,4-dihydrokinolin-2-(1H)-oni

Suspensiota, jossa oli 50,0 g (0,259 mol) o-nitrokanelihappoa 500 ml:ssa etanolia, käsiteltiin viidellä teelusikallisella Raney-nikkeliä ja hydrattiin Parr-ravistimessa yön yli alkupaineessa, joka oli 50 psi. Aamulla paine nostettiin jälleen 50 psi:ksi ja reaktiota jatkettiin vielä viiden tunnin ajan. Reaktioseos suodatettiin katalyytin poistamiseksi ja pestiin sitten silikageelikeroksen läpi seoksella, jossa oli etyyliasetaattia ja etanolia nikkelisuolojäänteiden poistamiseksi. Haihduttamalla suodos saatiin haluttu tuote 57 %:n saannolla. NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2,45 (2H, t, $J = 7$), 2,87 (2H, t, $J = 7$), 6,87 (2H, d:n d, $J=7$, 7), 7,12 (2H, d:n d, $J = 7$, 10), 10,08 (1H, s). S.p. 165 - 166 °C.

Valmistus 2

6-(2-klooripropionylyli)-3,4-dihydrokinolin-2-(1H)-oni

Suspensiota, jossa oli 72,5 g (0,544 mol) AlCl_3 :a 800 ml:ssa CS_2 :ta, sekoitettiin kuivassa typpi-atmosfäärissä ja samalla lisättiin 14,1 ml (20,0 g, 0,177 mol) 2-klooripropionylikloridia, sen jälkeen 20,0 g (0,136 mol) 3,4-dihydrokinolin-2(1H)-onia. Reaktioseosta kuumennettiin palautusjäähdytyslämpötilassa neljä tuntia, jona aikana havaittiin faasien erottuminen. Reaktio tukahdutettiin kaatamalla se jäihin ja sekoittaen voimakkaasti. Haalean keltainen saostuma, joka muodostui, erotettiin suodattamalla, pestiin vedellä ja kuivatettiin yön yli P_2O_5 :llä, jolloin saatiin 27,7 g (91 %) haluttua tuotetta, s.p. 236,5 - 238 °C.

Valmistus 3**5-(2-klooripropionyyli)-2-hydroksibentsimidatsoli**

Seuraamalla valmistuksen 2 menetelmää esillä olevan otsikon yhdiste saatiin 2-hydroksibentsimidatsolista (0,136 mol), aluminiumkloridista (0,544 mol) ja 2-klooripropionyylikloridista (0,177 mol), jotka olivat 800 ml:ssa CS₂:ta. Otsikon yhdiste eristettiin suodattamalla. Saanto 92 %, s.p. 245 °C (hajoaa). Anal. Lasketut arvot C₁₀H₉ClN₂O₂:lle: C, 53,47; H, 4,04; N, 12,47. Saadut arvot: C, 54,41; H, 4,07; N, 13,25.

Valmistus 4**5-(2-klooripropionyyli)oksindoli**

Seuraamalla valmistuksen 2 menetelmää esillä olevan otsikon yhdiste saatiin oksindolista (0,136 mol), aluminiumkloridista (0,544 mol) ja 2-klooripropionyylikloridista (0,177 mol), jotka olivat 800 ml:ssa CS₂:ta. Otsikon yhdiste eristettiin suodattamalla. Saanto 91 %, s.p. 157 - 158 °C.

Valmistus 5**6-(2-klooriasetyyli)-3,4-dihydrokinolin-2(1H)-oni**

Seuraamalla valmistuksen 2 menetelmää, esillä olevan otsikon yhdiste saatiin 3,4-dihydrokinolin-2-(1H)-onista (0,136 mol), aluminiumkloridista (0,544 mol) ja 2-klooriasetyylikloridista (0,177 mol), jotka olivat 800 ml:ssa CS₂:ta. Otsikon yhdiste eristettiin suodattamalla. Saanto 50 %, s.p. 215 - 216 °C.

Valmistus 6**5-(2-klooriasetyyli)-2-hydroksibentsimidatsoli**

Seuraamalla valmistuksen 2 menetelmää esillä olevan otsikon yhdiste saatiin 2-hydroksibentsimidatsolista (0,136 mol), aluminiumkloridista (0,544 mol) ja 2-klooriasetyylikloridista (0,177 mol), jotka olivat 800 ml:ssa CS₂:ta. Otsikon yhdiste eristettiin suodattamalla. Kvantitatiivinen saanto, s.p. 273 - 275 °C (hajoaa).

Valmistus 7

5-(2-klooriasetyyli)oksindoli

Seuraamalla valmistuksen 2 menetelmää esillä olevan
 5 otsikon yhdiste saatiin oksindolista (0,136 mol), alumi-
 niumkloridista (0,544 mol) ja 2-klooriasetyylikloridista
 (0,177 mol), jotka olivat 800 ml:ssa CS₂:ta. Otsikon yhdis-
 te eristettiin suodattamalla. Saanto 90 %, s.p. 236,5 -
 239 °C.

Valmistus 8

10 4-hydroksi-4-fenoksimetyylipiperidiinihydrokloridi

Öllytöntä natriumhydridiä (2,16 g, 0,09 M) lisät-
 tiin kuivaan dimetyylisulfoksidiin (250 ml) typpikaasuat-
 mosfäärissä ja seosta kuumennettiin 60 - 65 °C:seen, kun-
 nes yhtenäinen musta liuos oli muodostunut, noin yksi tun-
 15 ti. Sitten lisättiin 19,83 g (0,09 M) trimetyylisulfokso-
 niumjodidia (heikosti eksoterminen) ja seosta sekoitett-
 tiin, kunnes oli saatu ruskea liuos, noin 30 minuuttia.
 Sitten liuosta, jossa oli 13,40 g (67,3 mM) N-t-butyylidik-
 sikarbonyyli-4-piperidonia 50 ml:ssa dimetyylisulfoksidia,
 20 sekoitettiin huoneenlämpötilassa yksi tunti. Reaktioseos
 kaadettiin sitten 1 l:aan kylmää vettä ja tämä kokonaisuus
 uutettiin 4 x 100 ml:n annoksilla heksaania. Yhdistetyt
 heksaanuuutteet pestiin takaisin 50 ml:lla vettä ja suola-
 liuoksella ja kuivattiin magnesiumsulfaattilla, suodatet-
 25 tiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin 11,75 g valkoista
 kiteistä tuotetta, 6-t-butyylidiksikarbonyyli-1-oksa-6-at-
 saspiro[2.5]oktaania, (78 % saanto).

Uuttamalla edelleen vesikerrokset 3 x 50 ml:n eril-
 lä heksaania, saatiin edelleen 650 mg tuotetta, jolloin
 30 kokonaissaanto oli 82,5 %.

S.p. 57,5 - 59,5 °C; IR (KBr) 5,90 μm; NMR δ 1,32 -
 1,48 (2H, m), 1,42 (9H, s), 1,74 - 1,80 (2H, m), 2,65 (2H,
 s), 3,31 - 3,43 (2H, m), 3,61 - 3,72 (2H, m); Anal. Las-
 35 ketut arvot C₁₁H₁₉NO₃:lle: C, 61,94; H, 8,98; N, 6,57. Saa-
 dut arvot: C, 62,05; H, 9,09; N, 6,58.

Liuosta, jossa oli 10,37 g (0,11 M) fenolia 100 ml:ssa kuivaa dimetyylisulfoksidia, käsiteltiin vähitellen 1,99 g:lla (82,8 mmol) öljytöntä natriumhydridiä pitäen lämpötila 20 - 25 °C:ssa kylmän vesihauteen avulla. Reak-
 5 tioseosta sekoitettiin sitten huoneenlämpötilassa 45 minuuttia, jolloin saatiin harmaa suspensio. 11,75 g (55,2 mmol) 6-t-butyylimoksimetyyli-1-oksa-6-atsaspiro[2,5]oktaania, joka oli liuotettu 65 ml:aan dimetyylisulfoksidia, lisättiin tipoittain, minkä jälkeen reaktioseosta kuumen-
 10 nettiin 55 - 60 °C:seen seitsemän tuntia ja sekoitettiin sitten yön yli huoneenlämpötilassa.

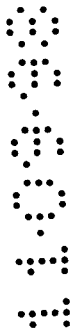
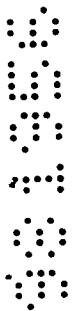
Reaktioseos kaadettiin sitten 1 l:aan kylmää vettä ja uutettiin 4 x eetterillä. Yhdistetyt eetteriuutteet pestiin takaisin 10-%:isella NaOH:lla ja suolaliuoksella
 15 ja kuivattiin magnesiumsulfaattilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin haluttu tuote, N-t-butyylimoksimetyyli-4-hydroksi-4-fenoksimetyyli-4-piperidiini, öljynä, joka painoi 17,01 g (100 %).

IR (filmi) 5,91, 2,95 μm ; NMR (CDCl_3) δ 1,46 (9H, s); 1,53 - 1,80 (4H, m), 3,13 - 3,30 (2H, m), 3,80 (2H, s), 3,80 - 3,98 (2H, m), 6,84 - 6,99 (2H, m), 7,22 - 7,44 (3H, m); Anal. Lasketut arvot $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_4$:lle: C, 66,42; H, 8,20; N, 4,56. Saadut arvot: C, 65,72; H, 8,21; N, 4,77.

Liuosta, jossa oli 17,0 g (0,055 M) N-t-butyylimoksimetyyli-4-hydroksi-4-fenoksimetyyli-4-piperidiiniä 150 ml:ssa metanolia, kyllästettiin HCl-kaasulla. Kun seos oli jäähdytetty, sitä käsiteltiin edelleen HCl-kaasulla ja tämä menetelmä toistettiin jälleen. Kun kiteet olivat muodostuneet, reaktioseosta käsiteltiin 500 ml:lla vedetöntä eetteriä ja sen annettiin sekoittua huoneenlämpötilassa
 25
 30 yön yli.

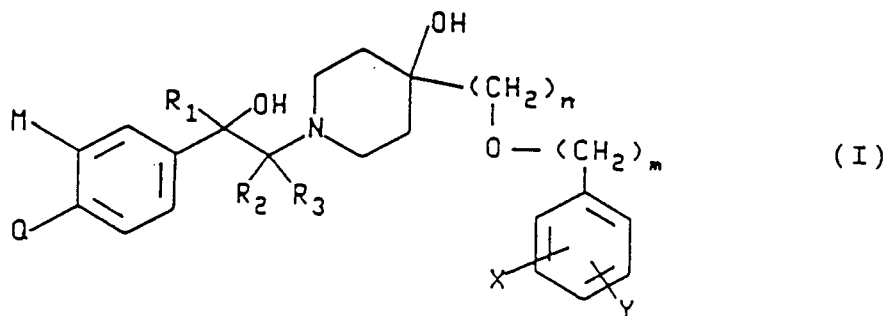
Tuote suodatettiin ja pestiin kuivalla eetterillä ja kuivattiin kuivan typen virtauksessa, jolloin saatiin 10,85 g (80,6 %) kiteistä ainetta, s.p. 202 - 204 °C. IR (KBr) 3,06, 3,14, 3,44, 3,57, 3,56, 6,33, 8,06 μm ; NMR
 35

(D₂O) δ 2,00 (4H, leveä s), 3,34 (4H, leveä s), 4,00 (2H, s), 6,98 - 7,09 (3H, m), 7,30 - 7,43 (2H, m). Anal. Laske-
tut arvot C₁₂H₁₇NO₂ HCl:lle: C, 59,13; H, 7,44; N, 5,75.
Saadut arvot: C, 58,98; H, 7,11; N, 5,65.



Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, jonka kaava on



ja sen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, jossa kaa-
vassa R_1 , R_2 ja R_3 valitaan kukin ryhmästä, joka koostuu
seuraavista: vety, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyyli
ja substituoitu fenyyli, jossa mainitussa substituoitussa
fenyyliissä oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka
koostuu seuraavista: hydroksi, alkyyli, jossa on 1 - 4
hiiltä, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino,
nitro ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

20 tai R_1 ja R_2 muodostavat yhdessä valittuina metyleeni-,
etylenei-, propyleeni- tai butyleeniryhmän;

m on 0 - 2;

n on 1 tai 2;

25 X ja Y valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavis-
ta: vety, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, alkok-
si, jossa on 1 - 4 hiiltä, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä,
hydroksi, amino, nitro ja substituoitu fenoksi, jossa mai-
nitussa substituoitussa fenoksissa oleva substituentti va-
litaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, hydroksi,
30 alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, kloori, bromi, fluori,
trifluorimetyyli, nitro, amino ja alkoksi, jossa on 1 - 4
hiiltä;

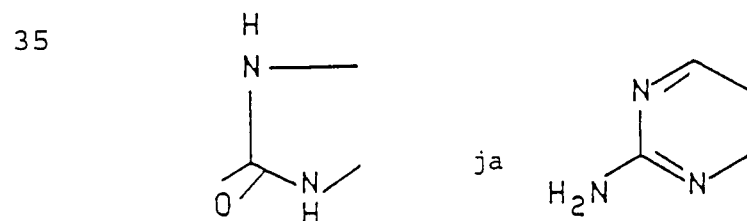
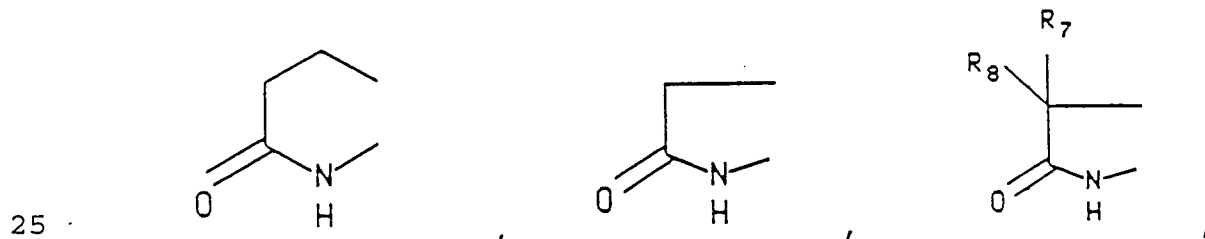
35 M ja Q valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavis-
ta: vety, hydroksi, amino, kloori, bromi, fluori, trifluo-
rimetyyli, nitro, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, alkoksi,

jossa on 1 - 4 hiiltä, N,N-dialkyyliamino, jossa on 1 - 4 hiiltä kummassakin mainitussa alkyyliässä, N-alkyyliamino, jossa on 1 - 4 hiiltä, NHCOR_4 , NHCOOR_5 ja NHSO_2R_6 ;

5 jossa R_4 valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: vety, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyyli ja substituoitu fenyyli, jossa mainitussa substituoitussa fenyyliässä oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: hydroksi, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino, nitro, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, ja alkoksi, jossa
10 on 1 - 4 hiiltä;

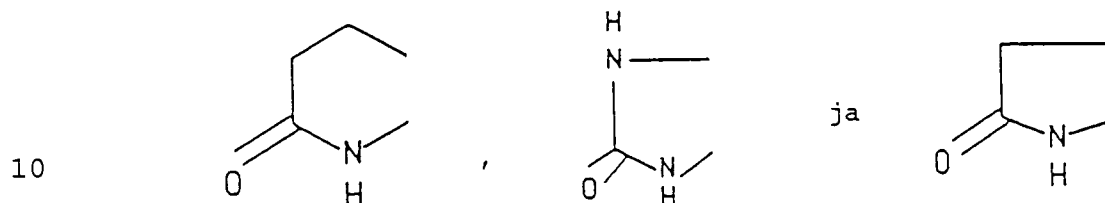
ja jossa R_5 ja R_6 valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu seuraavista: alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, fenyyli ja substituoitu fenyyli, jossa mainitussa substituoitussa fe-
15 nyylissä oleva substituentti valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: hydroksi, kloori, bromi, fluori, trifluorimetyyli, amino, nitro, alkyyli, jossa on 1 - 4 hiiltä, ja alkoksi, jossa on 1 - 4 hiiltä;

20 tai M ja Q, kun ne valitaan yhdessä, muodostavat kahdenarvoisen radikaalin Z, jossa Z valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista:



jossa R_7 ja R_8 valitaan kumpikin ryhmästä, joka koostuu vedystä ja metyylistä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, jossa R_2 on vety; R_3 on vety tai metyyli ja M ja Q muodostavat radikaalin Z, jossa Z valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista:



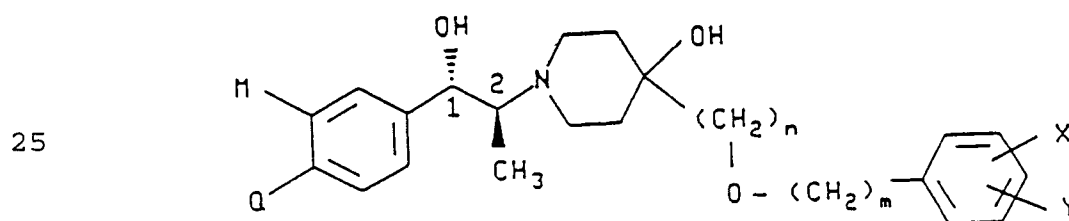
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste, jossa n on 1 ja m on 0.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen yhdiste, jossa R_1 on vety.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdiste, jossa R_3 on vety.

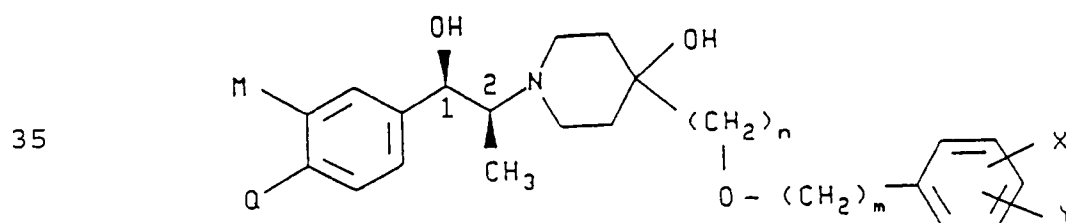
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen yhdiste, jossa X ja Y ovat kumpikin vetyjä.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdiste, jonka kaava on



8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen yhdiste, jossa X ja Y ovat kumpikin vetyjä.

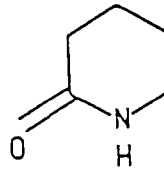
9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdiste, jonka kaava on



10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen yhdiste, jossa X ja Y ovat kumpikin vetyjä.

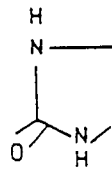
11. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, jossa Z on

5



12. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, jossa Z

10 on

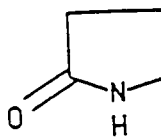


15

13. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, jossa Z

on

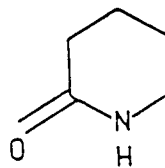
20



14. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, jossa Z

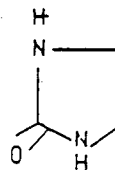
on

25

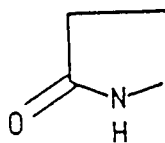


15. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, jossa Z

30 on

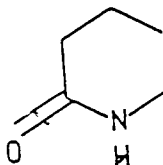


16. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, jossa Z on



5

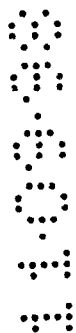
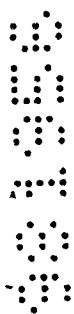
17. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, jossa Z on



10

18. Farmaseuttinen koostumus, joka käsittää hermo-
soluja suojaavan määrän patenttivaatimuksen 1 mukaista
yhdistettä ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ai-
netta.

15



HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
981956	C07D 401/06, A61K 31/445
	☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO
Patenttivirastojen julkaisut FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US:
C07D 401/06, A61K 31/445
☐ jatkuu kääntöpuolella
Muu aineisto
☐ jatkuu kääntöpuolella

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
A	EP-A-398578, julk.22.11.90, Pfizer, C07D 401/06	1 - 18
A	EP-A-351282, julk.17.1.90, Synthelabo, C07D 401/06	1 - 18
A	SE-B-447255, julk.3.11.86, Otsuka, C07D 401/06	1 - 18
☐ jatkuu kääntöpuolella		
*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys	Tutkija	
29.5.2000	<i>Riitta Lantta</i>	