(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 921525 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 921525

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07D295/182

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **07.04.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **07.04.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **10.10.1992**

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

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

09.04.1991 DE 4111394

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Behringwerke Aktiengesellschaft,** 3550 Marburg, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Stüber, Werner,** BRD, SAKSA, (DE)
2 • **Dickneite, Gerhard,** Germany, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Amidinofenyylialaniinijohdannaisia, menetelmä niiden valmistamiseksi, niiden käyttö ja niitä sisältäviä aineita

Amidinofenylalaninderivat, förfarande för deras framställning, deras användning och dessa innehållande ämnen

Amidinofenyylialaniinijohdannaisia, menetelmä niiden valmistamiseksi, niiden käyttö ja niitä sisältäviä aineita

Keksintö koskee amidinofenyylialaniinijohdannaisia, menetelmää niiden valmistamiseksi, niiden käyttöä sekä farmaseuttisia aineita, jotka sisältävät mainittuja yhdisteitä.

Monet patofysiologiset tilat johtavat tunnetusti antitrombiini III:n (AT III) kulumiseen, joka on tärkein plasmassa esiintyvä trombiinin inhibiittori. AT III:n väheneminen johtaa tromboosin vaaran suurenemiseen, niin kuin mm. monista tapauksista, joihin liittyy synnynnäinen AT III:n puute, myös tiedetään. AT III:n tason putoamisesta alle 75 %:iin ohjearvosta on seurauksena tromboembolisia komplikaatioita. Nämä komplikaatiot ilmenevät usein leikkausten jälkeisten ja shokkitiloihin liittyvien, disseminoituneiden, suonensisäisten hyytymien muodossa. Monissa tapauksissa esiintyy tällöin hengenvaarallisia verihyytymiä. Lääketieteessä on tähän saakka käytetty trombioottisten sairauksien hoitamiseen ja ennalta ehkäisemiseen vaikutustavaltaan vaihtelevia antikoagulantteja. Tromboosin vaaran akuuttiin torjuntaan on käytetty sellaisia aineita kuin AT III ja hepariini ja viime aikoina myös hirudiinia. Pitkäaikaisprofylaksia toteutetaan kumariini- ja indaanidionijohdannaisilla. Esitettyjen koagulanttien rasitteina on kuitenkin puutteita, jotka ovat osaksi huomattaviakin.

Esimerkiksi hepariinia voidaan sen polysakkaridirakenteen vuoksi antaa ainoastaan parenteraalisesti ja sen vaikutuskin riippuu toimintakykyisestä antitrombiini III -pitoisuudesta. Kumariinit vaikuttavat suoraan proteiinin biosynteesiä inhiboivasti sillä tavalla, että vitamiinista K riippuvaisia hyytymistekijöitä II, VII, IX ja X ei ole enää riittävästi tarjolla ja hyytymiskyky pienenee siten. Siitä on seurauksena vaikutuksen viivästyminen. Tunnettuja

sivuvaikutuksia ovat hemorraginen ihokuolio, pahoinvointi ja hiustenlähtö.

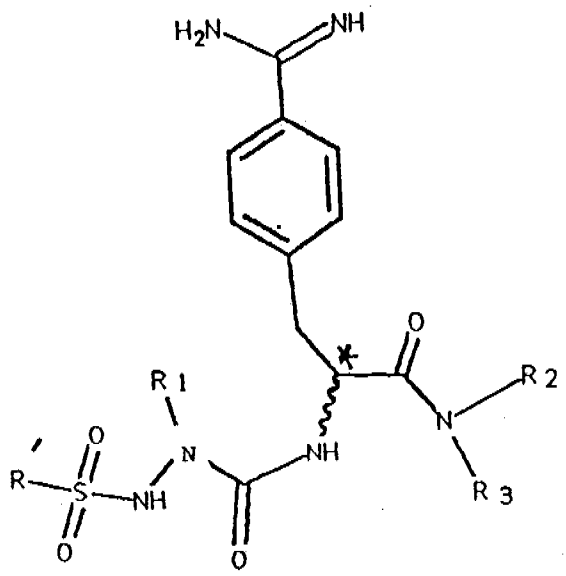
Sitä vastoin pienimolekyylisten trombiini-inhibiittoreiden etuna on se, että ne vaikuttavat kofaktoreista riippumattomasti suoraan trombiiniin sitoutumalla suoraan sen aktiiviseen keskukseen ja tavallaan inaktivoivat siten entsyymin. Kemiallisen rakenteensa johdosta näitä yhdisteitä voidaan antaa suun kautta ja niillä on välitön vaikutus.

Erityisen tunnetuiksi ovat tulleet arginiini- ja fenyylialaniinipohjaiset aminohappojohdannaiset. Ensin mainittuun ryhmään kuuluvat sellaiset yhdisteet kuin D-fenyylialanyyli-L-prolyyli-arginiinialdehydi ja (2R,4R)-4-metyyli-1-[N2-(3-metyyli-1,2,3,4-tetrahydro-8-kinoliinisulfonyyli)-L-arginyyli]-2-piperidiinikarboksyylihappomonohydraatti ("MD 805"). MD 805 on kompetitiivinen spesifinen trombiini-inhibiittori, jota käytetään myös terapeuttisesti. Yksi tunnettu amidinofenyylialaniinijohdannainen on lisäksi ß-naftyylisulfonyyliglysyyli-R,S-4-amidinofenyylialanyylipiperididi (NAPAP). EP-hakemusjulkaisuissa 0 236 163 ja 0 236 164 on kuvattu NAPAP:n johdannaisia. Niissä glysiini on korvattu aminohapolla, jonka rakenne on NH_2-CHR^1-COOH, jossa R^1 on alempi alkyyliryhmä, alempi hydroksialkyyliryhmä, fenyyliryhmä tai 4-hydroksifenyyliryhmä. 4-amidinofenyylialaniini (Aph) voi olla N-metyloitu yhdisteeksi N-metyyli-Aph. Lisäksi on kuvattu NAPAP:n erilaisten johdannaisten muodostamista muuntamalla aryylisulfonyyliryhmää, "sillan" muodostavaa glysiiniä tai piperidiinirengasta. Sopivimpia ovat α- tai ß-naftyylisulfonyyliryhmät N-päässä, kun sen sijaan hetroaryylisulfonyyliryhmät, kuten esimerkiksi 8-kinoliinisulfonyyliryhmä, ovat kertalukuina ilmaistavissa olevan verran huonompia. Luonnollisten aminohappojen esiintymisellä siltaryhmänä hydrofobisen naftyyliryhmän ja Aph:n välissä on se haittapuoli, että amidisidos on katkaistavissa entsymaattisesti, jol-

loin Aph lohkeaa pois. Tästä haittapuolesta joudutaan kärsimään varsinkin suun kautta tapahtuvan antamisen yhteydessä. Glysiinin korvaaminen muilla siltaryhmillä, kuten esimerkiksi ß-alaniinilla, johtaa kuitenkin selvään tehon menetykseen trombiinin inhiboinnissa. Myös korvaus iminohapoilla, kuten esimerkiksi proliinilla, johtaa tehon menetykseen.

Keksinnön päämääränä oli sen vuoksi tarjota käytettäviksi uusia amidinofenyylialaniinipohjaisia yhdisteitä, joilla on suurempi antitromboottinen vaikutus kuin tunnetuilla yhdisteillä ja suuri resistenssi entsyymejä vastaan sekä samalla parantunut siedettävyys.

Tämä keksintö koskee siten yhdisteitä, jotka vastaavat kaavaa I



jossa

R' on naftyyli- tai fenyyliryhmä, joka voi olla substituoitu 1 - 3 alkoksyyliryhmällä, jotka sisältävät korkeintaan 3 C-atomia, tai korkeintaan viidellä alkyyliryhmällä, jotka sisältävät 1 tai 2 C-atomia, tai kromaaniryhmä, joka voi olla substituoitu korkeintaan viidellä metyyliryhmällä,

R^1 on vety, alempi alkyyliryhmä, joka sisältää korkeintaan 4 C-atomia, hydroksialkyyliryhmä, aryylialkyyliryhmä, joka sisältää korkeintaan 7 C-atomia, tai karboksialkyyliryhmä, joka sisältää korkeintaan 4 C-atomia,

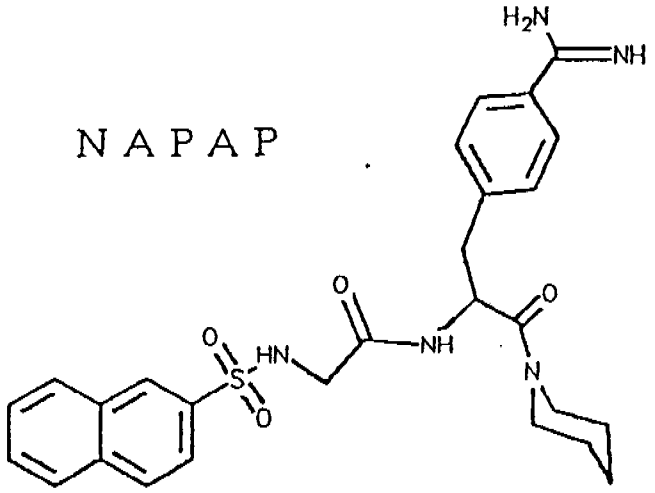
kumpikin ryhmistä R^2 ja R^3, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, on korkeintaan 4 C-atomia sisältävä alkyyliryhmä, jolloin R^2 ja R^3 voivat muodostaa yhdessä typpiatomin kanssa renkaan, joka voi olla substituoitu karboksyyliryhmällä, hydroksyyliryhmällä tai hydroksialkyyliryhmällä, joka sisältää korkeintaan 3 C-atomia, ja

tähdellä (*) merkityllä asymmetriakeskuksella on R- tai S-rakenne, edullisesti R-rakenne.

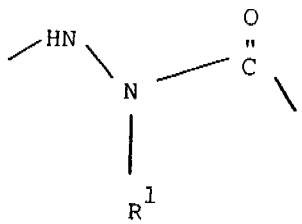
Olennainen ero tunnettuihin rakenteisiin verrattuna on se, että atomi, johon R^1 on sitoutunut, on typpiatomin sijasta hiiliatomi.

NAPAP:llä on seuraava rakenne:

NAPAP



Antitromboottista vaikutusta kyettiin yllättäen lisäämään huomattavasti korvaamalla NAPAP:ssä esiintyvä glysiini atsa-aminohapporyhmillä. Atsa-aminohapporyhmät ovat tunnettuja ryhmiä, joita voidaan kuvata seuraavalla kaavalla:



Atsa-aminohapporakenneosa johti edellä kaavassa I esitetyn kaltaisiin rakenteisiin.

ß-naftyylisulfonyyli-atsaglysyyli-D-amidinofenyyli-alanyyli-piperididin teho on, yllättävää kyllä, 5 kertaa suurempi kuin glysiiniyhdisteen teho. Kaavan I mukainen aminohappojen ja hydrofobisten ryhmien R' yhdistelmä johtaa pikomooliluokkaa oleviin KI- ja IC_{50}-arvoihin. Atsa-aminohapporyhmiä sisältävät yhdisteet ovat lisäksi resistenttejä entsymaattista hajoamista vastaan, niin että keksinnön mukaisille yhdisteille on tehon huomattavan kasvun ohella tunnusomaista suurempi stabiilisuus.

Keksinnön mukaiset yhdisteet valmistetaan sinänsä tunnetuin menetelmin, kuten esimerkiksi menetelmin, joita Erich Wünsch on esittänyt teoksessa Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, osa 15 (1 + 2), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, tai joita on esitetty julkaisussa Pharmazie 39 (1984) 228.

Edullisesti Boc-syaanifenyylialaniini liitetään ensin "amiinikomponenttiin". Amiinikomponenttina käytetään edullisesti syklisiä amiineja, kuten esimerkiksi piperidiiniä, metyylipiperidiiniä tai hydroksimetyylipiperidiiniä. Peptidisidoksen muodostus tapahtuu tavanomaisilla perusmenetelmillä, joissa käytetään edullisesti karbodiimidiä hydroksibentsotriatsolin läsnä ollessa dimetyyliformamidissa tai jossakin muussa sitä vastaavassa liuottimessa. Nα-suojatun yhdisteen eristyksen jälkeen suojausryhmä, tässä tapauksessa Boc-ryhmä, poistetaan hapolla. Suojausryhmän lohkaisemiseen käytetään edullisesti trifluorietikkahappoa, mahdollisesti jossakin liuottimessa, kuten esimerkiksi dikloorimetaanissa, tai HCl:a etikkahaposssa.

Atsa-aminohapon liittäminen tapahtuu myös menetelmin, jotka ovat sinänsä tunnettuja, kuten esimerkiksi aktiivinen esteri -menetelmällä, jossa suojatun hydratsiinijohdannaisen annetaan reagoida kloorimuurahaishappoesterin

kanssa aktiivisen esterin muodostamiseksi. Aktiivisina estereinä käytetään erityisesti p-nitrofenyyliestereitä. Toisena mahdollisuutena tulee kysymykseen syaanifenyyliryhmän aminoryhmän aktivointi muodostamalla isosyanaattiryhmä, mitä seuraa reaktio hydratsiinijohdannaisen kanssa. Hydratsiinien funktionaaliset Nß-aminoryhmät on reaktioissa suojattu tunnetuilla suojausryhmillä, johon suojaukseen käytetään erityisesti bentsyylioksikarbonyyliryhmää ja aivan erityisesti t-butyylioksikarbonyyliryhmää. Sen jälkeen kun suojausryhmä on lohkaistu hapolla, toteutetaan kytkentäreaktio aromaattisen, heteroaromaattisen tai heterosyklisen sulfonihappokloridin kanssa liuottimessa, kuten esimerkiksi tetrahydrofuraanissa, dioksaanissa, dikloorimetaanissa tai DMF:ssa, lisäten mukaan emästä, kuten esimerkiksi N-metyylimorfoliinia, trietyyliamiinia tai diisopropyylietyyliamiinia. Monesti osoittautuu kuitenkin edulliseksi liittää sulfonihappokloridijohdannainen ensin hydratsiinijohdannaiseen. Siten voidaan välttää suojausryhmän liittäminen. Funktionaalisen syaaniryhmän muuntaminen amidinoryhmäksi toteutetaan tunnettuja reaktio-ohjeita noudattaen. Edullisesti vastaavaa syaanifenyylialaniinijohdannaista käsitellään trietyyliamiinin ja pyridiinin seoksessa muutama vuorokausi rikkivedyllä. Näin muodostettu tioamidi eristetään ja muunnetaan metylointiaineella, kuten esimerkiksi metyylijodidilla, tioimidihappometyyliesteriyhdisteeksi. Ammoniumyhdisteillä, kuten esimerkiksi ammoniumasetaatilla, käsittelemällä, edullisesti metanolin ollessa liuottimena, on mahdollista saada aikaan haluttu amidinofenyylialaniiniyhdiste.

Yhdisteet puhdistetaan tavanomaisin menetelmin. Edullisesti käytetään hyväksi geelipermeaatiokromatografiaa, jossa käytetään sellaisia materiaaleja kuin esimerkiksi Sephadex^{R} LH-20, tai ioninvaihtokromatografiaa, jossa käytetään sellaisia materiaaleja kuin esimerkiksi karboksimetyyliselluloosa, jolloin on erityisen edullista käyt-

tää asetaattipuskuria. Keksinnön mukaisten yhdisteiden puhtaus tarkistetaan ohutkerroskromatografian tai HPLC:n avulla. Identiteetti tarkistetaan alkuaineanalyysin ja NMR-spektrin avulla.

Keksinnön mukaiset inhibiittorit testataan, jotta saadaan selville niiden vaikutus eri kriteerien mukaan; edullisesti määritetään KI-arvo, IC_{50}-arvo ja osittaistromboplastiiniaika (PTT) *in vivo* ja *in vitro*. Niiden mukaan patenttivaatimusten mukaiset yhdisteet ovat spesifisiä ja erittäin aktiivisia trombiini-inhibiittoreita, joilla on huomattava antitromboottinen teho, joka on selvästi suurempi kuin tähän saakka tunnetuilla pienimolekyylisillä inhibiittoreilla.

Keksintö koskee myös diagnostisia ja terapeuttisia aineita, joilla on antitromboottinen vaikutus ja jotka sisältävät edellä kuvattuja inhibiittoreita, sekä näiden yhdisteiden käyttöä diagnostisina aineina tai menetelmässä sellaisen lääkkeen valmistamiseksi, jolla on tromboosia ehkäisevä vaikutus.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä tarkemmin:

Esimerkki 1

ß-naftyylisulfonyyliatsaglysyyli-D-p-amidinofenyylialanyylipiperididi

1. Boc-D-syaanifenyylialanyylipiperididi

Seos, joka sisälsi 50 g (255 mmol) p-syaanibentsyylibromidia, 55 g (255 mmol) asetamidomalonihapon dietyyliesteriä ja 2 g kaliumjodidia 250 ml:ssa vedetöntä dioksaania, kuumennettiin kiehuvaksi. Siihen lisättiin pisaroittain 3 tunnin aikana vastavalmistettu liuos, joka sisälsi 6 g (260 mmol) natriumia etanolissa. 3 tunnin lisärefluksoinnin jälkeen seos jäähdytettiin 80 °C:seen ja siihen lisättiin 3 tunnin aikana 170 ml 3 N natriumhydroksidia. Seos kuumennettiin 95 °C:seen 4 tunnin ajaksi. Jäähdytyksen jälkeen pH säädettiin 6 N HCl:lla arvoon 1 ja dioksaani haihdutettiin pois. Mahdollisesti syntynyt sakka pois-

tettiin suodattamalla. pH säädettiin natriumhydroksidilla arvoon 9 ja liuos uutettiin kahdesti etyyliasetaatilla. Vesifaasin pH säädettiin suolahapolla uudelleen arvoon 1, jolloin N-asetyylisyaanifenyylialaniini kiteytyi liuoksesta. Kiteet kerättiin talteen, pestiin useaan kertaan vedellä ja kuivattiin suuressa alipaineessa.

Saanto: 47 g (79,2 % teoreettisesta)

Puhtauden tarkistus (TLC): R_f = 0,5 (kloroformi-metanoli-jääetikkaseos tilavuussuhteessa 50:10:2,5)

24 g tätä tuotetta liuotettiin 3 N natriumhydroksidia lisäten 3 litraan vettä ja liuoksen pH säädettiin arvoon 6 - 6,5. Siihen lisättiin 500 mg asylaasia ja seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 4 vuorokautta. Asylaasi poistettiin sitten liuoksesta ultrasuodatuksella, ja sen jälkeen liuos väkevöitiin 1 litran tilavuuteen. Sen jälkeen kun pH oli säädetty arvoon 1, liuos uutettiin useaan kertaan etyyliasetaatilla. Orgaaninen faasi pestiin pienellä määrällä väkevää natriumkloridiliuosta ja kuivattiin natriumsulfaatilla, ja liuotin haihdutettiin pois. Saatiin 8,2 g N-asetyyli-D-syaanifenyylialaniinia (82 % teoreettisesta).

8 g:aan tätä yhdistettä lisättiin 22 ml jääetikkaa ja 4,3 ml väkevää suolahappoa yhdessä 40 ml:n kanssa vettä, ja seoksen annettiin kiehua 24 tuntia. Sen jälkeen kun suojauksenpoistoliuos oli haihdutettu pois ja kiinni tarttuneet hapon jäänteet poistettu vielä metanolin avulla, tuote kiteytettiin uudelleen metanoli-dietyylieetteriseoksesta.

Saanto: 6,6 g (85 % teoreettisesta)

5 g D-syaanifenyylialaniinihydrokloridia liuotettiin 14 g:aan vettä lisäten samalla 7,5 ml di-isopropyylietyyliamiinia. Tähän liuokseen lisättiin liuos, joka sisälsi 6 g t-butyylioksikarbonyylioksi-imino-2-fenyyliasetonitriiliä 17 ml:ssa dioksaania, ja seosta sekoitettiin yön yli. Lisättiin 40 ml vettä ja 50 ml etyyliasetaattia. Vesifaasi erotettiin ja orgaaninen faasi uutettiin vielä

kerran 1 M kaliumvetykarbonaatilla. Yhdistetyt vesifaasit pestiin vielä kerran 10 ml:lla dietyylieetteriä, jonka jälkeen pH säädettiin suolahapolla arvoon 3. Vesifaasi uutettiin kolmesti etyyliasetaatilla, ja orgaaninen faasi pestiin natriumkloridiliuoksella ja kuivattiin natriumsulfaatilla. Liuottimen pois haihduttamisen jälkeen saatiin 5,6 g (78 % Boc-D-syaanifenyylialaniinia).

3,26 g (10 mmol) Boc-D-syaanifenyylialaniinia, 1,49 g (11 mmol) HOBt:tä ja 2,42 g (12 mmol) DCCI:tä liuotettiin 50 ml:aan DMF:ää ja liuosta sekoitettiin 1 tunti. Lisättiin 1 ml piperidiiniä ja seosta sekoitettiin yön yli. Saostunut disykloheksyyliurea poistettiin suodattamalla, DMF tislattiin pois ja jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin. Liuos pestiin kolmesti kaliumvetykarbonaatilla, kolmesti 1 M kaliumvetysulfaatilla ja kolmesti kylläisellä natriumkloridiliuoksella. Sen jälkeen kun orgaaninen faasi oli kuivattu natriumsulfaatilla ja liuotin tislattu pois, saatiin 3,16 g (80 %) Boc-D-syaanifenyylialanyylipiperididiä.

Puhtauden tarkistus (TLC): R_f = 0,27 (kloroformi)

2. D-syaanifenyylialanyylipiperidiinihydrokloridi

3 g Boc-suojattua yhdistettä liuotettiin 50 ml:aan jääetikkaa, joka sisälsi 1,2 mmol HCl:a/ml, ja liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Suojausryhmän lohkaisureagenssi tislattiin pois alipaineessa, sen jäänteet poistettiin tolueenin avulla ja jäännös jauhettiin hienoksi pienen dietyylieetterimäärän kanssa. Kiteet kerättiin talteen ja kuivattiin alipaineessa.

Saanto: 2,2 g

3. Boc-atsaglysyyli-D-syaanifenyylialanyylipiperididi

2,08 g (7 mmol) Boc-atsaglysiini-p-nitrofenyyliesteriä ja 2,06 g (7 mmol) syaanifenyylialanyylipiperididiä liuotettiin 50 ml:aan DMF:ää. Sen jälkeen kun oli lisätty 2,4 ml (14 mmol) di-isopropyylietyyliamiinia, seosta

sekoitettiin huoneenlämpötilassa pimeässä 1 vuorokausi. Liuotin tislattiin pois alipaineessa, jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin ja liuos pestiin kolmesti 1 M kaliumvetysulfaattiliuoksella, kolmesti kaliumvetykarbonaattiliuoksella ja kahdesti väkevällä natriumkloridiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla ja liuotin haihdutettiin pois. Jäännöstä sekoitettiin di-isopropyylieetterin kanssa, ja kiteet kerättiin talteen ja kuivattiin. Saatiin 2,29 g Boc-atsaglysyyli-D-syaanifenyylialanyylipiperididiä.

4. ß-naftyylisulfonyyliatsaglysyyli-D-syaanifenyylialanyylipiperididi

2,08 g (5 mmol) Boc-atsaglysyyli-D-syaanifenyylialanyylipiperididiä liuotettiin 50 ml:aan jääetikkaa, joka sisälsi 1,2 mmol HCl:a/ml, ja liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Sen jälkeen kun suojauksenpoistoaine oli haihdutettu pois ja sen jäänteet poistettu tolueenin avulla alipaineessa, jäännös jauhettiin hienoksi eetterin kanssa ja kiteet kerättiin talteen. Kiteet liuotettiin 50 ml:aan dikloorimetaania lisäten samalla 1,7 ml (10 mmol) di-isopropyylietyyliamiinia. Liuokseen lisättiin 1,134 g ß-naftyylisulfonyylikloridia ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin tislattiin pois, jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin ja liuos pestiin kolmesti 1 M kaliumvetysulfaattiliuoksella, kolmesti kaliumvetykarbonaattiliuoksella ja kahdesti väkevällä natriumkloridiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla ja liuotin haihdutettiin pois. Saatiin 1,75 g ß-naftyylisulfonyyliatsaglysyyli-D-syaanifenyylialanyylipiperididiä.

5.ß-naftyylisulfonyyliatsaglysyyli-D-amidinofenyylialanyylipiperididi

1 g vaiheessa 4 saatua yhdistettä liuotettiin 30 ml:aan kuivaa pyridiiniä ja, sen jälkeen kun oli lisätty 1 ml trietyyliamiinia, liuokseen johdettiin 3 tunnin

ajan vetysulfidikaasua. Seos jätettiin kolmeksi vuorokaudeksi seisomaan huoneenlämpötilaan, jonka jälkeen se kaadettiin jään (100 g) ja väkevän suolahapon (50 ml) seokseen. Sakka erotettiin imusuodattamalla ja pestiin vedellä. Kuivauksen jälkeen tioamidi liuotettiin 50 ml:aan asetonia ja liuokseen sekoitettiin 1,5 ml metyylijodidia. Seosta refluksoitiin 30 minuuttia. Jäähdytyksen jälkeen tehtiin saostus dietyylieetterillä. Sakka liuotettiin dikloorimetaaniin ja liuos pestiin kahdesti vedellä. Sen jälkeen kun orgaaninen faasi oli kuivattu natriumsulfaatilla ja liuotin poistettu, jäännös liuotettiin 30 ml:aan kuivaa metanolia ja liuokseen lisättiin 200 mg ammoniumasetaattia. Se kuumennettiin 60 °C:seen 3 tunniksi. Liuotin haihdutettiin pois alipaineessa. Tuote puhdistettiin kromatografisesti Sephadex^{R} LH-20:llä käyttäen eluenttina metanolia.

Saanto: 590 mg

Puhtauden tarkistus: sulamispiste 182 °C; TLC: R_f = 0,48 (kloroformi-metanoli-jääetikkaseos tilavuussuhteessa 50:10:2,5)

Identiteetin tarkistus: määritetty moolimassa (pommitus nopeilla atomeilla) 523 $(M^+ + H)^+$

Esimerkki 2

Pmc-atsaglysyyli-D-p-amidinofenyylialanyylipiperididi

Vaiheet 1 - 3 ovat samat kuin edellisessä esimerkissä.

4. Pmc-atsaglysyyli-D-syaanifenyylialaniinipiperididi

1,67 g (4 mmol) Boc-atsaglysyyli-D-syaanifenyylialanyylipiperididiä liuotettiin 50 ml:aan jääetikkaa, joka sisälsi 1,2 mmol HCl:a/ml, ja liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Sen jälkeen kun suojauksenpoistoaine oli haihdutettu pois ja sen jäänteet poistettu tolueenin avulla alipaineessa, jäännös jauhettiin hienoksi

eetterin kanssa ja kiteet kerättiin talteen. Kiteet liuotettiin 50 ml:aan dikloorimetaania lisäten samalla 1,36 ml (8 mmol) di-isopropyylietyyliamiinia. Liuokseen lisättiin 1,35 g Pmc-kloridia ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Liuotin tislattiin pois, jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin ja liuos pestiin kolmesti 1 M kaliumvetysulfaattiliuoksella, kolmesti kaliumvetykarbonaattiliuoksella ja kahdesti väkevällä natriumkloridiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla ja liuotin haihdutettiin pois. Saatiin 1,95 g Pmc-atsaglysyyli-D-syaanifenyylialanyylipiperididiä.

5.Pmc-atsaglysyyli-D-amidinofenyylialanyylipiperididi

1,5 g vaiheessa 4 saatua yhdistettä liuotettiin 30 ml:aan kuivaa pyridiiniä ja, sen jälkeen kun oli lisätty 1 ml trietyyliamiinia, liuokseen johdettiin 3 tunnin ajan vetysulfidikaasua. Seos jätettiin kolmeksi vuorokaudeksi seisomaan huoneenlämpötilaan, jonka jälkeen se kaadettiin jään (100 g) ja väkevän suolahapon (50 ml) seokseen. Sakka erotettiin imusuodattamalla ja pestiin vedellä. Kuivauksen jälkeen tioamidi liuotettiin 50 ml:aan asetonia ja liuokseen sekoitettiin 1,5 ml metyylijodidia. Seosta refluksoitiin 30 minuuttia. Jäähdytyksen jälkeen tehtiin saostus dietyylieetterillä. Sakka liuotettiin dikloorimetaaniin ja liuos pestiin kahdesti vedellä. Sen jälkeen kun orgaaninen faasi oli kuivattu natriumsulfaatilla ja liuotin poistettu, jäännös liuotettiin 30 ml:aan kuivaa metanolia ja liuokseen lisättiin 300 mg ammoniumasetaattia. Se kuumennettiin 60 °C:seen 3 tunniksi. Liuotin haihdutettiin pois alipaineessa. Tuote puhdistettiin kromatografisesti Sephadex^{R} LH-20:llä käyttäen eluenttina metanolia.

Saanto: 990 mg

Puhtauden tarkistus: sulamispiste 149 - 155 °C (sintrautui, asetaattisuola); TLC: R_f = 0,52 (kloroformi-metanoli-jääetikkaseos tilavuussuhteessa 50:10:2,5)

Trombiinin inhibition IC_{50}-arvon määritys

Yhdisteitä inkuboitiin kasvavina pitoisuuksina ihmisen trombiinin kanssa 0,1 M Tris-HCl-puskurissa, joka sisälsi 0,15 mol NaCl:a/litra ja jonka pH oli 8,2. Tunnin kuluttua käynnistettiin entsymaattinen reaktio lisäämällä Chromozym^R TH -substraattia (Tos-Gly-Pro-arg-pNA, 5 x 10^{-5} mol/l). Tunnin kuluttua mitattiin pNA:n vapautuminen fotometrillä optisen tiheyden kasvuna aallonpituudella 405 nm. IC_{50}-arvoksi ilmoitetaan se inhibiittorin pitoisuus, joka sai aikaan entsyymiaktiivisuuden pienenemisen 50 %:lla (100 % vastaa inhiboimatonta entsyymireaktiota).

KI-arvon määritys trombiinille

Edellä mainittua trombiiniliuosta käyttäen määritettiin KI-arvot tutkituille yhdisteille. Sitä varten trombiinia inkuboitiin sellaisen inhibiittoripitoisuuden kanssa, joka vastasi suunnilleen edellä mainitussa testissä määritettyä IC_{50}-arvoa. Reaktio käynnistettiin erilaisilla pitoisuuksilla Chromozym TH -substraattia (0,7 x 10^{-5} - 4,5 x 10^{-4} mol/l). Inhibition tyyppi ja KI-arvo selvitettiin Lineweaverin ja Burkin esittämällä menetelmällä [J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 658 - 666].

Taulukko 1

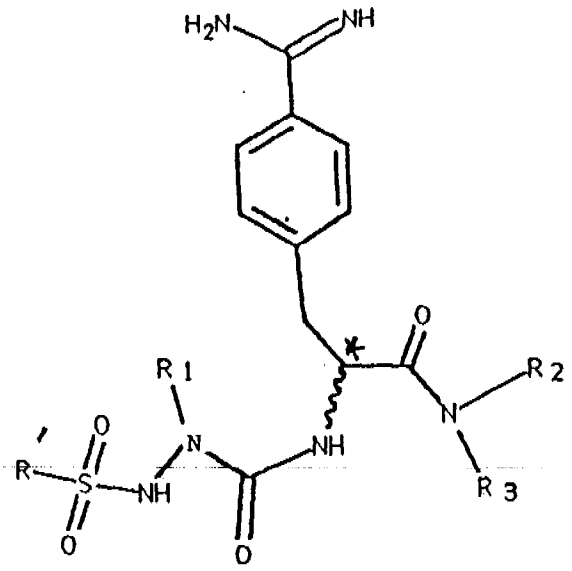
Yhdiste	**Trombiinin inhibitio**	
	IC_{50} (mol/l)	**KI (mol/l)**
Pmc-Gly-Aph-Pip	1,4 x 10^{-9}	1,3 x 10^{-9}
Nas-AGly-Aph-Pip	1,3 x 10^{-9}	2,6 x 10^{-9}
Pmc-AGly-Aph-Pip	1,6 x 10^{-12}	9,2 x 10^{-11}
NAPAP	2,8 x 10^{-9}	1,4 x 10^{-8}

Lyhenteitä:

Boc	t-butyylioksikarbonyyli
TLC	ohutkerroskromatografia
R_f	retentiokerroin
HOBt	hydroksibentsotriatsoli
DCCI	disykloheksyylikarbodi-imidi
DMF	dimetyyliformamidi
Pmc	2,2,5,7,8-pentametyylikromaani-6-sulfonyyli

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä sellaisen yhdisteen valmistamiseksi, joka vastaa kaavaa (I),



(I)

jossa

R' on naftyyli- tai fenyyliryhmä, joka voi olla substituoitu 1 - 3 alkoksyyliryhmällä, jotka sisältävät korkeintaan 3 C-atomia, tai korkeintaan viidellä alkyyliryhmällä, jotka sisältävät 1 tai 2 C-atomia, tai kromaaniryhmä, joka voi olla substituoitu korkeintaan viidellä metyyliryhmällä,

R^1 on vety, alempi alkyyliryhmä, joka sisältää korkeintaan 4 C-atomia, hydroksialkyyliryhmä, aryylialkyyliryhmä, joka sisältää korkeintaan 7 C-atomia, tai karboksialkyyliryhmä, joka sisältää korkeintaan 4 C-atomia,

kumpikin ryhmistä R^2 ja R^3, jotka voivat olla samoja tai erilaisia, on korkeintaan 4 C-atomia sisältävä alkyyliryhmä, jolloin R^2 ja R^3 voivat muodostaa yhdessä typpiatomin kanssa renkaan, joka voi olla substituoitu karboksyyliryhmällä, hydroksyyliryhmällä tai hydroksialkyyliryhmällä, joka sisältää korkeintaan 3 C-atomia, ja

tähdellä (*) merkityllä asymmetriakeskuksella on R- tai S-rakenne, edullisesti R-rakenne;

t u n n e t t u siitä, että hydratsiinijohdannaisen, jonka kaava on R'-SO_2-NH-NHR^1, jossa R':lla ja R^1:llä on kaavan I yhteydessä ilmoitettu merkitys, annetaan reagoida karbonylointiaineen kanssa liuoksessa ja saatavan reaktiotuotteen annetaan reagoida p-amidinofenyylidialkyyliamidin kanssa, jossa alkyyliryhmillä tarkoitetaan kaavassa I ryhminä R^2 ja R^3 kysymykseen tulevan kaltaisia alkyyliryhmiä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että karbonylointiaineena käytetään kloorimuurahaishapon p-nitrofenyyliesteriä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdiste, jossa R' on ß-naftyyliryhmä, R^1 on vety ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä piperidiinirenkaan.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on 2,2,5,7,8-pentametyylikromaanirengas, R^1 on vety ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä piperidiinirenkaan.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on ß-naftyyliryhmä, R^1 on -CH_2-COOH ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä piperidiinirenkaan.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on ß-naftyyliryhmä, R^1 on metyyliryhmä ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä piperidiinirenkaan.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on 6,7-dimetoksi-ß-naftyyliryhmä, R^1 on vety ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä piperidiinirenkaan.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on 5-metoksi-α-naftyyli-

ryhmä, R^1 on metyyliryhmä ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä piperidiinirenkaan.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on ß-naftyyliryhmä, R^1 on vety ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä 3-piperidinyyliryhmän.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on 5,6,7,8-tetrahydro-ß-naftyyliryhmä, R^1 on $-CH_2-COOH$ ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä piperidiinirenkaan.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on metoksitrimetyylifenyyliryhmä.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R' on pentametyylifenyyliryhmä, R^1 on vety ja R^2 ja R^3 muodostavat yhdessä piperidiinirenkaan.

Hak.n:o 921525

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

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

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

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

Käännä Vänd

EP 236163 ja 236164 Corr 121/78

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

19.05.92

Allekirjoitus