



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

85582

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 11 05 1988
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07C 211/24

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	870139
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	14.01.87
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	14.01.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	15.07.87
(44) Nähtävöksiäminen ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
14.01.86 US 818848 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Merrell Dow Pharmaceuticals Inc., 2110 East Galbraith Road, Cincinnati, Ohio, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Kolb, Michael, 16 Rue du Kochersberg, Truchtersheim, France, (FR)
2. Kendrick, David A., 14 Rue du Canal, Illkirch Graffenstaden, France, (FR)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

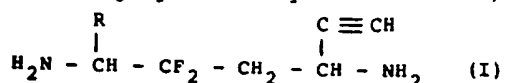
Menetelmä terapeuttisesti aktiivisen fluoratun diaminoalkyynijohdannaisen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett terapeutiskt aktivt fluorerat diaminoalkynderivat

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 4139563 (C 07C 87/24), US A 4421768 (A 61K 31/13)

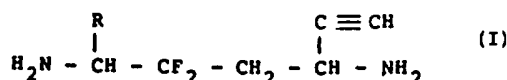
(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee uusia fluorattuja diami-
noalkyynijohdannaisia, jotka ovat orni-
tiinidekarboksylaasientsyymin inhibiit-
toreita ja joilla on yleinen kaava I,



jossa R on C₁₋₄-alkyyli tai, edulli-
sesti, vety. Keksintö koskee edelleen
menetelmää yhdisteiden valmistamiseksi.

Uppfinningen avser nya fluorerade di-
aminoalkynderivat, vilka utgör inhibito-
rer av ornitindekarboxilasenzym och har
den allmänna formeln I,



vari R är C₁₋₄-alkyl eller företrädesvis
väte. Uppfinningen avser vidare ett för-
farande för framställning av dessa före-
ningar.

Menetelmä terapeutisesti aktiivisen fluoratun diaminoalkyynijohdannaisen valmistamiseksi

5 Tämä keksintö koskee menetelmää uuden farmaseuttisesti käyttökelpoisen fluoratun diaminoalkyynijohdannaisen ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi. Tämä yhdiste on polyamiinien muodostukseen organismeissa osallistuvan dekarboksylaasientsyymin (ornitiinidekarboksylaasin) inhibiittori.

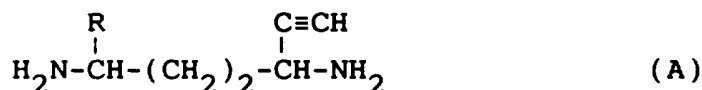
10 Ornitiinin dekarboksyloituminen putreskiiniksi, ornitiinidekarboksylaasientsyymin (ODC) katalysoima reaktio, on ensimmäinen vaihe polyamiinien spermiini ja spermiini biosynteesissä. Spermiiniä muodostuu aktivoituneen aminopropyyli-ryhmän siirtyessä S-adenosyyli-S-metyylihomokysteamiinista putreskiiniin, kun taas spermiiniä muodostuu toisen aminopropyyli-ryhmän siirtyessä spermiiniin. S-adenosyyli-S-metyylihomokysteamiinia muodostuu S-adenosyyylimetioniinin (SAM) dekarboksylaatioissa, reaktiossa, jota katalysoi S-adenosyyylimetioniinidekarboksylaasientsyymi (SAM-DC).

20 Polyamiinien, joita esiintyy eläinkudoksissa ja mikro-organismeissa, tiedetään olevan tärkeässä osassa solujen kasvussa ja proliferaatiossa. Solujen kasvun ja proliferaation alkamiseen liittyy sekä huomattava ODC-aktiivisuuden kasvu että putreskiinin ja polyamiinien pitoisuuden kasvu. Vaikka ei tarkasti tiedetä mekanismia, jolla polyamiinit osallistuvat solujen kasvuun ja proliferaatioon, näyttää siltä, että polyamiinit saattavat edistää makromolekyyliprosesseja, kuten DNA-, RNA- tai proteiinisynteesiä. Polyamiinitasojen tiedetään olevan korkeita alkio-kudoksessa, kiveksissä, mahanpuoleisissa eturauhasissa ja kateenkorvassa, kasvainkudoksessa, ihon psoriasisvaurioalueilla, ja muissa nopeasti kasvavissa tai lisääntyvissä soluissa.

35 Koska putreskiini on sekä spermiinin että spermiinin esiaste, ornitiinin muuttumisen putreskiiniksi es-

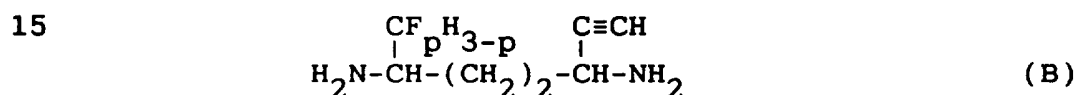
tämisen esimerkiksi ODC:n inhibition kautta pitäisi estää näiden polyamiinien synteesi ja saada siten aikaan suotuisia fysiologisia vaikutuksia.

Olemme julkistaneet US-patenttijulkaisussa 4 139 563 sen tiedon, että mm. yhdisteet, joilla on kaava



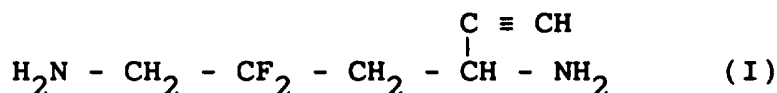
jossa R on vety tai C₁₋₄-alkyyli, ovat ornitiinidekarboksylaasin inhibiittoreita.

Lisäksi olemme US-patenttijulkaisussa 4 421 768 julkistaneet tiedon, että yhdisteet, joilla on kaava

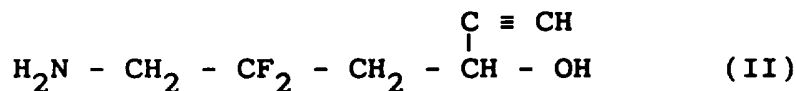


jossa p on 1 tai 2, ovat myös ornitiinidekarboksylaasin inhibiittoreita.

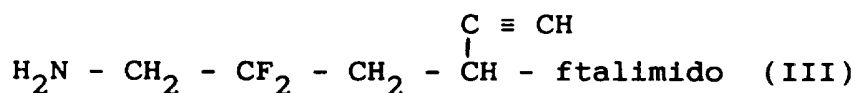
Tämä keksintö koskee menetelmää yhdisteen valmistamiseksi, jolla on kaava



eli 1,4-diamino-2,2-difluoriheks-5-yydin tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän happoadditiosuolan valmistamiseksi, jossa menetelmässä vastaavan alkoholin, jolla on kaava



aminosuojattua johdannaista käsitellään ftalimidillä, jolloin saadaan yhdiste, jolla on kaava



minkä jälkeen ftalimidoryhmä muutetaan sinänsä tunnetulla tavalla primaariseksi aminoryhmäksi, jolloin saadaan kaavan I mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

Kaavan I mukainen yhdiste inhiboi ornitiinidekarboksylaasientsyymiä (ODC) in vitro ja in vitro ja saa aikaan putreskiini- ja spermidinipitoisuuksien alenemisen soluissa, joissa tapahtuu polyamiinien aktiivista biosynteesiä. Yhdisteen hiiliketju on substituoitu kahdella fluoriatomilla ketjunsisäisesti. Edellä esitetystä julkaisuista tunnetut yhdisteet ovat joko fluorittomia (US-patenttijulkaisu 4 139 563) tai sisältävät fluoriatomin terminaalisisessä hiiliatomissa (US-patenttijulkaisu 4 421 768). Uskotaan, että ketjunsisäinen fluoraus saa aikaan kaavan I mukaisen yhdisteen tehokkaan sitoutumisen entsyymiin substraattina, jolloin se inhiboi entsyymin vaikutusta. Kaavan I mukainen yhdiste on siten käyttökelpoinen epätoivottavan solujen kasvun tai proliferaation torjumiseen nisäkkäissä. Tämä yhdiste on käyttökelpoinen farmakologinen aine sellaisten sairauksien tai tilojen hoitoon, joille tiedetään olevan luonteenomaista korkea ODC-aktiivisuus. Yhdiste on erityisesti hyödyllinen systeemisesti käytettynä estämään kasvainkudosten kasvua nisäkkäissä, eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun hoitoon ja torjumaan patogeenisten loisalkueläinten kasvua infektoituneissa kotieläimissä ja ihmisissä.

Kaavan I mukaista yhdistettä voidaan käyttää myös tutkittaessa ODC-inhibition esiintymistä ja fysiologista toimintatapaa biologisissa järjestelmissä ja sen suhdetta patologiisiin prosesseihin.

Ymmärrettäneen, että kaavan I mukaisen yhdisteen aminoryhmä voi olla substituoitu millä tahansa ryhmällä, jonka tiedetään olevan lohkaistavissa in vivo (entsymaat-

tisesti tai kemiallisesti), jolloin muodostuu vapaa aminoryhmä. Yhdisteet, jotka sisältävät tällaisia lohkeavia substituentteja, ja jotka ovat siten in vivo muutettavissa kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi, ovat ekvivalenttisia kaavan I mukaisen yhdisteen kanssa tämän keksinnön tarkoituksiin. Tällaisia johdannaisia voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla. Eräs tässä yhteydessä edullinen johdannainen on N-glutamyylijohdannainen.

Näiden yhdisteiden ODC-aktiivisuus voidaan määrittää in vitro Metcalfin et al. [J. Am. Chem. Soc. 100 (1978) 2551] kuvaamalla tavalla. Kaavan I mukaisen yhdisteen ODC-aktiivisuus voidaan määrittää in vivo C. Danzinin menetelmällä [Biochemical Pharmacology 28 (1979) 627].

Valaiseviin esimerkkeihin tämän keksinnön mukaisesti valmistettavan yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttävistä suoloista kuuluvat myrkyttömät happoadditiosuolat, joita muodostavat epäorgaaniset hapot, kuten vetykloridi-, vetybromidi-, rikki- ja fosforihappo, tai orgaaniset hapot, kuten orgaaniset karboksyylihapot, esimerkiksi salisyili-, maleiinimaloni-, viini-, sitruuna- ja askorbiinihappo, ja orgaaniset sulfonihapot, esimerkiksi metaanisulfonihappo.

Otaksutaan, että keksinnön mukaisesti valmistettava yhdiste on ornitiinidekarboksylaasin "substraatin indusoima irreversiibeli inhibiittori". Tällaiset inhibiittorit tunnetaan alalla myös "entsyymin aktivoimina irreversiibeleinä inhibiittoreina", "itsemurhaentsyymi-inhibiittoreina", " K_{cat} -inhibiittoreina" tai "mekanismiin perustuvina inhibiittoreina". Jotta yhdiste olisi substraatin indusoima irreversiibeli entsyymi-inhibiittori, tulee sen olla substraatti kohde-entsyymille ja sisältää latentti reaktiivinen ryhmä, joka on altis menettämään suojauksensa entsyymin normaalin katalyyttisen toiminnan seurauksena. Latentin reaktiivisen ryhmän suojauksen poistuminen entsyymin vaikutuksesta muodostaa reaktiivisen funktionaalisen ryhmän, joka alkyloi entsyymin aktiivisessa kohdassa

esiintyvän nukleofiilisen ryhmän. Inhibiittorin ja entsyymin välille syntyy siten aktiiviseen kohtaan kovalenttinen sidos, mikä johtaa entsyymin irreversiibeliin inaktivoitumiseen. Tällaiset inhibiittorit ovat äärimmäisen spesifisiä, sillä inhibiittorin täytyy olla kohde-entsyymin substraatti, ja vaaditaan inhibiittorin biologista muuttumista kohdeentsyymin vaikutuksesta, ennen kuin entsyymi inaktivoituu. Vaikka otaksutaan, että yleiskaavan I mukainen yhdiste yleensä toimii substraatti-indusoidulla mekanismilla, voi inhibitio tapahtua muillakin mekanismeilla, kuten kompetitiivisen inhibition kautta.

Termi "kasvainkudos" tarkoittaa tässä yhteydessä käytettynä sekä hyvä- että pahanlaatuisia kasvaimia ja siihen sisältyvät leukemiat, lymfoomat, melanoomat ja sarkoomat. Termillä "kasvainkudoksen kasvun kontrollointi" tarkoitetaan tässä yhteydessä käytettynä nopeasti lisääntyvän kasvaimen kasvun hidastamista, keskeyttämistä salpaamista tai pysäyttämistä vaihtolämpöisessä eläimessä. Tulisi ymmärtää, ettei kaavan I mukaisen yhdisteen antaminen saa aikaan "parantumista" kasvaimesta siinä mielessä, että kasvainkudos tuhoutuisi tai eliminoituksi kokonaan hoidettavasta eläimestä.

Kaavan I mukaista yhdistettä voidaan antaa potilaalle kasvainkudosten kasvun kontrolloimiseksi muiden hoitomenetelmien yhteydessä tai yhdistettynä sytotoksisiin lääkkeisiin, joiden tiedetään olevan käyttökelpoisia syövän kemoterapiaan. Kaavan I mukaista yhdistettä voidaan antaa esimerkiksi kasvaimen kirurgisen poiston, sädehoidon, hormonihoidon, immunoterapian tai paikallisen lämpöhoidon yhteydessä. Lisäksi, ja edullisesti, kaavan I mukaista yhdistettä voidaan antaa potilaalle yhdistettynä kemialliseen sytotoksiseen aineeseen, jonka tiedetään olevan käyttökelpoinen kasvainten kemoterapiaan. Kun tällaista yhdistelmähoitoa käytetään kasvaimen hoitoon, voidaan kemoterapeuttista syöpälääkettä antaa annoksena, jonka tiedetään olevan tehokas kasvaimen hoitoon. Kaavan I mu-

kainen yhdiste voi kuitenkin saada aikaan additiivisen tai synergistisen vaikutuksen kemoterapeuttisen aineen kanssa kyseessä olevaa kasvainta vastaan. Käytettäessä kasvaimen vastaista yhdistelmähoitoa voi annettavan kemoterapeuttisen aineen annostus siten olla pienempi kuin käytettäessä tätä ainetta yksinään. Kemoterapeuttista ainetta voidaan kaavan I mukaiseen yhdisteeseen yhdistettynä siten antaa pienempinä annoksina tai harvemmin kuin yksinään käytettävää kemoterapeuttista ainetta.

10 Mitä tahansa kemoterapeuttista syövänvastaista ainetta voidaan käyttää yhdistettynä kaavan I mukaiseen yhdisteeseen. Syövän kemoterapiaan yleisesti käytettäviä lääkkeitä kuvataan julkaisussa The Medical Letter, 22, nro 24 (Issue 571), 28. marraskuuta 1980, julk. The Medical Letter, Inc., New Rochelle, N.Y., 10801. Valaisevia esimerkkejä sytotoksisista kemoterapeuttisista aineista ovat syklofosfamidi, metotreksaatti, prednisoni, 6-merkaptopuriini, prokarbatsiini, daunorubisiini, vinkristiini, vindesiini, vinblastiini, klorambusiili, sytosiiniarabinosidi, 6-tioguaaniini, tio-TEPA, 5-fluoriurasiili 5-fluori-2-deoksiuridiini, 5-atsasytidiini, typpisinappi, 1,2-bis(2-kloorietyyli)-1-nitrosourea (BCNU), 1-(2-kloorietyyli)-3-sykloheksyyli-1-nitrosourea (CCNU), busulfaani, adriamysiini, bleomysiini, sykloleusiini ja metyyliiglyoksaalibis(guanyylihydratsoni) MGBG). Muut syövän kemoterapia-aineet ovat alan ammattihiehille tuttuja.

Kaavan I mukaisen yhdisteen nopeasti lisääntyvän kasvainkudoksen kasvunopeutta kontrolloiva vaikutus voidaan todeta tavanomaisissa eläinkasvainmalleissa oraalisen tai parenteraalisen annon jälkeen. Kasvainten vastaiset vaikutukset voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavilla malleilla: (a) L1210-leukemia hiirissä, (b) EMT 6-kasvain Balb/c-hiirissä, (c) 7,12-dimetyyllibentsantraseeni-indusoitu (DMBA-indusoitu) rintasyöpä rotissa tai (d) Morris 7288 C tai 5123 -hepatooma Buffalo-rotissa. Kemoterapeut-

tisiin aineisiin yhdistetyn yhdisteen kasvainten vastaiset vaikutukset voidaan myös osoittaa eläinmalleilla.

Kun pahanlaatuisen kasvainsairauden hoidossa annetaan kaavan I mukaista yhdistettä yhdessä kemoterapeuttisin aineen kanssa, voi kemoterapeuttisen aineen terapeuttinen vaikutus vahvistua, niin että kemoterapeuttisen aineen aikaansaama remissio voi edistyä ja kasvainkudoksen uudelleenkasvu hidastua tai estyä. Tällainen yhdistelmähoidon käyttö mahdollistaa siten kemoterapeuttisen aineen käytön pienempinä annoksina tai harvemmin annettavina yksittäisannoksina. Siten minimoidaan kemoterapeuttisen aineen haitalliset ja/tai heikentävät sivuvaikutukset parantaen samalla kasvainten vastaisia vaikutuksia. Termillä "yhdistelmähoito" tarkoitetaan kaavan I mukaisen yhdisteen antamista välittömästi ennen kemoterapian aloittamista, samanaikaisesti kemoterapian kanssa tai kemoterapian lopettamista tai keskeyttämistä välittömästi seuraavana ajanjaksona.

Kun kemoterapia johtaa kasvaimen remissioon eivätkä kaikki kasvainsolut tuhoudu, voidaan kasvaimen uudelleenkasvua estää tai hidastaa määräämättömän pitkän aikaa jatkamalla hoitoa kaavan I mukaisella yhdisteellä. Siten kaavan I mukaista yhdistettä voidaan antaa kasvaimen kasvun pysäyttämiseksi tai hidastamiseksi sellaisina ajanjaksoina, joina kemoterapia sytotoksisella aineella saattaa olla tilapäisesti keskeytyksissä.

Edullinen sytotoksinen aine käytettäväksi yhdistelmähoidossa kaavan I mukaisen yhdisteen kanssa on metyyli-glyoksaalibis(guanyylihydratsoni), josta käytetään tässä lyhennettä MGBG ja joka myös on S-adenosyyylimetioniinidekarboksylaasin inhibiittori. MGBG:n aktiivisuus kemoterapeuttisena aineena kasvainsairauksien hoidossa on hyvin dokumentoitua. Esimerkiksi W.A Knightin et al. mukaan [Cancer Treat. Rep. 43 (1979) 1933] MGBG-annos annettuna laskimonsisäisesti kerran tai kahdesti viikossa potilail-

le, joilla on pitkälle edennyt virtsarakko-, ruokatorvi-, keuhko-, haima-, paksusuoli-, munuais-, rinta- ja eturauhassyöpä, jyväsolkarsinooma, adenokarsinooma, lymfooma, hepatooma, melanooma, leukemia tai Edwingin sarkooma, sai aikaan mitattavissa olevan kasvaimen regressi-
5 monissa hoidetuista potilaista ja sairauden täydellisen katoamisen kahdessa hoidetuista 65 potilaasta.

Annettava MGBG-määrä voi olla alalla kasvainten hoitoon tehokkaaksi tiedetty määrä. Lääkäri määrittää te-
10 hokkaat ja myrkyttömät annostukset kussakin tapauksessa ottaen huomioon kunkin potilaan tilan. Voidaan esimerkiksi infusoida annos $250 - 500 \text{ mg/m}^2$ ruumiin pinta-alaa 100 ml:ssa 5-8:ista dekstroosin vesiliuosta 30 min:n aikana kerran tai kahdesti viikossa. Yhdistelmähoito kaavan I
15 mukaisen yhdisteen kanssa parantaa kasvainkudoksen vastetta MGBG:n sytotoksiselle vaikutukselle ja mahdollistaa pienempien MGBG-yksittäisannosten käytön ja hoidon lyhyem-
män keston verrattuna pelkän MGBG:n käyttöön.

Sopiva annostus kaavan I mukaista yhdistettä käy-
20 tettäväksi yhdistelmähoidossa yhdessä MGBG:n tai muiden syövän kemoterapia-aineiden kanssa voi olla mikä tahansa määrä, joka estää riittävästi polyamiinibiosynteesiä kas-
vaimen kasvunopeuden kontrolloimiseksi tai paremman vas-
teen saavuttamiseksi yhdisteen yhteydessä annettavalle
25 sytotoksiselle aineelle.

Termillä "patogeenisten loisalkueläinten kasvua kontrolloiva" tarkoitetaan tässä käytettynä alkueläinten replikoitumisen hidastamista, keskeyttämistä, tukahdutta-
mista tai pysäyttämistä infektoituneessa isännässä. Kaavan
30 I mukainen yhdiste on käyttökelpoinen T.b. bruceita (joka aiheuttaa trypanosomiaasia karjassa), T.b. rhodesiensea (joka aiheuttaa unitautia ihmisessä), itiöloisia, esimer-
kiksi Eimeria tenellaa (joka aiheuttaa suolistokokkidioo-
sia siipikarjassa, esimerkiksi kanoissa, kalkkunoissa ja
35 ankoissa) ja plasmodien eksoerytrosyyttistä muotoa, esi-

merkiksi *Plasmodium falciparum* (joka aiheuttaa malariaa ihmisissä) vastaan.

5 Kaavan I mukaisen yhdisteen alkueläinten vastainen vaikutus voidaan osoittaa in vivo tai in vitro tavanomaisilla mikrobiologisilla testausmenetelmillä. Yhdisteen vaikutus *T.b. brucei* ja *T.b. rhodesiense* vastaan voidaan määrittää infektoiduissa hiirissä antamalla tutkittavaa yhdistettä rajoittamattomasti päivittäin (3 - 15 vrk infektoinnin jälkeen) liuoksena juomavedessä. Aktiivisuuden osoittaa eliniän pidentyminen (verrattuna hoitamattomiin vertailueläimiin) tai loisten poissaolo verestä. Yhdisteen itiöloisten vastainen vaikutus voidaan määrittää infektoiduissa kanoissa, esimerkiksi *E. tenella*lla infektoiduissa kanoissa, antamalla tutkittavaa yhdistettä päivittäin rajoittamattomasti (infektointia edeltävästä päivästä viidenteen infektoinnin jälkeiseen päivään) liuoksena juomavedessä. Umpisuolivauriot arvioidaan tavanomaisin vaurioiden arvostelumenettelyin. [katso Reid., Am. J. Vet. Res. 30 (1969) 447 ja Avian Coccidiosis, toim. P. Long, British Poultry Science. Ltd., Edinburgh]. Yhdisteen malarian vastainen vaikutus (*P. falsiparum*) voidaan määrittää tavanomaisella maljaviljelykokeella in vitro [katso K. Rieckmann, et al., Lancet 1 (1978) 2]. Malarian vastainen vaikutus voidaan määrittää myös erityisissä hiirikannoissa, jotka on infektoitu *P. berghei*n oksierytrosyyttisellä muodolla. Tässä kokeessa annetaan yhdistettä rajoittamattomasti juomavedessä aloittaen kaksi päivää ennen infektointia ja lopettaen 28 päivän kuluttua siitä. Aktiivisuutta mitataan kuolintapausten merkittävällä vähenemisellä vertailueläimiin nähden tai eliniän merkittävällä pitenemisellä.

10
15
20
25
30

Tämä keksinnön mukaisesti valmistettua yhdistettä voidaan antaa eri tavoin halutun vaikutuksen saavuttamiseksi. Yhdistettä voidaan antaa yksinään tai farmaseuttisten valmisteiden muodossa joko oraalisesti tai parenteraa-

35

lisesti, ihonalaisesti, laskimonsisäisesti tai intraperitoneaalisesti. Annettava uuden yhdisteen määrä vaihtelee ja voi olla mikä tahansa vaikuttava määrä. Annettava vaikuttava määrä yhdistettä voi potilaan, hoidettavan tilan ja anottavan mukaan vaihdella noin 5 mg:sta noin 500 mg:aan painokiloa kohden vuorokaudessa. Yhdisteen yksikköannokset voivat sisältää esimerkiksi noin 10 - 500 mg yhdisteitä ja sitä voidaan antaa esimerkiksi 1 - 4 kertaa vuorokaudessa.

Termiä "yksikköannosmuoto" käytetään tässä yhteydessä yhden tai useamman annoksen sisältävästä muodosta, joka sisältää jonkin määrän aktiivista aineosaa sekoitettuna tai muulla tavalla yhdistettynä laimennus- tai kanta- ja-aineeseen, jolloin mainittu määrä on sellainen että normaalisti tarvitaan yksi tai useampia ennalta määrättyjä yksiköitä yhteen terapeuttiseen antokertaan. Moniannosmuotojen, kuten nesteiden tai uritettujen tablettien, ollessa kyseessä mainittu ennalta määrätty yksikkö on osa moniannosmuodosta, kuten 5 ml (teelusikallinen) nesteen määrästä tai puolikas tai neljännes uritetusta tabletista.

Keksinnön mukaisesti valmistettua aktiivista yhdistettä käytetään normaalisti farmaseuttisina formulaatioita. Tällaisia formulaatioita valmistetaan farmasian alalla sinänsä tunnetulla tavalla ja ne sisältävät tavallisesti kaavan I mukaista aktiivista yhdistettä sekoitettuna tai muuten yhdistettynä farmaseuttisesti hyväksyttävään kanta- ja- tai laimennusaineeseen. Näiden formulaatioiden valmistamiseksi aktiivinen aine sekoitetaan tavallisesti kanta- jaan tai laimennetaan laimennusaineella tai suljetaan tai pakataan kapseliin, taskuun, pussiin, paperiin tai muuhun säiliöön. Kantaja tai laimennusaine voi olla kiinteä, puolikiinteä tai nestemäinen materiaali, joka toimii aktiivisen aineosan kantaja-, jatke- tai väliaineena. Soveltuvat kantajat tai laimennusaineet ovat sinänsä hyvin tunnettuja.

Formulaatiot voidaan tehdä enteraaliseen tai parenteraaliseen käyttöön soveltuviksi ja niitä voidaan antaa potilaalle tablettien, kapselien, peräpuikkojen, liuosten, suspensioiden tms. muodossa. Jäljempänä olevissa esimerkeissä annetaan valaisevia esimerkkejä soveltuvista farmaseuttisista formulaatioista.

Jos keksinnön mukaisessa menetelmässä jossakin kuvatuista reaktiovaiheista jokin reagenssi osallistuisi epätoivottavaan reaktioon kyseessä olevissa reaktio-olosuhteissa, suojataan aminoryhmä sinänsä tunnetulla tavalla liittämällä siihen sopiva suojausryhmä. Suojausryhmä valitaan ottaen huomioon kyseessä olevan reaktion luonne ja se, miten helppo suojausryhmä on poistaa vapaan aminoryhmän muodostamiseksi. Suojausryhmä voi olla esimerkiksi asyyli-ryhmä, esimerkiksi alempi alkanoyyli-ryhmä, esimerkiksi asetyyli-, propionyyli-, trifluoriasetyyli- tms. ryhmä; aroyyli-ryhmä, esimerkiksi bentsoyyli-, toluoyyli- tms. ryhmä; alempi alkoksikarbonyyli-ryhmä, esimerkiksi metoksikarbonyyli-, etoksikarbonyyli-, tert-butoksikarbonyyli- tms. ryhmä. Aminoryhmän molemmat vetyatomit voivat olla yhden suojausryhmän, esimerkiksi ftalyyli-ryhmän substituoimia. Suojausryhmät tuodaan yhdisteeseen sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi antamalla amiinin reagoida alemman alkanoyyli- tai aroyylikloridin, anhydridin, sulfonyylikloridin, tert-butoksikarbonyloksimino-2-fenyyliasetonitriilin $[(\text{BOC})_2\text{-O:n}]$ tai di-tert-butyylidikarbonaatin $[(\text{BOC})_2\text{O:n}]$ kanssa.

Suojausryhmän poistaminen halutun reaktion mentyä loppuun voidaan tehdä sinänsä tunnetulla, kyseessä olevalle suojausryhmälle soveltuvalla tavalla. Mainittu poisto on tavallisesti hydrolyyttinen lohkaus, jossa käytetään vahvaa orgaanista tai mineraalihappoa, kuten esimerkiksi trifluorietikkahappoa, vetykloridihappoa tms, tai se tehdään vetykloridikaasulla vedettömissä olosuhteissa. Sellaisen olosuhteiden, jotka pelkistävän tyydyttymättömän

sidoksen, tai reagenssien, kuten vetybromidihapon, jotka reagoivat tyydyttymättömän sidoksen kanssa, käyttöä tulee välttää. Käytettävät liuottimet valitaan suojausryhmän poistossa vallitsevien olosuhteiden mukaan. Esimerkiksi eettereitä, kuten esimerkiksi dietyylieetteriä voidaan käyttää vetykloridikaasun avulla tehtävässä lohkaisussa. Siinä tapauksessa, että on määrä suojata asetyleeniryhmä, on edullinen suojausryhmä trialkyyilisilyyliryhmä, erityisesti trimetyylisilyyliryhmä, joka on helppo tuoda yhdisteeseen antamalla vapaan asetyleenisen ryhmän reagoida trialkyyilisilyylikloridin kanssa. Trialkyyilisilyyliryhmä on helppo poistaa emäshydrolyysillä, jolloin asetyleeninen ryhmä vapautuu.

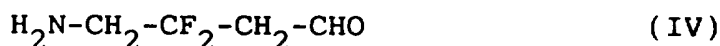
Menetelmässä käytettävä kaavan III mukainen ftalimidoyhdiste on saatavissa sinänsä tunnetulla tavalla käsittelemällä kaavan II mukaisen yhdisteen aminosuojattu johdannainen ftalimidillä trialkyyli- tai triaryylifosfiinin ja dietyyliatsodikarboksylaatin läsnäollessa vedetörmässä aproottisessa liuottimessa. Tavallisesti käytetään 1 - 3 ekvivalenttia ftalimidiä, fosfiinia ja dietyyliatsodikarboksylaattia kutakin yhtä ekvivalenttia kohden kaavan II mukaisen yhdisteen johdannaista, jolloin reaktiolämpötila on 10 - 100 °C ja reaktio kestää 18 - 24 tuntia. Kätevä fosfiini on trifenyylifosfiini ja kätevä aproottinen liuotin tetrahydrofuraani.

Ftalimidoryhmä voidaan muuttaa sinänsä tunnetulla tavalla vaadittavaksi primaariseksi aminoryhmäksi. Ftalimidoryhmä voidaan lohkaista esimerkiksi hydrolyyttisesti kuumentamalla yhdistettä kuuman mineraalihapon, edullisesti vetykloridi- ja etikkahappojen seoksen, kanssa. Happoja, jotka reagoivat asetyleenisten sidosten kanssa, esimerkiksi vetybromidihappoa, ei tietenkään voida käyttää. On edullista vapauttaa aminoryhmä kuumentamalla, edullisesti palautusjäähdyttäjän alla, ftalimidojohdannaista hydratsiin tai metyyliamiinin kanssa polaarissa orgaa-

nisessa liuottimessa, erityisesti alkoholissa. On kätevää käyttää metyylihydratsiinia metanolissa.

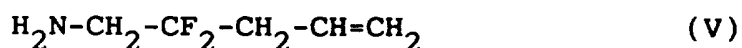
Edullinen aminoryhmän suojausryhmä kaavan III mukaiselle yhdisteelle on ftalimidoryhmä, jolloin halutun, 5 kaavan I mukaisen yhdisteen molemmat aminoryhmät voidaan vapauttaa samanaikaisesti.

Kaavan II mukainen yhdiste voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla antamalla etynyylimagnesiumhalogenidin, edullisesti bromidin, reagoida vastaavan aldehydin, jolla on seuraava yleinen kaava IV, aminosuojatun 10 johdannaisen kanssa:



15 On kätevää tehdä reaktio tetrahydrofuraanissa ja muodostaa etynyylimagnesiumhalogenidi in situ lisäämällä etyylimagnesiumhalogenidia asetyleenillä kyllästettyyn tetrahydrofuraaniin. Edullinen aminoryhmän suojausryhmä on tälläkin kertaa ftalimidoryhmä.

20 Kaavan IV mukainen yhdiste voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla hapettamalla vastaavan olefiinin, jolla on yleinen kaava V, aminosuojattu johdannainen:



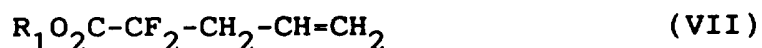
25 Soveltuvia hapettimia ovat kaliumpermanganaatti, osmiumtetroksidi ja tässä yhteydessä edullisesti otsoni. Käytettäessä otsonia on edullista johtaa otsoni liuoksen läpi, joka sisältää olefiinin aproottisessa liuottimessa, esimerkiksi dikloorimetaanissa, ja lisätä sitten dimetyyli- 30 sulfidia otsonireaktiovälituotteen pelkistämiseksi.

Kaavan V mukainen yhdiste voidaan valmistaa vastaavasta alkoholista, jolla on seuraava yleinen kaava VI, muuttamalla sinänsä tunnetulla tavalla hydroksyyli- 35 ryhmäksi primaariseksi aminoryhmäksi:



On kätevää tehdä muuttaminen vastaavan tosyylioksi-, mesyylioksi- tai, edullisesti, trifluorimetyylisulfonyylioksiyhdisteen kautta käsittelemällä kaavan VI mukainen alkoholi tosyylikloridilla, mesyylikloridilla tai trifluorimetyylisulfonyylianhidridillä emäksen, kuten pyridiinin, läsnä ollessa aproottisessa liuottimessa, erityisesti dikloorimetaanissa. Välituote käsitellään sitten alkalimetalliformalimidilla polaarissa orgaanisessa liuottimessa, edullisesti dimetyyliformamidissa, jolloin muodostuu vastaava ftalimidojohdannainen. Ftalimidojohdannaisesta käytetään tavallisesti aminosuojattuna johdannaisena, jota tarvitaan reagoivana aineena kaavan V mukaisen yhdisteen valmistamiseksi. Aminoryhmä voidaan kuitenkin tarvittaessa vapauttaa esimerkiksi käsittelemällä mineraalilihapolla tai hydratsiinilla.

Kaavan VI mukainen alkoholi voidaan pelkistämällä vastaava esteri, jolla on seuraava yleinen kaavan VII, pelkistimellä, kuten boorihidridillä, joka pelkistää selektiivisesti esteriryhmän:



jossa R_1 on C_{1-4} -alkyyli.

Kun R on alkyyli, voidaan kaavan VI mukainen alkoholi valmistaa käsittelemällä kaavan VII mukainen esteri vastaavalla litium- tai magnesiumalkyylihalogenidilla, jolloin saadaan vastaava ketoni, jolla on seuraava yleinen kaava VIII:



jossa R' on C_{1-4} -alkyyli.

Kaavan VIII mukainen ketoni pelkistetään sitten halutuksi alkoholiksi esimerkiksi boorihydridillä. Edellä mainituilla menetelmillä saadut yhdisteet voidaan eristää joko sellaisinaan tai happoadditiosuoloinaan. Happoadditiosuolat ovat edullisesti soveltuvien happojen, kuten 5 tässä hakemuksessa aiemmin mainittujen happojen, kanssa muodostettuja farmaseuttisesti hyväksyttäviä, myrkyttömiä additiosuoloja. Farmaseuttisesti hyväksyttävien happoadditiosuolujen lisäksi kuuluu happoadditiosuolujen piiriin 10 muitakin suoloja, kuten esimerkiksi pikriini- ja oksaali-happosuolat; ne voivat toimia välituotteina yhdisteiden puhdistuksessa tai muiden, esimerkiksi farmaseuttisesti hyväksyttävien, happoadditiosuolujen valmistuksessa, tai ne ovat käyttökelpoisia emästen identifioinnissa tai ka- 15 rakterisoinnissa.

Tuloksena oleva happoadditiosuola voidaan muuttaa vapaaksi yhdisteeksi tunnetuin menetelmin, esimerkiksi käsittelemällä se alkali- tai maa-alkalimetallihydroksidilla tai -alkoksidilla, alkalimetalli- tai maa-alkalimetallikarbonaatilla tai -vetykarbonaatilla, trialkyyliamiinilla, tai anioninvaihtohartsilla. 20

Tuloksena oleva happoadditiosuola voidaan muuttaa myös toiseksi happoadditiosuolaksi tunnetuin menetelmin; esimerkiksi epäorgaanisen hapon kanssa muodostettu suola 25 voidaan käsitellä jonkin hapon natrium-, barium- tai hopeasuolalla soveltuvassa laimennusaineessa, johon tuloksena oleva epäorgaaninen suola ei liukene, jolloin se erottuu reaktioväliaineesta. Happoadditiosuola voidaan muuttaa toiseksi happoadditiosuolaksi myös käsittelemällä anionin- 30 vaihtimella.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä.

Esimerkki 11,4-diamino-2,2-difluoriheks-5-yyiniA) 2,2-difluoripent-4-en-1-oli

(kaava VI)

5 Liuos, joka sisältää etyyli-2,2-difluoripent-4-
enoaattia (kaava VII; R_1 on C_2H_5) (146,8 g, 0,9 mol) eta-
nolissa (350 ml), lisätään tipoittain 1 tunnin aikana
liuokseen, joka sisältää natriumboorihydridiä (34 g, 0,9
10 mol) absoluuttisessa etanolissa (550 ml), huoneen lämpöti-
lassa. Reaktioseoksen havaitaan lämpenevän lisäyksen aika-
na. Seos jäädytetään 25 min:n kuluttua suola-jääseoksella
noin 16 °C:seen ja lisäystä jatketaan tässä lämpötilassa.
Sekoitusta jatketaan vielä 30 min jäähauteen lämpötilassa
ja sitten 2 tuntia huoneen lämpötilassa.

15 Reaktioseos haihdutetaan, jäännös liuotetaan di-
kloorimetaaniin (500 ml) ja liuokseen lisätään 4 N rikki-
happoa (350 ml), mikä aiheuttaa voimakkaan vedyn kehitty-
misen. Liuos laimennetaan vedellä (500 ml) ja uutetaan
sitten dikloorimetaanilla (4 x 250 ml). Yhdistetyt orgaa-
20 niset uuteliuokset pestään rikkihapolla (kahdesti, 200 ml,
2 N) ja kyllästetyllä suolaliuoksella, kuivataan magne-
siumsulfaatilla ja väkevöidään 25 °C:ssa vesisuihkupumpul-
la aikaansaadussa alipaineessa.

25 Tislaamalla konsentraatti saadaan 2,5-difluoripent-
4-en-1-olia, kp. 48 - 50 °C/11 mmHg, värittömänä, liikku-
vana öljynä (110,8 g, kvantitatiivinen saanto).

1H -NMR, $CDCl_3$, delta 6,1 - 5,7 (1 H, m); 5,3 (2 H, leveä
d); 3,70 (2 H, t, $J = 12$ Hz); 3,2 (1 H, leveä s); 2,70 (2
H, dt, $J = 6, 15$ Hz).

30 ^{19}F -NMR, $CDCl_3/C_6F_6$, -54 (tt, $J = 12, 15$ Hz).

B) 2,2-difluoripent-4-enyyli-trifluorimetyylisulfo-
naatti

35 Vaiheessa A valmistetun alkoholin (78 g, 0,64 mol)
liuokseen dikloorimetaanissa (500 ml) ja pyridiinissä
(55,3 g, 0,7 mol) lisätään 0 °C:ssa liuos, joka sisältää
trifluorimetyylisulfonylianhidridiä (204 g, 0,7 mol) di-

kloorimetaanissa, 0,75 tunnin aikana pitäen lämpötila 5 °C:na suola-jääseoksella jäähdyttämällä. Kun lisäys on saatettu loppuun, reaktioseoksen annetaan lämmitä huoneen lämpötilaan, sekoitetaan 0,5 tuntia, jäähdytetään 0 °C:seen ja lisätään sitten vettä (350 ml). Muodostuvat kerrokset erotetaan, vesikerros uutetaan dikloorimetaanilla (2 x 500 ml), yhdistetyt orgaaniset faasit pestään vedellä (2 x 200 ml), kuivataan natriumsulfaatilla ja väkevöidään pyöröhaihduttimella.

10 Konsentraatti tislataan vesisuihkupumpulla aikaansaataavassa alipaineessa. Kp. 50 - 52 °C, 134 g (83 %), ¹H-NMR, CDCl₃, delta 5,8 (1 H, m); 5,3 (2 H, m); 4,50 (2 H, t, J = 11 Hz); 2,77 (2 H, dt, J = 7, 16 Hz) ¹⁹F-NMR, CDCl₃/C₆F₆, -88 (s), -57 (tt, J = 11, 16 Hz).

15 C) 2,2-difluoripent-4-enyyliftalimidi

(kaava V; suojausryhmä ftalyyli)

Kaliumftalimidi (123 g 0,67 mol) lisätään sekoittaen edellä vaiheessa B valmistetun 2,2-difluoripent-4-enyyli-trifluorimetyylisulfonaatin (130 g, 0,51 mol) liuokseen dimetyyli-formamidissa (1,2 l). Seosta pidetään 120 °C:n lämpötilassa 21 tuntia, minä aikana suurin osa kiinteästä aineesta liukenee.

Kun seos on jäähdytetty huoneen lämpötilaan, lisätään vettä (2 l) pitäen lämpötila 20 °C:na. Kiinteä aine liuotetaan lisäämällä dietyylieetteriä, eetterikerros erotetaan ja vesikerros uutetaan dietyylieetterillä (3 x 1,7 l). Yhdistetyt orgaaniset faasit pestään 2 N natriumhydroksidiliuoksella (3 x 150 ml) ja vedellä (3 x 500 ml), kuivataan (MgSO₄) ja haihdutetaan, jolloin saadaan 2,2-difluoripent-4-enyyliftalimidiä (114,8 g, 90 %) valkeana kiinteänä aineena, sp. 74 - 77 °C.

¹H-NMR, CDCl₃, delta 7,87 (4 H, m); 5,9 (1 H, m); 5,3 (2 H, m); 4,10 (2 H, t, J = 14 Hz); 2,75 (2 H, dt, J = 7, 16 Hz).

35 ¹⁹F-NMR, CDCl₃/C₆F₆, -60,5 (tt, j = 16, 14 Hz).

Dietyylieetterin ja pentaanin seoksesta kiteytetyn näytteen sp. on 78 - 80 °C.

Alkuaineanalyysi yhdisteelle $C_{13}H_{11}NO_2F_2$:

Laskettu: C, 62,15; H, 4,41; N, 5,58 %

5 Mitattu: C, 62,53; H, 4,51; N, 5,63 %.

D) 2,2-difluori-1-ftalimidobutan-4-aali

(kaava IV; suojausryhmä ftalyyli)

Vaiheessa C valmistetun 2,2-difluoripent-4-enyyli-ftalimidin (18 g, 72 mmol) liuos dikloorimetaanissa (500
10 ml) jäähdytetään hiilihappojääasetonihauteessa ja liuokseen johdetaan otsonia (0,5 mmol/min), kunnes havaitaan sininen väri. Otsonivirtaus pysäytetään ja lisätään dimetyylisulfidi (60 ml) yhtenä annoksena. Jäähdytyschaude poistetaan ja seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa yön
15 yli. Dikloorimetaani ja ylimääräinen dimetyylisulfidi poistetaan pyöröhaihdutuksella. Jäännös siirretään dikloorimetaaniin (100 ml), pestään kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella (3 x 40 ml), kahdesti vedellä (50 ml) ja sitten kyllästetyllä NaCl-liuoksella, kuivataan
20 natriumsulfaatilla ja poistetaan liuotin pyöröhaihduttimella, jolloin saadaan 2,2-difluori-1-ftalimidobutan-4-aalia (18,1 g, 100 %) valkeana kiinteänä aineena (sp. 76 - 78 °C).

¹H-NMR, CDCl₃, delta 9,87 (1 H, m); 7,87 (4 H, m); 4,22 (2
25 H, 5, J = 14 Hz); 3,07 (2 H, dt, J, 2, 17 Hz).

¹⁹F-NMR, CDCl₃/C₆F₆, -64 (ddd, J = 17, 14, 2 Hz).

Jos reaktioseosta sekoitetaan vain 1 - 2 tuntia dimetyylisulfidin lisäämisen jälkeen on aldehydin pääasiallisena epäpuhtautena otsonidi 3-(2,2-difluori-3-ftalimidopropyli)1,2,4-trioksalaani.
30

¹H-NMR, CDCl₃, delta 7,53 (4 H, m); 5,60 (1 H, t, J = 5 Hz); 5,22 (1 H, s); 5,13 (1 H, s); 4,17 (2 H, t, J = 14 Hz); 2,45 (2 H, kaksois-t, J = 5, 16 Hz).

¹⁹F-NMR, CDCl₃/C₆F₆, -62 (m).

35

E) 2,2-difluori-1-ftalimidoheks-5-yn-4-oli

(kaava II; suojausryhmä ftalyyli)

Hiilihappojäällä jäähdytettyä tetrahydrofuraania (1 l) kyllästetään asetyleenillä yhden tunnin ajan. Sitten tähän liuokseen lisätään etyyli­magnesiumbromidia (2 M liuos dietyylieetterissä, 40 ml, 80 mmol) noin 15 min:n aikana ja asetyleenivirtaa pidetään yllä 30 min tämän lisäyksen lopetuksen jälkeen. Vaiheessa D valmistetun 2,2-difluori-1-ftalimidobutan-4-aalin (72 mmol) liuos tetrahydrofuraanissa (150 ml) lisätään sitten ti­poittain 15 min:n aikana ja seosta sekoitetaan typen alla yksi tunti antaen sen samalla läm­metä huoneen lämpötilaan. Seos kaadetaan 1 N vety­kloridihappoon (1 l) ja uutetaan dietyylieetterillä (3 x 750 ml). Yhdistetyt orgaaniset uuteliuokset pestään kyllästetyllä NaCl-liuoksella, kuivataan natriumsulfaatilla ja väkevöidään.

Tuote käsitellään aktiivihie­lellä metanolissa. Kiteyttämällä tämä materiaali etyyliasetaat­in ja heksaanin seoksesta ja käsittelemällä emäliuokset kromatografisesti (500 g SiO₂, 70 - 230 meshiä, etyyliasetaat­ti-heksaaniseos 1:1) saadaan kaikkiaan 6,58 g 2,2-difluori-1-ftalimidoheks-5-yn-4-olia, joka on riittävän puhdasta käytettäväksi vaiheessa F. Kokonaissaanto 33 %, R_f (etyyliasetaat­ti-heksaaniseos 1:1) 0,69. Metanolista uudelleen­kiteytetyn näytteen sp. on 172 - 174 °C.

¹H-NMR, CD₃OD/(CD₃)₂SO, delta 7,87 (4 H, m); 4,67 (1 H, dt, J = 2 Hz); 4,5 - 3,7 (2 H, m); 3,03 (1 H, d, J = 2 Hz); 2,40 (2 H, ddd, J = 18, 15, 6 Hz).

¹⁹F-NMR, CDCl₃/C₆F₆, -64 (m).

Massaspektri: (NH₃/DCI) m/e 297 (MNH₄⁺, 70 %); 280 (MH⁺; 100 %); 262 (20 %); 242 (50 %); 160 (75 %).

Alkuaineanalyysi yhdisteelle C₁₄H₁₁NO₃F₂:

Laskettu: C, 60,22; H, 3,97; N, 5,02 %

Mitattu: C, 59,55; H, 4,06; N, 5,13 %.

F) 2,2-difluori-1,4-bis(ftalimido)-heks-5-yyni

(kaava III; suojausryhmä ftalyyli)

- Dietyyliatsidikarboksyylaatti (7,5 ml, 47,4 mmol) lisätään jääkylmään liuokseen, joka sisältää 2,2-difluori-1-ftalimidoheks-5-yn-4-olia (valmistettu vaiheessa E, 8,88 g, 31,8 mmol), trifenyylifosfiinia (16,7 g, 63,7 mmol) ja ftalimidiä (5,12 g, 34,8 mmol) tetrahydrofuraanissa (500 ml), typen alla 10 min:n aikana. Seosta sekoitetaan 0 °C:ssa kaksi tuntia ja sitten huoneen lämpötilassa 65 tuntia. Tetrahydrofuraani poistetaan pyöröhaihduttimella ja jäännös puhdistetaan flash-kromatografialla (800 g SiO₂, 230 - 400 meshiä, etyyliasetaatin ja heksaanin seos 1:1). Kerätään kaksi sarjaa fraktioita. 2,2-difluori-4-bis(ftalimido)-heks-5-yyniä ja trifenyylifosfiinia sisältävät fraktiot pestään dietyylieetterillä, jolloin saadaan koh-
tuullisen puhtasta bisftalimidiä, kun taas 2,2-difluori-1,4-bis(ftalimido)-heks-5-yyniä ja N,N'-dikarbetoksihyd-
ratsiinia sisältävät fraktiot pestään metanolilla. Kolon-
ni huuhdotaan lopuksi etyyliasetaatilla. Tälläkin kertaa
pesu metanolilla antaa tulokseksi bisftalimidia. Eriste-
tään kaikkiaan 4,85 g (36 %) haluttua tuotetta, R_f (etyyli-
asetaatii-heksaaniseos 1:1) 0,34.

Metanolilla vielä kerran pestyn näytteen sulamispiste on 201 - 203 °C.

- ¹H-NMR, CDCl₃, delta 7,77 (8 H, m); 5,60 (1 H, ddd, J = 9, 4, 2 Hz); 4,08 (2 H, t, J = 14 Hz); 3,5 - 2,5 (2 H, m); 2,43 (1 H, d, J = 2 Hz).

¹⁹F-NMR. CDCl₃/C₆F₆, -59 (m).

- Massaspektri; (EI), m/e 408 (M⁺, 5 %); 388 (m-HF, 30 15 %); 380 (5 %); 368 (10 %); 345 (20 %); 241 (95 %); 194 (100 %); 160 (80 %).

Alkuaineanalyysi yhdisteelle C₂₂H₁₄N₂F₂O₄:

Laskettu: C, 64,71, H, 3,46; N, 6,86 %

Mitattu: C, 63,86; H, 3,51; N, 6,83 %.

G) 2,2-difluoriheks-5-ynni-1,4-diamiini-bis-t-bu-tyylikarbamaatti

(kaava I; suojausryhmä BOC)

5 Metyylihydratsiini (2,46 ml, 46 mmol) lisätään vai-
heessa F valmistetun 2,2-difluori-1,4-bis(ftalimido)-heks-
5-ynnin (4,85 g, 11,9 mmol) liuokseen metanolissa (50 ml)
ja tetrahydrofuraanissa (50 ml) ja liuosta pidetään 80
°C:ssa palautusjäähdyttäjän alla (kiehuu lievästi) typpi
10 suojakaasuna 22 tuntia. Sitten seos jäähdytetään huoneen
lämpötilaan ja väkevöidään pyöröhaihduttimella, lopuksi
atseotrooppisena seoksena etanolin kanssa.

Jäännös suspendoidaan metanolin (200 ml), veden (10
ml) ja väkevän suolahapon (20 ml) seokseen ja sekoitetaan
30 min. Kiintoaineet poistetaan suodattamalla ja pestään
15 vedellä. Yhdistetyt suodokset haihdutetaan kuiviin.

Jäännös liuotetaan veteen (25 ml) ja tetrahydrofuraaniin
(25 ml). Lisätään natriumkarbonaattia (5 g) ja di-tert-
butyyliidikarbonaattia (10 g, 45,9 mmol) ja seosta sekoite-
taan huoneen lämpötilassa yön yli.

20 Seos uutetaan dietyylieetterillä (3 x 50 ml). Yh-
distetyt uutteen pestään kyllästetyllä NaCl-liuoksella,
kuivataan natriumsulfaatilla ja haihdutetaan. Jäännökselle
tehdään flash-kromatografia (noin 200 g SiO₂, 230 - 400
meshiä, pentaani-dietyylieetteriseos 2:1), jolloin saadaan
25 2,2-difluoriheks-5-ynni-1,4-diamiini-bis-5-butytylikarba-
maattia (2,2 g, 53 %, R_f 0,31)

Pentaanista kiteytetyn näytteen sulamispiste on 108 -
115 °C.

30 ¹H-NMR, CDCl₃, delta 4,8 (3 H, m); 3,57 (2 H, dt, J = 6,14
Hz); 2,3 (3 H, m); 1,47 (18 H, s).

¹⁹F-NMR, CDCl₃/C₆F₆, -59.

H) 2,2-difluoriheks-5-ynni-1,4-diamiinidihydroklo-
ridi

(kaava I; dihydrokloridihappoadditiosuola)

35 Vetykloridihapon kyllästetty liuos dietyylieette-
rissä (20 ml) lisätään vaiheessa G valmistetun 2,2-difluo-

riheks-5-yyni-1,4-diamino-bis-t-butylikarbamaatin (2,2 g, 6,3 mmol) liuokseen dietyylieetterissä (10 ml). Seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 4 vrk. Saostuma otetaan talteen, pestään di-etyylieetterillä ja uudelleenkiteytetään metanolin ja di-isopropyylieetterin seoksesta, jolloin saadaan 2,2-difluorihex-5-yyni-1,4-diamiinidihydrokloridia valkeana, ei-hygroskooppisena kiinteänä aineena (1,09 g, 78 %), joka sulaa hajoten yli 200 °C:n lämpötilassa.

¹H-NMR, D₂O:HDO = delta 4,50, delta 3,50 (2 H, dd, J = 15, 18 Hz); 3,00 (1 H, d, J = 2 Hz); 2,7 (s, H, m). Liuotin peittää H-4-signaalin.

Alkuaineanalyysi yhdisteelle C₆H₁₂N₂F₂Cl₂

Laskettu: C, 32,60; H, 5,47; N, 12,67 %

Mitattu: C, 32,41/32,55; H, 5,31/5,36; N, 12,60/12,78 %.

Seuraavissa farmaseuttisia koostumuksia käsittelevissä esimerkeissä 1,4-diamino-2,2-difluorihex-5-yynistä käytetään termiä "aktiivinen aineosa". Lääkeaineen määrän säätäminen saattaa olla välttämätöntä tai toivottavaa lääkeaineen aktiivisuusasteen mukaan, kuten alalla hyvin tiedetään.

Esimerkki 2

Kovia gelatiinikapseleita kuvaava koostumus on seuraava:

25	a) aktiivista aineosaa	20 mg
	b) talkkia	5 mg
	c) laktoosia	90 mg

Formulaatio valmistetaan johtamalla kuivat jauheet hienojakoisen seulan läpi ja sekoittamalla ne hyvin keskenään. Jauhe pakataan sitten koviin gelatiinikapseleihin täyttö painon ollessa 115 mg/kapseli.

Esimerkki 3

Tablettikoostumuksia valaisee seuraava koostumus:

	a) aktiivista aineosaa	20 mg
35	b) tärkkelystä	43 mg
	c) laktoosia	45 mg
	d) magnesiumstearaattia	2 mg

Rakeet, joita saadaan sekoittamalla laktoosi yhdisteeseen (a) ja osaan tärkkelyksestä ja rakeistamalla tärkkelystahnan kanssa, kuivataan, seulotaan ja sekoitetaan magnesiumstearaatin kanssa. Seos puristetaan 110 mg:n painoisiksi tableteiksi.

Esimerkki 4

Injektoitavaa suspensiota valaisee seuraava koostumus, joka on lihaksensisäisesti ruiskutettava 1 ml:n ampulli:

	<u>paino-%</u>
a) aktiivista aineosaa	1,0
b) polyvinyylipyrrolidonia	0,5
c) lesitiiniä	0,25
d) injektioihin tarkoitettua vettä, täytetään	100,0:ksi

Ainekset sekoitetaan, homogenoidaan ja pakataan 1 ml:n ampulleihin, jotka suljetaan ja autoklavoidaan 20 min 121 °C:ssa. Kukin ampulli sisältää 10 mg/ml uutta yhdistettä (a).

Esimerkki 5

	<u>mg/peräpuikko</u>
Aktiivista aineosaa	50
Kaakaovoita	950

Lääkeaine jauhetaan, johdetaan seulan B.S. nro 100 läpi ja hierotaan sulatettuun kaakaovoihin lämpötilassa 45 °C tasaiseksi suspensioksi. Seos sekoitetaan hyvin ja kaadetaan muotteihin, joiden nimelliskapasiteetti on 1 g, jolloin saadaan peräpuikkoja.

Esimerkki 6

Kaavan I mukaisten yhdisteiden ODC-inhibointiaktiivisuus voidaan osoittaa in vivo seuraavalla menettelyllä: Sprague-Dawley-kannan urosrotille (paino 200 - 220 g) annetaan ravintoa ja vettä rajoittamattomasti ja pidetään ne säännöllisissä valaistusolosuhteissa (12 tuntia valoisa, 12 tuntia pimeää). Lääkkeet injektoidaan intraperitoneaalisesti (liuotettuina 0,9-%:iseen suolaliuokseen) tai an-

netaan letkuruokinnalla (veteen liuotettuina). Vertailu-
eläiminä käytetään fysiologista suolaliuosta tai vettä
saavia rottia. Eläimet tapetaan katkaisemalla niska 5 - 6
tunnin kuluttua lääkkeen annosta ja mahanpuoleinen etu-
5 rauhanen ja kateenkorva irrotetaan nopeasti ja käsitellään
välittömästi. Kudokset homogenoidaan kolminkertaisen tila-
vuuden kanssa 30 mM natriumfosfaattipuskuria (pH 7,1),
joka sisältää 0,1 mmol/l EDTA:a, 0,25 mol/l sakkaroosia,
0,1 mmol/l pyridoksaalifosfaattia ja 5 mmol/l ditiotreito-
10 lia. Ornitiinidekarboksylaasiaktiivisuudet määritetään
1000 g:sta eturauhashomogenaatin supernatanttia ja koko
kateenkorvahomogenaatista suurin piirtein Onon et al. ku-
vaamalla menetelmällä [Biochem. Biophys. Acta 284 (1972)
285].

15 Esimerkki 7

Kaavan I mukaisen yhdisteen aktiivisuus ornitiini-
dekarboksylaasin (ODC:n) inhibiittoreina voidaan osoittaa
in vitro seuraavalla menettelyllä:

Ornitiinidekarboksylaasi (ODC) preparoidaan rottien, joi-
hin on injektoitu tioasetamidia (150 mg/painokilo) 18 tun-
20 tia ennen teurastusta, maksoista ja puhdistetaan puhtaus-
asteeltaan noin kymmenkertaiseksi käsittelmällä hapolla
pH-arvossa 4,6 Onon et al. menetelmällä [Biochem. Biophys.
Acta 284 (1972) 285]. ODC-varastoliuos sisältää proteiinia
25 (16 mg/ml), natriumfosfaattipuskuria (30 mM, pH 7,1), di-
tiotreitolia (5 mmol/l) ja pyridoksaalifosfaattia (0,1
mmol/l). Tämän varastoliuoksen ominaisaktiivisuus on 0,12
nmol CO₂:a/min mg:aa kohden proteiinia. Tyypillisessä ko-
keessa sekoitetaan 320 µl tätä varastoliuosta ajanhetkellä
30 0 80 µl:aan inhibiittorin vesiliuosta ja inkuboidaan 37
°C:ssa. Eri ajanhetkillä siirretään 50 µl:n annoksia 1
ml:aan määrittäsväliainetta, joka sisältää natriumfosfaat-
tia (30 mmol/l, pH 7,1), ditiotreitolia (5 mmol/l), pyri-
doksaalifosfaattia (0,1 mmol/l), L-ornitiinia (0,081 µmol)
35 ja DL-[1-¹⁴C]ornitiinia (0,043 µmol, 58 Ci/mol, Amersham)
suljetussa astiassa, johon on sijoitettu suodatinpaperi,

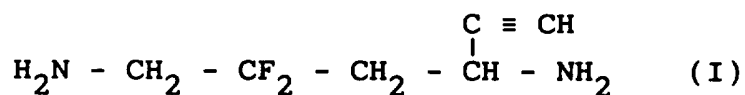
joka on kostutettu 50 μ l:lla hyamiinihydroksidiliuosta (1 mol/l). Reaktion annetaan edetä 60 min 37 °C:ssa ja pysäytetään sitten lisäämällä 0,5 ml 40-%:ista trikloorietikkahappoa. Annetaan seistä vielä 30 min ja tehdään suodatin-

5 paperiin absorboituneen CO₂:n laskenta tavanomaisessa tui-
kelaskentaseoksessa. K_i (näennäinen dissosiaatiovakio) ja
T50 (puoliintumisaika) äärettömässä inhibiittoripitoisuu-
dessa lasketaan Kitzin ja Wilsonin menetelmällä [J. Biol.
Chem. 237 (1962) 3245].

Patenttivaatimus

Menetelmä terapeuttisesti aktiivisen fluoratun di-
aminoalkyynijohdannaisen valmistamiseksi, jolla on kaava

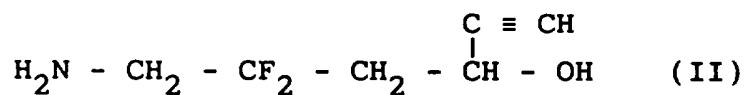
5



10

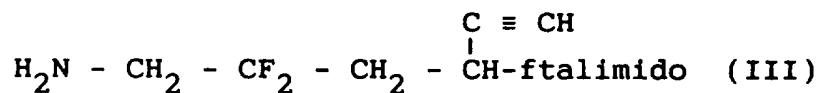
tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän happoadditiosuolan
valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vastaavan
alkoholin, jolla on kaava

15



aminosuojattua johdannaista käsitellään ftalimidillä, jol-
loin saadaan yhdiste, jolla on kaava

20



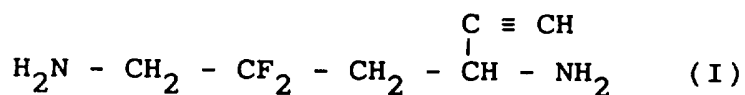
25

minkä jälkeen ftalimidoryhmä muutetaan sinänsä tunnetulla
tavalla primaariseksi aminoryhmäksi, jolloin saadaan kaa-
van I mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyt-
tävä suola.

Patentkrav

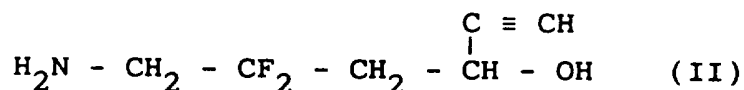
Förfarande för framställning av ett terapeutiskt
aktivt fluorerad diaminoalkynderivat med formeln

5



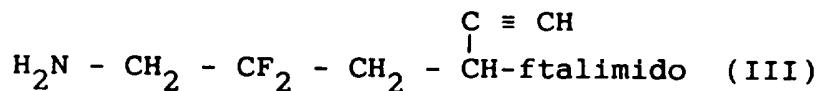
eller för framställning av dess farmaceutiskt godtagbara
syraadditionssalt, k ä n n e t e c k n a t därav, att
ett aminoskyddat derivat av motsvarande alkohol med for-
meln

15



behandlas med ftalimid, varvid en förening med formeln

20



25

erhålls, varefter ftalimidogruppen förvandlas på ett i och
för sig kända sätt till en primär aminogrupp, varvid fö-
reningen med formeln I eller dess farmaceutiskt godtagbara
salt erhålls.