

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 853515 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application **853515**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07D

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **13.09.1985**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **13.09.1985**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **18.03.1986**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

17.09.1984 US 650946

17.09.1984 US 651121

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Sterling Drug Inc, 90 Park Avenue, New York, NY 10016, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Leshner, George Yohe, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Daum, Sol Jacob, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Singh, Baldev, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • Danilotschkin, Nikolai, Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Antibakteerista aktiivisuutta omaava 7-(pyridinyyli)-1-alkyyli-1,4-dihydro-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo ja sen valmistus.

7-(pyridinyl)-1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxo-3-kinolinkarboxylsyra med antibakteriell aktivitet och dess framställning.

Antibakteerista aktiivisuutta omaava 7-(pyridinyyli)-1-alkyyli-1,4-dihydro-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo ja sen valmistus

5 Tämä keksintö koskee uutta 7-(pyridinyyli)-1-alkyyli-1,4-dihydro-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappoa, sen suoloja ja valmistusta, jolla yhdisteellä on käyttöä antibakteerisena aineena.

GB-patenttijulkaisussa 822 586 on esitetty 1-metyyli-10 4-kinoloni-3-karboksyylihapon (vaihtoehtoinen nimitys: 1,4-dihydro-1-metyyli-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo) nitraus saattamalla se reagoimaan huoneen lämpötilassa nitrausaineen kanssa, joka sisältää vedetöntä typpihappoa yhdessä muun vedettömän mineraalihapon, esimerkiksi rikki-15 hapon tai fosforihapon kanssa, 1-metyyli-6-nitro-4-kinoloni-3-karboksyylihapon (vaihtoehtoinen nimitys: 1,4-dihydro-1-metyyli-6-nitro-3-kinoliinikarboksyylihappo) tuottamiseksi.

GB-patenttijulkaisu 830 832 esittää 1-alkyyli-4-kinoloni-3-karboksyylihappo- ja antibakteerisina aineina. 20 Valaisevia esimerkkejä näistä yhdisteistä ovat 1-etyyli-6-nitro-4-kinoloni-3-karboksyylihappo (esimerkki 18), joka valmistettiin nitraamalla 1-etyyli-4-kinoloni-3-karboksyylihappo huoneen lämpötilassa väkevän typpihapon ja väkevän rikkihapon seoksella, ja 1-etyyli-6-fluori-4-kinoloni-3-karboksyylihappo (esimerkiksi 17) (vaihtoehtoinen nimitys: 1-etyyli-1,4-dihydro-6-fluori-4-okso-3-kinoliini-25 karboksyylihappo) joka valmistettiin kuumentamalla 3-etoksi-karbonyyli-6-fluori-4-hydroksi-kinoliinia dietyylisulfaatin kanssa natriumhydroksidin vesiliuoksessa.

30 US-patenttijulkaisu 3 753 993 esittää antibakteerisina aineina 1-alkyyli-1,4-dihydro-4-okso-7-(pyridinyyli)-3-kinoliinikarboksyylihappoja. Näistä yhdisteistä esimerkkejä ovat 1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo (esimerkiksi 6A, tunnetaan 35 myös nimellä Win 35 439), joka valmistettiin vaiheittain

seuraavasti: ensin 4-(3-aminofenyyli)-2,6-dimetyyllipyri-
 diini saatettiin reagoimaan dietyylietoksimetyleenimalo-
 naatin kanssa dietyyli-3-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)
 anilinometyleenimalonaatiksi (esimerkiksi 6B), jota sitten
 5 kuumennettiin difenyylin ja difenyyllieetterin eutektisessä
 seoksessa (Dowtherm A), jolloin saatiin etyyli-1,4-dihydro-
 7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-3-kinoliinikarboksylaattia
 (esimerkki 6C), ja kuumentamalla sitten tätä esterää
 etyylijodin kanssa dimetyylliformamidissa vedettömän kalium-
 10 karbonaatin läsnäollessa saatiin 1-etyyli-1,4-dihydro-7-
 (2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyyli-
 hapon etyyliesteri (esimerkiksi 6A), joka hydrolysoitiin
 vastaavaksi hapoksi. Tässä patentissa on esimerkissä 1A
 esitetty myös 1-etyyli-1,4-dihydro-4-okso-7-(4-pyridi-
 15 nyyli)-3-kinoliinikarboksyylihappo, jonka geneerinen nimi
 nykyisin on rosoksasiini tai joka tunnetaan myös nimellä
 Win 35 213.

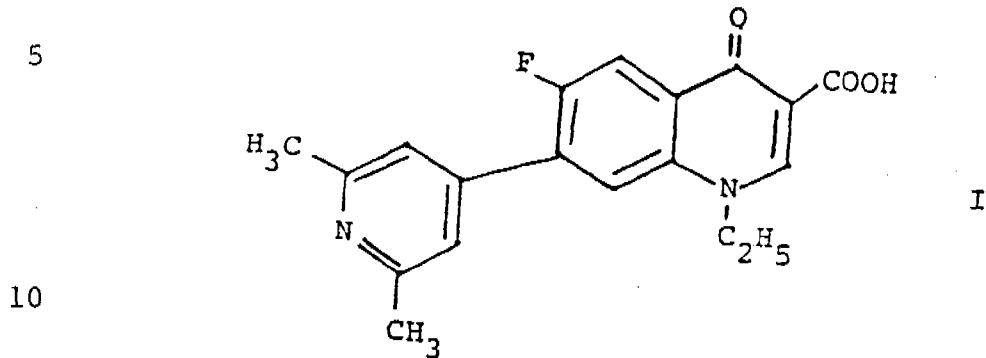
US-patenttijulkaisussa 3 907 808 on esitetty antibak-
 teerisina aineina käytettäviä 1-alkyyli-1,4-dihydro-4-okso-
 20 5(tai 6)-(halogeeni, alempi-alkyyli tai alempi-alkoksi)-
 7-(pyridyyli)-3-kinoliinikarboksyylihappoja. Näistä yhdis-
 teistä esimerkkinä on 7-(3,5-dikarboksi-2,6-dimetyyli-4-py-
 ridinyyli)-1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-4-okso-3-kino-
 liinikarboksyylihappo (esimerkiksi 57A), joka valmistet-
 25 tiin 6 vaiheessa lähtien 2-fluori-5-nitrobentsaldehydistä
 seuraavasti: (1) seosta, joka sisälsi 2-fluori-5-nitro-
 bentsaldehydiä, metyyliasetoasettaattia, metanolia ja vä-
 kevää ammoniumhydroksidia, keitettiin palautusjäähdyttäen,
 jolloin saatiin dimetyyli-4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-1,4-
 30 dihydro-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiinidikarboksylaatti (esi-
 merkki 57B); 2) esimerkin 57B yhdiste hapetettiin 4-m typ-
 pihapolla dimetyyli-4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dime-
 tyyli-3,5-pyridiinikarboksylaattiksi (esimerkiksi 57C); 3)
 esimerkin 57C yhdiste hydrattiin katalyyttisesti dimetyyli-
 35 4-(5-amino-2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiinikarbok-

sylaattiksi (esimerkki 57D); 4) esimerkin 57D yhdiste
 saatettiin reagoimaan dietyylietoksimetyleenimalonaatin
 kanssa jolloin saatiin 3-(3,5-dikarbometoksi)-2,6-dime-
 tyyli-4-pyridinyyli)-fluorianilinometyleenimalonaatti
 5 (esimerkki 57E); esimerkin 57E yhdistettä kuumennettiin
 Dowtherm A:ssa, jolloin saatiin etyyli-7-(3,5-dikarbo-
 metoksi-2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-6-fluori-1,4-dihydro-
 4-okso-3-kinoliinikarboksylaatti (esimerkki 57E); ja
 6) esimerkin 57E yhdistettä kuumennettiin etyylijodidin
 10 kanssa dimetyyliformamidissa vedettömän kaliumkarbonaatin
 läsnäollessa, ja saatu yhdiste saippuoitiin, jolloin saa-
 tiin 7-(3,5-dikarboksi-2-6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-
 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-4-okso-3-kinoliinikarbok-
 syylihappo (esimerkki 57A). Tämän patentin esimerkissä
 15 56F on kuvattu 4-(2-metoksi-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyyli-
 3,5-pyridiinidikarboksyylihapon muuttaminen 4-(2-metoksi-
 5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniksi kuumentamalla
 Dowtherm A:ssa. Esimerkissä 64C on kuvattu 7-(3,5-dikar-
 boksi-2-6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-1-etyyli-1,4-dihydro-
 20 6-metyyli-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapon muuttaminen
 7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-1-etyyli-1,4-dihydro-6-
 metyyli-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapoksi kuumenta-
 malla dietyyliftalaatissa 240-255°C:ssa.

25 US-patenttijulkaisussa 4 146 719 on esitetty anti-
 bakteerisena aineena käytettäväksi 1-etyyli-6-fluori-
 1,4-dihydro-4-okso-7-(1-piperatsinyyli)-3-kinoliinikar-
 boksyylihappo, joka tunnetaan nykyisin nimellä norfoloksa-
 siini, ja tämän hapon suolat.

30 US-patenttijulkaisussa 4 292 317 on esitetty anti-
 bakteerisina aineina käytettäviä 6-halogeeni-1-substi-
 tuoitu-7-substituoitu-amino-1,4-dihydro-4-okso-3-kino-
 liinikarboksyylihappoja ja niiden suoloja, mm. 1-etyyli-
 6-fluori-1,4-dihydro-7-(4-metyyli-1-piperatsinyyli)-4-
 okso-3-kinoliinikarboksyylihappo, joka tunnetaan nimellä
 35 perfloksasiini.

Esillä olevan keksinnön kohteena on kaavan I mukainen 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-4-okso-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-3-kinoliinikarboksyylihappo



ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävät, myrkyttömät happoadditiosuolat tai kationiset suolat. Kaavan I mukainen yhdiste ja sen mainitut suolat ovat käyttökelpoisia antibakteerisia aineita, joiden bakteriologinen teho on määritetty standardimenetelmin.

Kaavan I mukainen yhdiste on edullisesti perusmuodossaan. Kuten jäljempänä osoitetaan, tämä yhdiste on erittäin tehokas antibakteerinen aine, jolla on laaja aktiivisuuspektri monia erilaisia mikro-organismeja vastaan, joihin kuuluvat mm. anaerobiset hampaiden juurikalvon tulehdusta (periodontiitti) aiheuttavat mikro-organismit.

Bakteerienvastainen koostumus sisältää antibakteerisesti vaikuttavan määrän kaavan I mukaista 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappoa tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää, myrkyttömää happoadditiosuolaa tai kationisuola yhdessä yhden tai useamman farmaseuttisesti hyväksyttävän väliaineen tai täyteaineen kanssa. Bakteerien vastaisessa menetelmässä näiden bakteerien elintila saatetaan kosketuksiin kaavan I mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää, myrkyttömää happoadditiosuolaa tai kationista suolaa sisältävän koostumuksen kanssa.

Keksinnön mukainen yhdiste voidaan valmistaa

- a) muuttamalla 6-amino-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo ensin 6-diatsoniumsuolaksi, joka sitten muutetaan 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli)-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapoksi, tai
- b) etyloimalla 6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo tai sen alempi-alkyyliesteri, jolloin siinä tapauksessa, että reaktio suoritetaan alempi-alkyyliesterin kanssa saadaan 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapon, alempi-alkyyliesteri, josta hydrolysoimalla saadaan vastaava happo,
- ja haluttaessa saatu yhdiste muutetaan happoadditiosuolaksi tai saatu yhdiste muutetaan kationisuolaksi reaktiossa vahvan epäorgaanisen tai orgaanisen emäksen kanssa. Täydellinen reaktiosarja menetelmän a) mukaisesti on seuraava: 1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo nitrataan 1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-6-nitro-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapoksi, joka pelkistetään 6-amino-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapoksi, joka 6-diatsiniumsuolansa välityksellä muutetaan halutuksi 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapoksi. Pelkistysvaiheessa käytetään pelkistimenä edullisesti natriumhydrosulfiittia vesipiroisessa alkalisessa väliaineessa.
- 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo, joka sisältää epäpuhtauksina vastaavia 6-desfluori- ja 6-hydroksiyhdisteitä, puhdistetaan muuttamalla se vastaavaksi alempi-alkyyli-3-karboksylaatiksi, erottamalla esteri reaktioseoksesta ja saippuoimalla esteri vastaavaksi puhdistetuksi kaavan I mukaiseksi hapoksi.

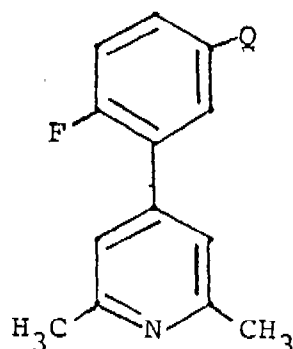
6-aminoyhdiste muutetaan kaavan I mukaiseksi 6-fluoriyhdisteeksi edullisesti valmistamalla ensin 6-diatsoniumkloridi, saattamalla tämä reagoimaan heksafluorifosforihapon (HPF_6) kanssa vastaavaksi 6-diatsonium-
 5 heksafluorifosfaatiksi, sopivasti hydrofluorifosfaatin muodossa, ja kuumentamalla viimeksi mainittua yhdistettä, jolloin saadaan kaavan I mukainen 6-fluoriyhdiste.

Keksinnön mukaisen puhdistusmenetelmäaspektin mukaisesti muodostetaan etyyli-3-karboksylaatti, joka eristetään ja saippuoidaan puhdistetuksi kaavan I mukaiseksi
 10 yhdisteeksi.

Edullisessa menetelmävaihtoehdon b) mukaisessa menetelmässä 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-dikarboksylihappoa kuumennetaan, jolloin saadaan 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiinin ja 2,4-dimetyyli-5H
 15 [1]bentsopyrano [3,4-c]pyridin-5-onin seos, seoksen komponentit erotetaan ja saatu 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini nitrataan 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniksi. Kuten seuraavassa esitetään
 20 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini on käyttökelpoinen välituote valmistettaessa erittäin hyvällä saannolla vastaavaa 4-(5-amino-2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä, joka muutetaan neljässä reaktio-
 25 vaiheessa (kaikki erittäin hyvällä saannolla) 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylihapoksi Tämä menetelmä kokonaisuudessaan edustaa parannettua ja sopivaa keinoa mainitun antibakteerisen aineen valmistamiseksi suuressa
 mittakaavassa.

30 Lisäksi keksinnön kohteena on kaavan II mukainen yhdiste

5



II

10

jossa Q on vety tai nitro, ja tämän yhdisteen happoadditio-
suolat. Kuten edellä todettiin, nämä yhdisteet ovat tär-
keitä välituotteita erittäin tehokkaan antibakteerisen
aineen, 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-
15 4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapon valmis-
tuksessa.

Kaavojen I ja II mukaiset yhdisteet ovat käyttökel-
poisia vapaassa muodossa ja myös happoadditiosuoloina,
ja molemmat muodot sisältyvät keksinnön suojapiiriin.

20 Happoadditiosuola on yksinkertaisesti vaihtoehtoinen muoto
käytettäväksi; itse asiassa happoadditiosuolan käyttö sisäl-
tää perusmuodon käytön. Kaavojen I ja II mukaisten yhdis-
teiden happoadditiosuolojen valmistukseen käytettävät
hapot ovat edullisesti sellaisia, jotka muodostavat näiden
25 yhdisteiden kanssa farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja,
so. suoloja, joiden anionit ovat suhteellisen haitattomia
eläinorganismille suolojen farmaseuttisina annoksina, siten
että anionista johtuvat sivuvaikutukset, eivät häiritse vapaan
yhdisteen antibakteerisia ominaisuuksia, Sopivia keksinnön-
30 suojapiiriin kuuluvia farmaseuttisesti hyväksyttäviä suo-
loja ovat mineraalihapoista johdetut, kuten kloorivety-
haposta, bromivetyhaposta, rikkihaposta, fosforihaposta,
sulfamiinihaposta johdetut, ja orgaanisista hapoista johde-
tut, kuten maitohaposta, etikkahaposta, sitruunahaposta,
35 viinihaposta, metaanisulfonyhaposta, etaanisulfonyhaposta,

bentseenisulfonihaposta, p-tolueenisulfonihaposta, sykloheksyyllisulfamiinihaposta, kiniinihaposta ym. johdetut, joista saadaan vastaavasti, hydrokloridi, hydrobromidi, sulfaatti, fosfaatti, sulfamaatti, laktaatti, asetaatti, sitraatti, tartraatti, metaanisulfonaatti, etaanisulfonaatti, bentseenisulfonaatti, p-tolueenisulfonaatti, sykloheksyyllisulfamaatti ja kinaatti.

Kaavojen I ja II mukaisten yhdisteiden happoadditiosuoloja valmistetaan joko liuottamalla yhdiste veteen tai vesi-alkoholiseokseen tai muuhun sopivaan liuottimeen, joka sisältää sopivaa happoa, ja eristämällä suola haihduttamalla liuos, tai saattamalla yhdiste ja happo reagoimaan orgaanisessa liuottimessa, jossa tapauksessa suola erottuu suoraan tai saadaan konsentroimalla liuos.

Muita kaavan I mukaisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja ovat kationosuolat so. vahvojen epäorgaanisten tai orgaanisten emästen kanssa muodostetut suolat, esim. natriumhydroksidin, kaliumhydroksidin, trimetyyliammoniumhydroksidin kanssa muodostetut natrium-, kalium- ja trimetyyliammoniumsuolat.

Vaikka lähinnä kaavan II mukaisten emäksisten yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ovat edullisia, niin kaikki happoadditiosuolat kuuluvat keksinnön suoja-
piiriin. Kaikki happoadditiosuolat ovat käyttökelpoisia vapaan emäsmuodon lähteinä, vaikka kyseistä suolaa sinänsä tarvitaan vain väliaikaisesti esimerkiksi silloin, kun suola on muodostettu ainoastaan puhdistus- tai identifiointitarkoituksiin, tai kun sitä käytetään välituotteena farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi ioninvaihtomenetelmällä.

Kaavan I mukaisten yhdisteiden ja vastaavien 6-nitro- ja 6-aminovälituotteiden sekä kaavan II mukaisten yhdisteiden molekyyli rakenne vahvistettiin infrapuna-, ultraviolett-, ydinmagneettinenresonanssi- ja massaspektreillä saadun todistusaineiston perusteella ja perustuen alku-

aineanalyysissä saatujen arvojen ja laskettujen arvojen vastaavuuteen sekä valmistusmenetelmän perusteella.

Esillä olevan keksinnön valmistus- ja käyttötapoja kuvataan seuraavassa yleisesti siten, että farmaseuttiseen kemiaan perehtynyt alan ammatti-ihminen pystyy keksintöä soveltamaan.

Tunnetun 1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapon (US-patenttijulkaisu 3 753 993) nitraus vastaavaksi 6-nitroyhdisteeksi suoritettiin saattamalla tämä tunnettu yhdiste reagoimaan väkevän typpihapon kanssa väkevän rikkihapon läsnäollessa; reaktio suoritettiin sekoittamalla reaktantit ensin huoneen lämpötilassa ja kuumentamalla sitten reaktioseosta noin 90-110°C:ssa, sopivasti höyryhauteella. Tuote saatiin kaatamalla jäähdytetty reaktioseos ylimäärään jäävesiseosta ja osittain neutraloimalla (Ph-arvoon noin 5,5-6,0) vesipitoinen hapan liuos väkellä ammoniumhydroksidilla ja ottamalla talteen saostunut 6-nitroyhdiste.

1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-6-nitro-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo muutettiin vastaavaksi 6-aminoyhdisteeksi kuumentamalla 6-nitroyhdistettä, sopivasti höyryhauteella, natriumhydrosulfiitin (käytetään myös nimeä natriumditioniitti) kanssa alkalisessa vesipitoisessa väliaineessa, joka sisältää orgaanista liuotinta, esim. dimetyyliformamidia, jolloin liuoksen tekemiseksi alkaliseksi käytetään sopivasti natriumbikarbonaattia. 6-aminoyhdiste eristettiin tekemällä jäähtynyt reaktioseos happameksi pH-arvoon noin 5,5- edullisesti etikkahapolla, ja ottamalla talteen saostunut 6-aminoyhdiste. Vaihtoehtoisesti 6-nitroyhdiste voidaan pelkistää vastaavaksi 6-aminoyhdisteeksi katalyyttisesti hydraamalla käyttäen Pd/C-katalyysaattoria ja liuottimena etikkahappoa.

6-amino-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo muutettiin

vastaavaksi 6-fluoriyhdisteeksi valmistamalla ensin 6-diatsoniumsuola, edullisesti kloridi, käsittelemällä yhdisteen vesiliuosta noin -10°C :ssa (jäävesihaude) heksafluorifosforihapolla (lisätään varovasti yhtenä annoksena) ottamalla talteen saostunut 6-diatsoniumheksafluorifosfaatti, hydroheksafluorifosfaattina, kuumentamalla diatsoniumsuolaa noin $200-240^{\circ}\text{C}$:ssa, edullisesti noin $225-235^{\circ}\text{C}$:ssa sopivassa liuottimessa, esim. parafiiniöljyssä, liuottamalla jäähtynyt reaktioseos ammoniumhydroksidin vesiliuoksella (esim. 5-m), suodattamalla liuos ja tekemällä suodos lievästi happameksi (pH-arvoon noin 5,5) etikkahapolla ja ottamalla talteen 6-fluoriyhdiste (kaava I), joka sisälsi noin 10-15 % 6-desifluoriyhdistettä (muodostui diatsoniumsuolan hajotessa) ja jonkin verran 6-hydroksiyhdistettä.

6-fluoriyhdiste erotettiin mainituista epäpuhtauksista muuttamalla alempi-alkyyliesteriksi, edullisesti etyyliesteriksi, erottamalla esteri vastaavista 6-desfluori- ja 6-hydroksiyhdisteiden estereistä suurisuorituskykyisellä nestekromatografialla ja saippuoimalla sitten esteri kaavan I mukaisen puhtaan 6-fluorihapon saamiseksi.

Kuten jäljempänä esimerkissä 3 osoitetaan, menetelmässä b) käytetty välituote, 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-dikarboksyylimahappo valmistettiin erittäin hyvällä saannolla lisäämällä ensin väkevää NH_4OH -vesiliuosta 2-fluoribentsaldehydin ja metyyliasetoasetaatin seokseen metanolissa, jolloin saatiin dimetyyli-4-(2-fluorifenyyli)-1,4-dihydro 2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-dikarboksyylaatti, hapettamalla 1,4-dihydroyhdiste 4-m typpihapolla dimetyyli-4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-karboksylaatiksi ja saippuoimalla tämä esteri kuumentamalla sitä NaOH -metanoliliuoksessa noin $60-65^{\circ}\text{C}$:ssa, jolloin saatiin 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-dikarboksyylimahappo.

4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-karboksyylimahapon dekarboksylointi 4-(2-fluorifenyyli)-

2,6-dimetyylipyridiiniksi suoritettiin sopivasti kuumentamalla dikarboksyylihappoa noin 240-300°C:ssa edullisesti noin 240-255°C:ssa, sopivassa korkealla kiehuvaassa liuottimessa, edullisesti keittämällä dikarboksyylihappoa palautusjäähdyttäen difenyylin ja difenyyliesterin eutektisessa seoksessa (Dowtherm A), jolloin saatiin 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä ja vaihtelevia määriä 2,4-dimetyyli-5H-[1/bentsopyrano[3,4-c]pyridin-5-onia sivutuotteena, suodattamalla pois sivutuote jäähtyneestä reaktioseoksesta ja sitten eristämällä haluttu tuote. Sivutuotteen poistamisen jälkeen haluttu tuote eristettiin reaktioseoksesta uuttamalla vesipitoisella mineraalihapolla, edullisesti HCl:llä, tekemällä hapan uute alkaliseksi, edullisesti NH₄OH-vesiliuoksella, uuttamalla tuote sopivalla liuottimella, kuten kloroformilla, eetterillä ja metyleenikloridilla. Dowtherm A:n sijasta voidaan käyttää muita korkealla kiehuvia liuottimia, kuten mineraaliöljyä, dietyyliftalaattia tms. Kun käytettiin Dowtherm A:ta, joka on edullinen liuotin, havaittiin, että haluttua 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä saatiin suurempi määrä ja mainittua sivutuotetta vähemmän, kun Dowtherm A:n määrää lisättiin. Halutun tuotteen saanto huononi, kun käytettiin uudelleen kierrätettyä eli ennen käytettyä Dowther A:ta.

4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini muutettiin 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniksi lisäämällä 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiinin ja väkevän rikkihapon (ylimäärin) seokseen mooliekvivalenttinen määrä tai hieman ylimäärin metallinitraattia, edullisesti kaliumnitraattia, pitämällä reaktioseoksen lämpötila alle noin 0°C, edullisesti noin -10 - -15°C:ssa, sopivasti käyttäen suola-jäähaudetta. Kaliumnitraatin sijasta voidaan vaihtoehtoisesti käyttää muita alkalimetalli- tai maa-alkalimetallinitraatteja esim. natriumnitraattia tai kaliumnitraattia.

Kuten jäljempänä esimerkissä 6 kuvataan, 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini muutetaan erittäin hyvällä saannolla 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinika boksyyli-

5 hapoksi ensin pelkistämällä 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini katalyyttisesti hydraamalla 4-(5-amino-2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniksi (vaihtoehtoinen nimi: 3-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-fluoribentseeniamiini (esimerkki 6A), saattamalla

10 5-amino-2-fluorifenyyli-yhdiste (esimerkki 6A) reagoimaan di-alempi-alkyyli(dietyyli)etoksimetyleenimalonaatin (EMME) kanssa, jolloin saadaan di-alempi-alkyyli(dietyyli)-3-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-fluorianilinometyleenimalonaatti (esimerkiksi 6B), keittämällä esimerkin 6B

15 EMME-adduktia palautusjäähdyttäen Dowtherm A:ssa, jolloin saadaan alempi-alkyyli(etyyli)-6-fluori,1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaatti (esimerkki 6C), etyloimalla esimerkin 6C yhdiste kuumentamalla sitä etylointiaineen kanssa, so. epäorgaanisen hapon tai vahvan orgaanisen hapon etyyliesterin,

20 kuten etyylijodidin kanssa dimetyyliformamidissa vedettömän kaliumkarbonaatin läsnäollessa, jolloin saadaan etyyli-1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaatti (esimerkiksi 6D),

25 ja hydrolysoimalla esimerkin 6D yhdiste keittämällä sitä palautusjäähdyttäen NaOH-vesiliuoksessa, joka sisältää metanolia, jolloin saadaan 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo (esimerkki 6E). Vaikka karboksylaatti ety-

30 loidaan edullisesti edellä kuvatulla menetelmällä, on myös mahdollista hydrolysoida esimerkissä 6C saatu alempi-alkyyliesteri ja etyloid a saatu happo olennaisesti samoissa reaktio-olosuhteissa, joita käytettiin vastaavissa reaktio-

35 vaiheissa.

Seuraavat esimerkit valaisevat lähemmin keksintöä,

jota ne eivät kuitenkaan rajoita.

Esimerkki 1

A. 1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-6-nitro-4-okso-3-kinoliinikarboksylihappo

5 7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-1-etyyli-1,4-dihydro-4-okso-3-kinoliinikarboksylihapon (200 g) liuokseen 440 ml:ssa 95-98-%:ista rikkihappoa lisättiin sekoittaen tunnin kuluessa 90-%:isen typpihapon (80 ml) ja 95-98-%:isen rikkihapon (80 ml) seos. Saatua liuosta sekoitettiin
10 huoneen lämpötilassa vielä 20 minuuttia, sitten liuosta kuumennettiin höyryhauteella 8 tuntia. Reaktioseos sai seistä huoneen lämpötilassa yön yli, sitten seos kaadettiin 6000 ml:aan jäävettä. Sakka koottiin ja lietettiin noin 2000 ml:aan vettä. Lisättiin väkevää NH_4OH :a pH-arvoon
15 5,5-6,0. Sakka koottiin ja pestiin pienellä määrällä etanolia ja eetteriä. Lisää tuotetta saatiin käsittelemällä ensimmäistä suodosta NH_4OH :lla edellä kuvatulla tavalla. Kiteyttämällä dimetyyliformamidista saatiin useina erinä kaikkiaan 135 g (59 %) tuotetta, jonka
20 sp. oli 274-298°C. 2,8 g:n näyte kiteytettiin uudelleen 20 ml:sta dimetyyliformamidia, kiteet pestiin eetterillä ja kuivattiin 120°C:ssa 16 tuntia alennetussa paineessa (0,02 mmHg), jolloin saatiin 1,54 g 1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-6-nitro-4-
25 okso-3-kinoliinikarboksylihappoa, sp. 289-291°C.

B. 6-amino-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylihappo

35 g 1-etyyli-1,4-dihydro-6-nitro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylihappoa
30 suspendoitiin kuuman dimetyyliformamidin (350 ml), kylästetyn NaHCO_3 :n (280 ml) ja veden (70 ml) seokseen, ja suspensiota sekoitettiin ja kuumennettiin höyryhauteella, Suspensioon lisättiin annoksittain natriumhydrosulfiitin (58 g) seosta vedessä (100 ml), 20 minuutin kuluessa jona
35 aikana reaktioseos muuttui kirkkaaksi liuokseksi ja sitten

tummeni. Lisättiin uusi erä (50 ml) kyllästettyä NaHCO_3 -liuosta, ja reaktioseosta kuumennettiin 16 tuntia, jonka ajan kuluttua pelkistys ei ollut täydellinen. Lisättiin uudelleen natriumhydrosulfiittia (12 g) suoraan reaktioseokseen ja kuumennusta jatkettiin tunnin ajan, jonka ajan kuluttua pelkistys oli täydellinen (ohutkerroskromatografian mukaan). Lisättiin vettä (100 ml), joka liuotti pienen määrän liuoksesta saostunutta ainesta, ja seosta kuumennettiin vielä 90 minuuttia, jotta varmistuttaisiin täydellisestä pelkistymisestä. 1,15 g:n näyte (sp. $288-290^\circ\text{C}$ haj.) kiteytettiin uudelleen etanolista ja kuivattiin 16 tuntia suurvakuumissa 130°C :ssa, jolloin saatiin 0,9 g 6-amino-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappoa monohydraattina, sp. $>300^\circ\text{C}$.

C. 3-karboksi-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-6-kinolinyylidiatsonium-heksafluorifosfaatti

20 g 6-amino-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappomonohydraattia suspendoitiin 100 ml:aan 6-m HCl, ja suspensio pantiin jää-suolahauteeseen. Kun lämpötila oli laskenut -10°C :seen, lisättiin NaNO_2 :n (4,5 g) kylmä liuos 20 ml:ssa vettä annoksittain joidenkin minuuttien kuluessa. Reaktio-
 25 seosta sekoitettiin 5-10 minuuttia, jona aikana se muuttui kirkkaaksi liuokseksi. Heksafluorifosforihappoa (18 ml) lisättiin varovasti yhtenä annoksena, jolloin muodostui välittömästi sakka, lämpötila kohosi 0°C :seen ja laski sitten jälleen. Lisäyksen jälkeen reaktioseosta sekoitettiin 30 minuuttia, sitten sakka koottiin ja pestiin peräkkäin vedellä, pienellä määrällä kylmää etanolia ja lopuksi eetterillä. Tuotetta kuivattiin vakuumissa 50°C :ssa 48 tuntia P_2O_5 :n läsnäollessa, jolloin saatiin 29,7 g (78 %) 3-karboksi-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-
 35 4-pyridinyyli)-4-okso-6-kinolinyylidiatsoniumheksafluori-

fosfaattia hydroheksafluorifosfaattia. sp. 200-205°C (hajoaa).

D. 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo

5 19,6 g esimerkin IV diatsoniumsuolaa pantiin 3-kaulapyöröpohjakolviin, joka oli varustettu mekaanisella sekoittajalla ja yhdistetty typpipulloon. Lisättiin para-

fiiniöljyä (200 ml), laitteistosta poistettiin ilma ja laitteisto täytettiin tyrellä. Reaktioastia upotettiin

10 sitten 230°C:seen kuumennettuun öljyhauteeseen. 10 minuutin kuluttua lähtöaine muuttui kumimaiseksi ja muodosti pallon, mikä teki sekoittamisen vaikeaksi. 25 minuutin kuumennuksen jälkeen kuuma öljy dekantoitiin ja reaktio-

seoksen annettiin jäähtyä. Se pestiin sitten n-heksaanilla,

15 rikottiin survimella ja liuotettiin 5-m NH₄OH-liuokseen (noin 900 ml). Liuos suodatettiin diatomiittikerroksen lävitse, ja suodos tehtiin happameksi pH-arvoon 5,5 väkevällä etikkahapolla. Yön yli jäähdytetystä suodoksesta suodatettiin sakka (6-fluori-yhdiste), jonka todettiin

20 sisältävän jonkin verran vastaavaa 6-hydroksi-yhdistettä (massaspektri osoitti) ja 10-15 % vastaava 6-desfluori-yhdistettä (NMR-spektri osoitti). Uudelleenkiteyttämällä dimetyyliformamidista saatiin ensimmäinen erä 4,4 g

(43 %) ja toinen erä 1,5 g (15 %). Useiden valmistuserien

25 tuotteet yhdistettiin, ja niiden todettiin kahden uudelleenkiteytyksen jälkeen DMF:stä sisältävän vielä noin 10 % 6-desfluori-yhdistettä. Yhdiste puhdistettiin lopullisesti (esimerkki 2) muuttamalla se etyyliesteriksi, erottamalla se 6-desfluori-yhdisteestä suurisuoritusky-

30 kyisellä nestekromatografiolla ja saippuoimalla sitten jälleen hapoksi.

Esimerkki 2

A. Etyyli-1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaatti

35 12,3 g 6-fluori-yhdistettä, joka sisälsi noin 10 %

6-desfluoriyhdistettä (esimerkin 1D lopputuote) ja toinen 12,2 g samaa 6-fluoriyhdistettä joka oli saatu toisten valmistuserien emäliuoksista, joiden puhtausaste vaihteli, muutettiin etyyliesteriksi (14,8 g) keittämällä palautus-
 5 jäähdytettään 48 tuntia 1-m HCl-etanoliliuoksessa, joka sisälsi pienen määrän trietyyliortoformiaattia veden sitomiseksi (tyypillisessä esimerkissä 600 ml 1-m HCl-etanoliliuosta ja 3 ml trietyyliortoformiaattia 5,0 g:aa kohti fluori-yhdistettä). 14,8 g esteriä puhdistettiin prepara-
 10 tiivisellä HPLC:llä käyttäen liuotinsysteemiä asetoni/heksaani 60:40, jolloin saatiin 8,3 g puhdasta 6-fluories-teriä, so. etyyli-1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaattia. jota käytettiin suoraan seuraavassa vaiheessa (esimerkki
 15 2B).

B. 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo

8,3 g:aan esimerkissä 2A saatua etyyliesteriä lisättiin 200 ml vettä ja 1,8 g natriumhydroksidia. Seosta
 20 kuumennettiin höyryhauteella 3,5 tuntia, jonka jälkeen hydrolyysi oli epätäydellinen. Lisättiin vielä 0,9 g natriumhydroksidia ja kuumennusta jatkettiin 16 tuntia. Kuuma reaktioseos suodatettiin ja suodoksen annettiin jäähtyä, sitten se tehtiin happameksi pH-arvoon 5-5,5 vä-
 25 kevällä etikkahapolla. Sakka koottiin ja pestiin peräkkäin vedellä, etanolilla ja eetterillä. Tuote kiteytettiin uudelleen dimetyyliformamidista, jolloin saatiin 6,7 g (88 %) 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappoa, sp.
 30 >300°C.

Esimerkki 3

A. Dimetyyli-4-(2-fluorifenyyli)-1,4-dihydro-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiiniidikarboksylaatti

2-fluoribentsaldehydiä (119 g), metanolia (600 ml)
 35 ja metyyliasetoasetaattia (255 ml) sisältävään liuokseen

lisättiin sekoittaen 200 ml väkevää ammoniumhydroksidia, jolloin alkoi eksoterminen reaktio. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 30 minuuttia, sitten keitetiin palautusjäähdyttäen joitakin tunteja ja sen-
 5 jälkeen seos sai seistä huoneen lämpötilassa yön yli (noin 15 tuntia). Kiteinen keltainen sakka koottiin, pestiin eetterillä ja kuivattiin 50-60°C:ssa, jolloin saatiin 201 g dimetyyli-4-(2-fluorifenyyli)-1,4-dihydro-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiinidikarboksylaattia, sp. 206-
 10 208°C. Konsentroimalla emäliuos saatiin toinen erä, 26,4 g tuotetta, sp. 204-206°C. Kokonaissaanto oli 74 %.

B. Dimetyyli-4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiinidikarboksylaatti

15 600 ml:aan 90-%:ista typpihappoa (70°C) lisättiin sekoittaen 20 minuutin kuluessa 302,9 g dimetyyli-4-(2-fluorifenyyli)-1,4-dihydro-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiinidikarboksylaattia. Reaktioseosta kuumennettiin höyryhau-
 teella tunnin ajan, sitten seos sai jäähtyä samalla se-
 20 koittaen sitä 2 tuntia. Reaktioseos jäähdytettiin ja tehtiin emäksiseksi ammoniumhydroksidiliuoksella. Muodostunut sakka koottiin, pestiin vedellä ja kuivattiin vakuuimissa 75°C:ssa, jolloin saatiin 302,8 g keltaista kiinteätä ainetta. Kiinteä aine lietetettiin veteen, koottiin, pestiin
 25 vedellä ja kuivattiin vakuuimiuunissa 65°C:ssa, jolloin saatiin 273,7 g (90 %) tuotetta, sp. 85-88°C, jota käytettiin suoraan seuraavassa vaiheessa (esimerkki 3C).
 20 g edellä saatua tuotetta kuivattiin 70°C:ssa, kiteytettiin n-heksaanista ja kuivattiin vakuuimiuunissa
 30 65°C:ssa, jolloin saatiin 15,9 g dimetyyli-4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiinidikarboksylaattia. sp. 94-96°C.

C. 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-
karboksyylihappo

Dimetyyli-4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-
dikarboksylaattia (69 g), metanolia (300 ml) ja
5 35-%:ista NaOH-vesiliuosta (100 ml) sisältävää seosta
keitettiin palautusjäähdyttären ja sekoittaen 5 tuntia,
ja sitten seos sai seistä huoneen lämpötilassa yön yli.
Metanoli poistettiin kiertohaihduttimessa ja jäännöksenä
saatuun nesteeseen lisättiin 200 ml, vettä seos suodatet-
10 tiin. Suodos tehtiin happameksi väkevällä kloorivetyhapolla,
jolloin saostui kermanvärinen kiinteä aine, joka pestiin
vedellä ja kuivattiin 80-85°C:ssa, jolloin saatiin
52,6 g (88 %) 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyri-
diinikarboksyylihappoa, sp. >285°C.

15 Esimerkki 4

4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini

1400 ml:aan 240-245°C:seen kuumennettua Dowtherm
A:ta lisättiin 10 minuutin kuluessa 113 g 4-(2-fluori-
fenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-
dikarboksyylihappoa,
20 ja reaktioseosta keitettiin 50 minuuttia, sitten seos
jäähdytettiin ja jätettiin huoneen lämpötilaan yöksi.
Kiteinen sakka, joka on alla identifioitu sivutuote,
suodatettiin ja suodos uutettiin 700 ml:lla 3-m kloori-
vetyhappoa ja sitten toisen kerran 300 ml:lla 3-m kloori-
25 vetyhappoa. Yhdistetyt happamet uutettiin emäksi-
seksi ammoniumhydroksidin vesiliuoksella ja uutettiin
sitten 800 ml:lla kloroformia. Haihduttamalla kloroformi
saatiin ruskea kiinteä aine ja nesteen seos, siihen
lisättiin 300 ml n-heksaania ja seos jäähdytettiin.
30 Kiinteä aine suodatettiin ja kuivattiin. Tämä kiinteä
aine, joka oli sama kuin edellä saatu kiinteä sivutuo-
te, yhdistettiin viimeksi mainitun kanssa, yhteensä saa-
tiin 25,4 g (29%) 2,4-dimetyyli-5H-1/bentsopyrano
/3,4-c/pyridin-5-onia, sp. 194-197°C.
35 Suodos haihdutettiin kuiviin höyryhauteella, jäännös

liuotettiin etanoliin ja liuos haihdutettiin kiertohaihduttimessa, jolloin saatiin 55,2 g (70 %) nestemäistä 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä.

Toisessa edellä kuvatulla tavalla suoritettussa valmistuksessa käytettiin 113 g 2-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-*karboksyylihappoa*, 1,1 litraa talteenotettua Dowtherm A:ta (käytetty edellisessä valmistuserässä), joka oli suodatettu diatomiittikerroksen lävitse ja 300 ml uutta Dowtherm A:ta, jolloin saatiin 28,4 g (32 %) sivutuotetta, 2,4-dimetyyli-5H- λ^7 bentsopyrano[3,4-c]pyridin-5-onia, sp. 193-196°C ja 44,8 g (57 %) 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä nestemäisenä vapaana emäksenä. Vielä erässä valmistuserässä käytettiin suhteellisesti pienempää määrää Dowtherm A:ta, so. 1200 ml, ja 200 g 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiini-*karboksyylihappoa*, jolloin sivutuotetta saatiin suhteellisesti suurempi määrä, nimittäin 57 g (36,7%) 2,4-dimetyyli-5H- λ^7 bentsopyrano[3,4-c]pyridin-5-onia ja 42 g (30 %) 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä vapaana emäksenä.

Edellä saadut kolme erää sivutuotetta yhdistettiin, kiteytettiin metanolista ja kuivattiin 70-75°C:ssa, jolloin saatiin 141 g 2,4-dimetyyli-5H- λ^7 bentsopyrano[3,4-c]pyridin-5-onia, sp. 204-207°C.

Edellä saadut kolme erää 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä yhdistettiin ja sekoitettiin hyvin n-heksaanin (400 ml) ja 3-m HCl-vesiliuoksen (600 ml) kanssa. Vesikerros erotettiin, sitä käsiteltiin värinpoistohiellällä ja liuos haihdutettiin kuiviin kiertohaihduttimessa, saatiin valkea jäämös. Noin 9 g:n näyte kiteytettiin isopropyylialkoholista ja kuivattiin P₂O₅:n yllä huoneen lämpötilassa, jolloin saatiin 7,8 g 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini-hydrokloridihemihydraattia, sp. 200-203°C. Loppuosa kiinteästä jäännöksestä liuotettiin 700 ml:n vettä, liuos tehtiin alkaliseksi ammoniumhydrok-

sidin vesiliuoksella, ja alkalinen liuos uutettiin kloroformilla (2 x 500 ml). Haihduttamalla kloroformi saatiin 148 g 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä vaaleanruskeana nesteenä, jota käytettiin suoraan seuraavassa vaiheessa (esimerkki 5).

Esimerkki 5

4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini

Suola-jäähäuteessa -10 - -15°C:seen jäähdytettävään väkevään rikkihappoon (55 ml) lisättiin 5 minuutin kuluessa 10,1 g kaliumnitraattia. 10 minuutin sekoittamisen jälkeen seos lisättiin tipoittain 30 minuutin kuluessa 18,5 g:aan 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä, jolloin erottui kumimainen kiinteä aine ja saatiin viskoosinen lite, ja reaktiolämpötila kohosi noin 0°C:seen. Sekoittamisen helpottamiseksi lisättiin vielä 50 ml:n annos väkevää rikkihappoa tipoittain 15 minuutin kuluessa, ja saatua seosta sekoitettiin ensin suola-jäähäuteessa sekä sen jälkeen ilman jäähdytystä noin 5 tuntia antaen samalla reaktioseoksen lämpötilan kiehota huoneen lämpötilaan. Reaktioseos kaadettiin suureen ylimäärään jäätä, ja seos neutraloitiin lisäämällä ammoniumhydroksidin vesiliuosta. Muodostunut vaaleankeltainen höytymäinen sakka koottiin, pestiin vedellä ja ilmakuivattiin. Sakka liuotettiin sitten 300 ml:aan kloroformia, liuosta käsiteltiin värinpoistohiilellä, ja liuos suodatettiin. Suodos haihdutettiin kiertohaihduttimessa, ja jäännös lietettiin 200 ml:aan eetteri/n-heksaaniseosta 1:1, seos suodatettiin ja koottu kiinteä aine kuivattiin 70-75°C:ssa, jolloin saatiin 18,67 g (84 %) 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä, sp. 169-171°C.

Esimerkki 6

A. 3-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-fluoribentseeniamiini

180 g 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniä jaettiin 4:ksi yhtä suureksi osaksi, joista

jokainen pelkistettiin erikseen seuraavasti: 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiinin (45 g), etikkahapon (200 ml) ja platinadioksidin (800 mg) seos hydrat-
 tiin katalyyttisesti kunnes vedyn sitoutuminen lakkasi,
 5 so. noin 4 tuntia, josta viimeisten 30 minuutin aikana
 vetyä sitoutui vain vähän. Katalysaattori suodatettiin,
 pestiin 300 ml:lla vettä ja suodos tehtiin emäksiseksi
 lisäämällä ammoniumhydroksidin vesiliuosta. Liuos jääh-
 dytettiin, jolloin saatiin öljymäistä ainetta, joka muut-
 10 tui kiinteäksi. Kiinteä aine koottiin, pestiin vedellä
 ja kuivattiin, jolloin saatiin haluttu amiini. Muut kol-
 me 45 g:n annosta 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dime-
 tyyli-4-pyridinyyliä pelkistettiin samalla tavalla, ja yhdiste-
 tyt amiini-yhdisteet liuotettiin 600 ml:aan väkevää
 15 kloorivetyhappoa, liuosta kuumennettiin ja sekoitet-
 tiin höyryhauteella 4,5 tuntia, sitten sitä käsiteltiin
 värinpoistohiilellä. Hiili suodatettiin ja suodos tehtiin
 emäksiseksi lisäämällä ammoniumhydroksidin vesiliuosta,
 saatu seos jäähdytettiin, jolloin siitä erkani öljy,
 20 joka kiteytyi. Kiteinen tuote koottiin, pestiin vedellä
 ja kuivattiin uunissa, jolloin saatiin 164,9 g kumimaista
 kiinteätä ainetta. Se liuotettiin eetteriin, joka sisälsi
 5 % metanolia, ja liuos suodatettiin silikageelikerroksen
 lävitse kumimaisten epäpuhtauksien poistamiseksi.
 25 Seoksesta poistettiin vakuumitislamalla eetteri-metanoli-
 liuotin, ja jäännös kiteytettiin eetteri-isopropyyli-
 alkoholiseoksesta, jolloin saatiin 80,9 g 3-(2,6-dime-
 tyyli-4-pyridinyyli)-4-fluoribentseeniamiinia, sp.
 142-145°C. Konsentroimalla emäliuos saatiin vielä 43,4 g
 30 tuotetta, sp. 141-145°C, joten kokonaissaanto oli 82 %.

B. Dietyyli-4-fluori-3-(2,6-dimetyyli-4-pyridi-
 nyyli)anilinometyleenimaloaatti

3-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-fluoribentseeni-
 amiinin (122 g), dietyylietoksimetyleenimalonaatin 130 g)
 35 ja tolueenin (120 ml) seosta kuumennettiin ja sekoitettiin

130-135°C:ssa 3,5 tuntia käyttäen ilmajäähdytintä ja antaen etanolin tislautua reaktioseoksesta. Reaktioseos jäähdytettiin ja liuotettiin 1 litraan kiehuvaa n-heksaania. Kuuma liuos suodatettiin diatomiittiker-
 5 roksen lävitse, diatomiitti pestiin kuumalla n-heksaanilla (400 ml) ja yhdistetyt suodos ja pesuaineet saivat seistä huoneen lämpötilassa 18 tuntia. Erottunut valkea kiteinen aine koottiin, pestiin n-heksaanilla ja kuivattiin 60-65°C:ssa, jolloin saatiin 159,6 g
 10 (74 %) dietyyli-4-fluori-3-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli) anilinometyleenimalonaattia, sp. 99-100°C. Toinen erä (67 g) raakatuotetta saatiin emäliuoksesta, ja sitä käsiteltiin ilman enempää puhdistamista seuraavassa esimerkissä 6C, kuvatulla tavalla jolloin saatiin 35,2 g
 15 esimerkin 6C tuotetta (sp. >300°C).

C. Etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaatti

1300 ml:aan kiehuvaa Dowtherm A:ta 2 litran erlenmeyer-pullossa, joka oli kääritty alumiinipaperiin (Dowtherm A:n lämpötilan pitämiseksi noin 260-
 20 265°C:ssa), lisättiin 5 minuutin kuluessa 154 g dietyyli-4-fluori-3-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)anilino-metyleenimalonaattia. Reaktiolämpötila pidettiin samana noin 20 minuuttia, sitten reaktioseoksen annettiin
 25 jäähtyä. Saostunut ruskea sakka koottiin, pestiin peräkkäin eetterillä ja etanolilla ja kuivattiin 90-95°C:ssa, jolloin saatiin 107,4 g (79 %) etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaattia, sp. >300°C.

30 D. Etyyli-1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaatti

Etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaatin (34 g), hienoksijauhetun vedettömän kaliumkarbonaatin ja dime-
 35 tyyliformamidin (250 ml) seosta kuumennettiin höyry-

hauteella sekoittaen 20 minuuttia, sitten seokseen lisättiin 20 minuutin kuluessa 9 ml etyylijodidia. Reaktioseosta kuumennettiin höyryhauteella sekoittaen 2,5 tuntia, sitten seos haihdutettiin kuiviin kierto-

5 haihduttimessa. Jäännöstä ravisteltiin perusteellisesti veden (300 ml) ja kloroformin (500 ml) kanssa. Kerrokset erotettiin, ja vesikerros uutettiin vielä 200 ml:lla kloroformia. Yhdistetyt kloroformiuutteet haihdutettiin vakuumissa kloroformin poistamiseksi.

10 Jäännöksenä saatu kiinteä aine liuotettiin 150 ml:aan kuumaa isopropyylialkoholia, kuumaa liuosta käsiteltiin värinpoistohiilellä, sitten suodatettiin. Suodos haihdutettiin kiertohaihduttimessa noin 50 ml:ksi, joka laimennettiin eetterillä, kunnes syntyi samennus. Seos sai

15 jäähtyä, ja erottunut kiteinen aine koottiin, pestiin eetterillä ja kuivattiin 80-85°C:ssa, jolloin saatiin 18,5 g etyyli-1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaattia, sp. 221-224°C. Konsentroimalla edelleen emäliuosta

20 saatiin vielä 3,4 g (60 %) kokonaissaanto tuotetta. sp. 220-223°C. Suuremmassa mittakaavassa (0,3 moolin mittakaava) edellä olevaa yhdistettä (sp. 222-225°C) saatiin 80% :n saannolla.

E. 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyyl-

25 happo

Etyyli-1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaatin (98 g), 35-%:isen NaOH-vesiliuoksen (50 ml), veden

30 (500 ml) ja metanolin (100 ml) seosta keitettiin palautusjäähdyttäen ja sekoittaen 90 minuuttia, ja saatu ruskea liuos tehtiin happameksi etikkahapolla, jolloin siitä saostui vaaleankeltainen sakka.

Seos sai seistä huoneen lämpötilassa noin 2 tuntia, sakka

35 koottiin, pestiin peräkkäin vedellä ja etanolilla ja

kuivattiin sitten 90-95°C:ssa, jolloin saatiin 86,8 g (95 %) 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylihappoa, sp. >310°C.

1 etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylihapon (kaavan I ja esimerkkien 2B ja 6E mukainen yhdiste, josta seuraavassa käytetään nimitystä Win 52 522) käyttökelpoisuus ja ainutlaatuinen korkea teho antibakteerisena aineena, jolla on laajaspektrinen antimikrobinen aktiivisuus, osoitetaan seuraavissa kokeissa.

Koe 1

Win 52 522:n Win 35 439:n, metisilliinin ja vankomysiinin antibakteerisen aktiivisuuden vertailu in vitro

Kuten edellä huomautettiin Win 52 522 on kaavan I mukainen, edellä esimerkissä 2B valmistettu yhdiste. Win 35 439 on sen 6-desfluori-analogi. Metisilliini, jota käytetään natriumsuolana (The Merck Index, 10. painos, 5842), on 6-(2,6-dimetoksibentsamido)penisillaanin Na-suola. Vankomysiini, jota käytetään hydrokloridina (The Merck Index, 10. painos, 9731), on amfoteerinen glykopeptidiantibiootti.

Yhteenveto - Win 52 522 (MIC-arvot $\leq 0,008-0,5$ $\mu\text{g/ml}$) oli 2-8 kertaisesti vaikuttavampi kuin Win 35 439 in vitro useita gram-positiivisia kokkeja vastaan esim. S.aureus, S. epidermidis ja Streptococcus -lajeja vastaan. Win 52 522 oli 32 - >8000 -kertaisesti vaikuttavampi kuin metisilliini ja 16-125 kertaisesti vaikuttavampi kuin vankomysiini in vitro Staphylococcus -lajeja vastaan. Win 52 522:n aktiivisuus S. pyogenes ja S.pneumoniae - lajeja vastaan oli 1/2-1/8 metisilliinin aktiivisuudesta, mutta 32 - >500 kertainen metisilliinin aktiivisuuteen verrattuna S. faecalis-lajia vastaan. Win 52 522 oli bakterisidinen (MBC/MIC ≤ 4) kaikkia 39 kokeiltua bakteerikantaa vastaan.

Johdanto - Tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää

vertailevissa in vitro kokeissa Win 52 522:n, Win 35 439:n, metisilliinin ja vankomysiinin antibakteerinen aktiivisuus *Staphylococcus* ja *Streptococcus* -kantoja vastaan. Kokeissa tutkittiin myös *Escherichia coli* ja *Pseudomonas aeruginosa* -kantoja Win 52 522:n vaikutuksen osoittamiseksi gram-negatiivisia mikro-organismeja vastaan

5 verrattuna Win 35 439:n vastaavaan vaikutukseen.

Yhdistevalmisteet - Win 52 522 ja Win 35 439 liuotettiin 0,1 ml:aan 0,5-m NaOH/mg yhdistettä, ja liuos laimennettiin steriilillä tislattulla vedellä konsentraatioon 160 µg/ml. Vankomysiini ja metisilliini liuotettiin steriiliin tislattiin veteen 1250 µg/ml (perusyhdisteenä). Perusliuokset steriloidtiin suodattamalla

10 membraanisuodatimilla, huokoskoko 0,45 µm.

Väliaineet

15 Mueller-Hinton-liemi (MHB) - BBL
 Mueller-Hinton-agar (MHA) - BBL
 Aivo-sydän -infuusio (BHI) - liemi - Difco
 Aivo-sydän-infuusio (BHI -agar - Difco
 Normaali hevosseerumi (NHS) - Gibco

20 Bakteeriviljelmät - Taulukon I (jäljempänä) kaikkia muita bakteeriviljelmiä kasvatettiin yön yli 37°C:ssa MHB:ssä paitsi *Streptococcus* -kantojen viljelmiä. Niitä kasvatettiin BHI:ssä, jossa oli lisänä 10% NHS. Yön yli viljeltyjen viljelyliemien optinen tiheys

25 (650 nm, B L Spectronic 20) säädettiin arvoon 0,10 steriilillä tislattulla vedellä, minkä jälkeen liemi laimennettiin sisältämään $6,7 \times 10^6$ solua/ml MHB:ssä tai BHI + 1 NHS -liemessä.

Minimiestokonsentraatiokoe (MIC) - Yhdisteiden

30 liuoksista valmistettiin sarja kaksinkertaisia laimennuksia MHB-liemeen (tai BHI + 1 % NHS -liemeen streptokokkikokeissa), ja liuoksia pantiin 96 syvennystä käsittävän mikrotitterilevyn syvennyksiin 0,1 ml/syvennys käyttäen Sandy Springs (Bellco Glass Co) jakelulaitetta.

35 Levyille ympättiin sitten 0,0015 ml suspensiota, joka

sisälsi $6,7 \times 10^6$ solua/ml sopivaa ymppeä käyttäen MIC-2000 inokulaattoria (Dynatech Corp.), jolloin lopullinen ymppimäärä oli noin 1×10^4 solua/syvennys eli 1×10^5 solua/ml. Levyjä inkuboitiin 37°C :ssa 18-20
 5 tuntia, ja minimiestokonsentraatio (MIC), joka määritellään yhdisteen alimmaksi konsentraatioksi, joka estää näkyvän bakteerikasvun, todettiin.

Minimibakterisidinen konsentraatio (MBC)-koe - MIC-arvijen toteamisen jälkeen mikrotitterilevyjen sisältö sekoitettiin perusteellisesti laitteessa
 10 Bellco Mini-orbital Shaker (Bellco Glass Co) 3 minuutin ajan säätimen asennossa 8. Kustakin syvennyksestä siirrettiin sitten näyte (0,0015 ml) MIC-2000 inokulaattorilla levyille, jotka sisälsivät MHA-agaria tai
 15 BHI-agaria + 10 % NHS. Levyjä inkuboitiin 37°C :ssa 18-20 tuntia. Minimibakterisidinen konsentraatio (MBC), joka määritellään yhdisteen alhaisimmaksi konsentraatioksi, joka estää havaittavan pesäkkeen muodostumisen agarin pinnalle, todettiin.

20 Tulokset ja niiden tarkastelu - Yksittäisten kokeiden tulokset nähdään taulukossa 1 ja tulokset yhdistelmämuodossa taulukossa 2.

Taulukko I: Win 52 522:n, Win 35 439:n, metisilliinin ja vankomysiinin in vitro antibakteerinen aktiivisuus MIC- ja MBC-arvot ($\mu\text{g/ml}$)

Bakteerit	Win 52 522		Win 35 439		Metisilliini		Vankomysiini	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> 13-8-A	0,03	0,03	0,06	0,125	1	2	0,5	0,5
" " 4-81	0,015	0,03	0,06	0,125	2	2	0,5	0,5
" " 24-01	0,015	0,03	0,06	0,125	1	2	0,5	0,5
" " 34-81	0,03	0,03	0,06	0,06	1	2	0,5	0,5
" " 41-81	0,015	0,015	0,06	0,25	1	1	1	1
" " 21-RIA	0,015	0,015	0,06	0,125	1	1	0,5	1
" " S-234	0,015	0,03	0,06	0,125	0	32	1	1
" " S-500	0,03	0,06	0,125	0,25	0	32	1	1
" " 10-81	0,015	0,03	0,125	0,125	0	16	1	1
" " 59-81	0,015	0,03	0,125	0,25	32	64	1	1
" " 39881	0,015	0,03	0,06	0,06	125	>125	1	1
" " Smith	0,03	0,03	0,125	0,125	1	1	1	1
" " (75923)*	0,015	0,03	0,125	0,125	2	2	1	1
" " Glorino	<0,008	0,015	0,03	0,125	2	4	1	1
" " VA16051	0,015	0,015	0,06	0,06	4	0	1	1
<i>S. epidermidis</i> 112228)*	0,06	0,06	0,25	0,25	4	4	1	1
" " (179171)*	0,06	0,125	0,5	0,5	4	4	1	1
(ATCC No. 17917)								
" " 1-3-B	0,06	0,06	0,25	0,25	2	4	1	1
" " 1-5-B	0,06	0,06	0,25	0,25	1	2	2	2
" " 2-1-B	0,03	0,03	0,25	0,25	1	2	1	2
<i>S. pyogenes</i> C203	0,5	0,5	4	>16	0,125	0,125	16	16
" " (89)*	0,5	0,5	4	>16	<0,06	<0,06	16	16
" " 7948-15	0,5	0,5	4	>16	0,25	0,125	16	16
<i>S. pneumoniae</i> tyyppi I	0,25	0,25	2	2	<0,06	<0,06	16	16
" " II	0,5	0,5	4	4	0,125	0,125	0,06	16
<i>S. faecalis</i> (11700)*	0,25	0,25	1	1	64	64	1	>125
" " 4510	0,125	0,125	0,5	0,5	64	64	2	>125
" " (8043)*	0,25	0,5	1	2	>125	>125	1	>125
<i>S. enterococcus</i> 0-2-13	0,25	0,25	2	2	0	0	0,25	16
<i>E. coli</i> Vogel	0,25	0,5	2	2				
" " 198	0,5	0,5	2	2				
" " (H719)*	0,25	0,25	0,5	0,5				
" " AH719	0,25	0,25	0,5	0,5				
" " 2150	0,25	0,25	0,5	0,5				
<i>P. aeruginosa</i> MCH-2	16	16	0	16				
" " (7700)*	16	16	16	>16				
" " (15442)*	16	16	>16	>16				
" " (9027)*	4	16	0	>16				
" " (27853)*	16	16	16	>16				

ATCC No.
* SWRI No.

Taulukko 2 Estoarvot (MIC) ja bakteerisidiset arvot (MBC)

Bakteerit (kokeiltujen lukumäärä) Yhdiste	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MBC ($\mu\text{g/ml}$)		
	50%	90%	Alue	50%	90%	Alue
<u>S. aureus (15)</u>						
Win 52,522	0,015	0,03	<0,008-0,03	0,03	0,03	0,015-0,06
Win 35,439	0,06	0,125	0,03 -0,125	0,25	0,5	0,125-0,5
Metisilliini	2	8	1 -125	4	>64	2 ->64
Vankomysiini	1	1	0,5 -1	1	1	0,5 -1
<u>S. epidermidis (5)</u>						
Win 52,522	0,06	0,06	0,03 -0,06	0,06	0,06	0,03 -0,125
Win 35,439	0,25	0,25	0,25 -0,5	0,25	0,25	0,25 -0,5
Metisilliini	2	4	1 -4	4	4	2 -4
Vankomysiini	1	1	1 -2	1	2	1 -2
<u>Streptococcus sp. (9)</u>						
Win 52,522	0,25	0,5	0,125 -0,5	0,5	0,5	0,125-0,5
Win 35,439	2	4	0,5 -4	2	>16	0,5 ->16
Metisilliini	0,25	64	<0,06 ->125	0,125	64	<0,06 ->125
Vankomysiini	2	16	<0,06 -16	16	>125	-16 ->125
<u>E. coli (5)</u>						
Win 52,522	0,25	0,25	0,25 -0,5	0,25	0,5	0,25 -0,5
Win 35,439	0,5	2	0,5 -2	0,5	2	0,5 -2
<u>P. aeruginosa (5)</u>						
Win 52,522	16	16	4 -16	16	16	16
Win 35,439	16	16	8 ->16	>16	>16	->16

Taulukosata 1 voidaan nähdä, että Win 52 522 oli bakterisidinen kaikkien gram-positiivisten ja gram-negatiivisten kokeiltujen kantojen suhteen (MBC/MIC₅₀).

Win 35 439 oli bakteriostaattinen kolmen *S. pyogenes* -kannan suhteen. Vaikka metisilliini oli heikommin vaikuttava kuin Win 52 522, se oli kuitenkin myös bakterisidinen gram-positiivisten kokkien suhteen, kun taas vankomysiini oli bakteriostaattinen yhden *S. pneumoniae* -kannan ja kaikkien 4 *S. faecalis* -kantojen suhteen.

Win 52 522 oli verrattuna Win 35 439 2-8 kertaisesti voimakkaammin vaikuttava in vitro gram-positiivisia kokkeja ja *E. coli* -kantoja vastaan ja yhtä tehokas *P. aeruginosa* -kantoja vastaan. Nämä tulokset ovat yhtäpitäviä in vivo suoritettujen hiiren suojauskokeiden kanssa, Win 52 522:n teho oli 3,6 (s.c) - 3,9 (p.o) -kertainen Win 35 439:n tehoon verrattuna *S. aureus* -infektiossa ja 2,6 (s.c) - 2,0 (p.o) -kertainen *E. coli* -infektiossa (koe 3).

Win 52 522:n teho in vitro *Staphylococcus* -kantoja vastaan oli metisilliinin tehoon verrattuna 32 - > 8000-kertainen, *S. faecalis* -kantoja vastaan - >500-kertainen, mutta *S. pyogenes* ja *S. pneumoniae* -kantoja vastaan metisilliinin teho oli 2-8 kertainen Win 52 522:n tehoon verrattuna.

Win 52 522:n teho in vitro gram-positiivisia kokkeja vastaan oli vankomysiinin tehoon verrattuna 16-125-kertainen kahta poikkeusta lukuunottamatta: 1) *S. pneumoniae* tyyppin III suhteen vankomysiinin teho oli 8-kertainen Win 52 522:n tehoon verrattuna, ja 2) yhden kokeillun enterokokin (kanta 0-2-B) suhteen tehot olivat yhtä hyvät.

Nämä in vitro -kokeiden tulokset tukevat in vivo -kokeissa saatuja tuloksia, jotka osoittavat Win 52 522:n tehon hiiren metisilliini-resistentissa *Staphylococcus aureus* -infektiossa olevan 16-kertainen vankomysiinin

tehoon verrattuna ja >91-kertainen metisilliinin tehoon verrattuna.

Tässä esitetyistä in vitro -tuloksista ja jäljempänä (loe 3) esitetyistä in vivo -tuloksista voidaan
 5 vetää johtopäätös, että Win 52 522 on jopa tehokkaampi kuin vankomysiini, kun kyseessä on syvällä olevan kudoksen stafylokokki-infektion torjuminen. Vankomysiiniä käytetään vaihtoehtoisena lääkkeenä silloin kun kyseessä on penisillinaasia tuottava *S. aureus* (The Choice of
 10 Antimicrobial Drugs, Medical Letter, 0,50,3.1982) ja silloin, kun kyseessä on metisilliini-resistentti *Staphylococcus aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. United States Morbidity And Mortality Weekly Report, 20.11.1981, vol, 30, no. 45 557).

15 Koe 2
Win 52 522:n, Win 35 439:n, rosoksasiinin, norfloksasiinin, perfloksasiinin ja tetrasykliinin antimikrobinen aktiivisuus suussa esiintyvi-
infektioita aiheuttavia anaerobisia ja mikroaerofiilisiä bakteereja
 20 vastaan

Suuinfektiot

Yhteenveto - Win 52 522:n todettiin olevan erittäin aktiivinen kaikkia 13 kokeiltuna anaerobista mikro-organismia vastaan ja tehokkaampi kuin tetrasykliini,
 25 nykyisin käytetty antibiootti.

Johdanto - Yleisesti hyväksytyn käsityksen mukaan tietyt mikro-organismit ovat periodontaalitautien (juurikalvon tulehdustauti) primaarisia etiologisia aiheuttajia (Socransky et al., Present Status of Studies on
 30 the Microbial Etiology of Periodontal Diseases, sivut 1-14; R. Genco ja S. Mergenhagen (toim.), Host-Parasite Interactions in Periodontal Diseases, 1982, Amer. Soc. Micro. Washington DC.). Lisäksi on saatu yhä enemmän todisteita, jotka tukevat olettamusta, että spesifiset
 35 mikro-organismit ovat yhteydessä eri periodontaalitau-

5 din muotoihin (Socransky et al., supra). Näin ollen on
 ollut järkevää pyrkiä käyttämään antimikrobisia aineita
 näiden maallimanlaajuisten tautien estämiseen, kontrol-
 liin ja käsittelyyn. Erilaisten eläinmallien avulla on
 10 todistettu, että antamalla erilaisia antibiootteja voi-
 daan vähentää ientulehduksen kliinisiä merkkejä sekä
 myös vähentää aggressiivisten periodontaalitautien
 yhteydessä esiintyvää hammaskuopan luuhäviötä (Gibson,
 Antibiotics and Periodontal Disease: A. Selective Review,
 10 J. Amer. Dent. Assoc. 104, 213-218, 1982). Ihmisellä
 nämä tulokset näyttävät myös tukevan käsitystä, että
 antimikrobiset aineet ovat erittäin käyttökelpoisia
 jo olemassa olevan taudin käsittelyyn varsinkin käytet-
 tyinä tavanomaisen terapian tukena (Gibson, supra).
 15 Tässä suhteessa varsinkin tetrasykliini- ja metroni-
 datsoli-antibioottien on osoitettu olevan käyttö-
 kelpoisia (Genco, Antibiotics in the Treatment of
 Human Periodontal Diseases. J. Periodontol. 52. 545-558.
 1981); nämä aineet eivät kuitenkaan näytä olevan ihan-
 20 teellisia, sillä ne eivät ole aktiivisia kaikkia niitä
 mikro-organismeja vastaan, joiden katsotaan olevan
 osallisia taudinkulussa. Lisäksi yhä useammassa jul-
 kaisuissa ilmoitetaan periodontaalitautien ns. primaa-
 risten patogeenien jo osoittaneen lisääntyntä sieto-
 25 kykyä näille aineilla (Gibson, supra, Genco, supra ja
 Williams et al., Subgingival Microflora of Periodontal
 Patients on Tetracycline Therapy, J. Clin. Periodontol.
6, 210-215, 1979). On siten olemassa tärkeä tämän hetken
 tarve keksiä ja kehittää uusia antimikrobisia aineita,
 30 joilla on käyttöä periodontaalitautien estämisessä ja
 käsittelyssä. Tässä kuvatut tutkimukset osoittavat,
 että Win 52 522:n todettiin olevan erittäin aktiivinen
 useita erilaisia periodontaalitautien yhteydessä esiin-
 tyviä anaerobisia mikro-organismeja vastaan.

35 Mikro-organismit - Näissä tutkimuksissa käytetyt

mikro-organismit on lueteltu jäljempänä esitetystä taulukossa A.

Viljelyolosuhteet

1. Säilytys - Ennen käyttöä kaikkia kantoja säilytettiin lyofilisoituina. Kokeiden aikana viljelmiä tutkittiin veriagarperusväliaineella, johon oli lisätty 5,0 % (vol/vol) defibrinoitua kaniinin verta. Viljelmien siirto suoritettiin viikoittain, ja kaikkia viljelmiä inkuboitiin anaerobisessa kaasukehässä (GasPak jar; BBL).
2. Agarväliaine - Peruskoeväliaine sisälsi tryptikaasi-soija-agaria (40 g), hiivauutetta (1 g), glukosia (2 g) ja 960 ml tislattua vettä pH 7,2 (Mashimo et al., J. Clin. Micro. 17, 187-191, 1983). Steriloinnin ja 50°C:seen jäädytyksen jälkeen väliaineeseen lisättiin 4 % (vol/vol) defibrinoitua kaniinin verta ja 0,5 µg/ml menadionia (K₃-vitamiinia). Kokeiltava yhdiste lisättiin myös tässä vaiheessa haluttuna konsentraationa. Levyjen valamisen jälkeen niitä kuivattiin 4°C:ssa 24 tuntia.
3. Yhdisteen MIC-arvon määrittäminen - Eri koeyhdisteiden Minimiestokonsentraatio (MIC) määritettiin käyttäen agar-laimennustekniikkaa. Koeyhdisteitä ja sopivia vertailuyhdisteitä lisättiin sellaiset määrät, että saatiin välillä 32 µg/ml - 0,007 µg/ml oleva konsentraatiosarja. Ympit valmistettiin ylläpitoväliaineilla kasvatetuista 96 tunnin viljelmistä. Puhtausarvioinnin jälkeen pesäkkeet poistettiin ja suspendoitiin tryptikaasi-soijaliemeen, johon oli lisätty 5 µg/ml menadionia ja 2 % lysoitua kaniinin veren suodosta optiseen tiheyteen OD₆₅₀ 0,1 (vastaa noin 10⁸ solua/ml). Viljelmiä ympättiin aerobisesti modifioitua tryptikaasi-soija-veriagaria sisältäville levyille käyttäen Steer-replikaattoria (jolla saadaan ymppimäärä noin 10⁵ solua/ympäyskohta). Levyt saivat kuivua korkeintaan 30 minuuttia, ja sitten niitä inkuboitiin 37°C:ssa 80 % N₂, 10 % H₂ ja 5 % CO₂ sisältävässä kaasukehässä anaerobisessa tilassa

(Coy Manufacturing Co). 48 tuntia. MIC määriteltiin alhaisimmaksi konsentraatioksi, joka esti kasvun täydellisesti.

Koeaineet - Tetrasykliinin perusliuokset (1 mg/ml)
5 valmistettiin tetrasykliinin vesiliuoksesta. Muiden
koeyhdisteiden perusliuokset (1 mg/ml) valmistettiin
yhdisteiden liuoksista 0,1-m NaOH-liuokseen. Kontrolli-
kokeet, joissa käytettiin saman väkevyyisiä NaOH-liuoksia,
osoittivat, ettei NaOH vaikuttanut koe-mikro-organismien
10 elinkykyyn.

Tulokset - Kokeiltujen yhdisteiden antimikrobiset
aktiivisuudet nähdään taulukossa A.

Taulukko A: Valittujen anaerobisten mikro-organismien herkkyys koe yhdisteille

MIKRO-ORGANISMIT	Win-luku					
	35,213 ^a	35,439 ^b	µg/ml	9,424 ^d	50,297 ^e	50,150 ^f
F. polymorphum	>10	4	0,5	0,12	>10	8
A. viscosus	>10	8	1,0	2,0	>10	>10
B. melaninogenicus	8	8	1,0	0,5	4,0	4
Capnocytophaga sputigena	1	0,5	0,06	1,0	0,5	0,25
B. intermedius	0,5	0,25	0,06	2,0	0,5	0,5
Eikenella corrodens	8	2,0	0,5	2,0	4,0	4,0
B. oralis	>10	>10	4,0	0,12	4,0	4,0
B. gingivalis	>10	>10	2,0	0,12	4,0	4,0
A. actinomycetemcomitans	0,12	0,25	0,12	1,0	0,06	0,06
B. fragilis	>10	>10	4,0	1,0	>10	8,00
F. nucleatum	>10	4	0,5	0,75	8,00	8,00
Wolinella recta	0,5	0,5	0,12	-	0,12	0,25
Campylobacter sputorum	>10	>10	8,0	-	2,0	4,0

- a) Rosoksiini
 b) Win 52 522:n 6-desfluorianaalogi
 c) Hakemuksen esimerkin 2B yhdiste
 d) Terasykliini
 e) Norfololksasiini
 f) Pefloksasiini

Tuloksia ilmenee, että Win 52 522 on selvästi parempi kuin sekä Win 35 213 että Win 35 439. Tosiasiassa Win 52 522:lla oli laajaspektrinen antimikrobinen aktiivisuus, joka oli vertailukelpoinen nykyisin käytetyn tetrasykliinin kanssa. Win 50 297 ja Win 50 150 olivat vähemmän aktiivisia.

Koe 3

Win 52 522:n ja vertailuyhdisteen Win 35 439:n in vivo antibakteerinen aktiivisuus hiirien Staphylococcus aureus ja Escherichia coli -infektioissa

Yhteenveto - Win 52 522:n osoitettiin olevan tehokkaampi kuin Win 35 439 sekä ihonalaisesti että suun kautta annostettuna hiirille penisilliiniherkillä ja metisilliini-resistenteillä Staphylococcus aureus -kannoilla aiheutettuja infektioita vastaan.

Materiaalit ja menetelmät

Eläimet - ICR-hiiret, naaraat, 18-20g kukin.

Antibakteeriset aineet - Win 52 522, Win 35 439, metisilliini (Win 9 410) ja vankomysiini (Win 39 556).

Bakteeriviljelmät

Escherichia coli Vogel

Staphylococcus aureus 39881

Staphylococcus aureus Smith

Viljelyaineet

Aivo-sydäninfuusioagar (Difco)

Aivo-sydäninfuusioliemi (Didco)

Mahan lima-aine - 25 mg mahan limaaainetta (bakteriologinen laatu, erä no. 0617, ICN Pharmaceuticals, Inc.) suspendoitiin 5-%:iseksi (paino/vol) suspensioksi 475 ml:aan kylmää vesijohtovettä. Suspensiota sekoitettiin 20-30 minuuttia Omni-sekoittajalla, sitä säilytettiin 4°C:ssa yön yli, ja sen pH-arvo säädettiin 7,2:ksi 40-%:isella (paino/vol) NaOH-liuoksella juuri ennen käyttöä.

Antimikrobisten lääkeluostien valmistus - Win 52 522:n ja Win 35 439:n liuokset valmistettiin liuottamalla sopiva määrä lääkettä 0,3-0,4 ml:aan 1-m NaOH-liuosta ja laimentamalla liuokset tislattulla vedellä haluttuun tilavuuteen. Metisilliini ja vankomysiini liuotettiin suoraan tislattuun veteen.

Bakteeriviljelmien valmistus

A. *Staphylococcus aureus* Smith - 2,5 ml viljelmää lisättiin 247,5 ml:aan 5-%:ista mahan lima-ainesus-
 10 pensiota, jolloin saatiin koeympä, joka sisälsi $2,1 \times 10^4$ solua/ml.

B. *Staphylococcus aureus* 39881 - Viljelmää sivel-
 tiin kolmelle aivosydäninfuusioagar-levylle ja levyjä
 inkuboitiin 16 tuntia 37°C:ssa. Solut huuhdottiin kul-
 15 takin levyiltä 5 ml lla suolaliuosta, ja solususpensiota ravisteltiin lasihelmien kanssa maalaravistimessa 2 minuuttia. Suspensio laimennettiin suolaliuoksella siten, että 1:100 laimennuksella saatiin 44 % T lukema suolaliuoksella kalibroidulla B + L Spectronic 20
 20 (650 nm) laitteella. Perussuspensio laimennettiin suhteessa 1:24 (10 ml perussuspensiota + 230 ml 5-%:ista mahan lima-ainetta), jolloin saatiin koeympä, joka sisälsi $1,55 \times 10^9$ solua/ml.

C. *Escherichia coli* Vogel - Viljelmä ympättiin
 25 10 ml:aan aivo-sydäninfuusiolientä ja kasvatettiin sekoittamatta 16 tuntia 37°C:ssa. Uusiin saamaa viljelyli-
 entä sisältäviin putkiin ympättiin 0,1 ml 16 tunnin viljelmää, ja putkia inkuboitiin 5 tuntia 37°C:ssa.
 5 tunnin viljelmä laimennettiin lopuksi suolaliuoksella
 30 koeympiksi, joka sisälsi $3,0 \times 10^7$ solua/ml.

Hiirien infektoiminen - Hiiriin ruiskutettiin vatsakalvonsisäisesti 0,5 ml 0,5 ml bakteeri-koeinoku-
 laattia.

A. *Staphylococcus aureus* Smith

1. Yhden annoksen koe - Hiirille annettiin ihonalaisesti tai suun kautta kerran 0,5 ml lääkettä 0,5 tuntia infektoinnin jälkeen.

5 2. Useamman annoksen koe - Hiirille annettiin ihonalaisesti (0,2 ml) tai suun kautta (0,5 ml) lääkettä seuraavina ajankohtina: 6,5 tuntia ennen infektointia (infektointi klo 14) ja kahdesti vrk:ssa (klo 8 ja 15,30) kahtena seuraavana päivänä.

10 B. *Staphylococcus aureus* 39881 - Hiiret saivat lääkettä 2 kertaa: 0,5 ja 4 tuntia infektoinnin jälkeen. Lääkkeitä annettiin sekä ihonalaisesti (0,2 ml) että suun kautta (0,5 ml).

15 C. *Escherichia coli* Vogel - Hiirille annettiin ihonalaisesti tai suun kautta kerran 0,5 ml lääkettä 0,5 tuntia infektoinnin jälkeen.

20 Kuolemantapaukset merkittiin muistiin 7 vrk ajan kaikissa kokeissa. 50%:n suoja-annosten arvot (PD_{50} -arvot) laskettiin käyttäen probitanalyysiä (SAS Users Guide: Statistics, 1982 painos, SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina).

Tulokset

25 Win 52 522:n ja vertailuna käytetyn Win 35 439:in vivo antibakteerinen aktiivisuus hiirien *Staphylococcus aureus* Smith infektiossa on esitetty taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1

Win 52522:n ja Win 35439:n in vivo antibakteerinen
aktiivisuus hiiren *Staphylococcus aureus* Smith - infekti-
ossa - yhden annoksen koe

Lääke	Annos (mg/kg)	Anto- tapa	Pen- gissä olevat luku- määrä	kokonais- 50%:n suoja-annos (mg/kg) 95% (luotettavuusrajat)
Win 52,522	0,095	sc	0/10	0,8 (0,6-1,1)
	0,19		0/10	
	0,39		2/10	
	0,78		4/10	
	1,56		10/10	
Win 35,439	0,78	sc	1/10	2,9 (2,3-4,3)
	1,56		0/10	
	3,13		6/10	
	6,25		10/10	
Win 52,522	0,19	po	0/10	1,4*
	0,39		0/10	
	0,78		0/10	
	1,56		7/10	
	3,13		10/10	
Win 35,439	0,39	po	0/10	5,5*
	0,78		1/10	
	1,56		0/10	
	3,13		0/10	
	6,25		7/10	
Vankomysiini	0,78	sc	2/10	1,1 (0,6-1,5)
	1,56		9/10	
	3,13		9/10	
	6,25		10/10	
	12,5		10/10	
Infektoidut kontrollit			0/20	

*Arvio

Taulukko 2

Win 52522:n ja Win 35439:n in vivo antibakteerinen
aktiivisuus hiiren *Staphylococcus aureus* Smith -infek-
tiossa - useamman annoksen koe

Lääke	Ahnos (mg/kg)	Hen- cissä Anto- tapa	olevat	kokonais 50%:n suoja-annos luku- määrä 95% (luotettavuusrajat) (mg/kg)
Win 52,522	0,19	sc	0/10	1,8 (1,3-2,4)
	0,39		0/10	
	0,78		0/10	
	1,56		4/10	
	3,13		9/10	
	6,25		10/10	
	12,5		10/10	
Win 35,439	3,13	sc	1/10	7,1 (5,4-10,2)
	6,25		3/10	
	12,5		10/10	
	25		10/10	
Win 52,522	0,19	po	0/10	2,1 (1,6-2,7)
	0,39		0/10	
	0,78		0/10	
	1,56		2/10	
	3,13		9/10	
	6,25		10/10	
	12,5		10/10	
Win 35,439	3,13	po	0/10	7,2 (5,4-9,6)
	6,25		4/10	
	12,5		9/10	
	25		10/10	
Infektoidut kontrollit	-	-	0/20	

Win 52 522:n teho oli yhtenä annoksena annettaessa
0,5 tuntia infektoinnin jälkeen 3,6-kertainen (sc) ja
3,9 -kertainen (po) Win 35 439:n tehoon verrattuna,
Win 52 522:n teho oli 3,9-kertainen (sc) ja 3,4-ker-
5 tainen (po) Win 35 439:n tehoon verrattuna samaa in-
fektiota vastaan useampikertaisessa annostuksessa.

Win 52 522:n PD_{50} -arvot hiirien metisilliini-
resistenttiä *Staphylococcus aureus* -infektiota vastaan
oli ihonalaisessa annossa 1,1 mg/kg ja suun kautta
10 annettaessa 1,6 mg/kg, kuten taulukosta 3 nähdään.

Taulukko 3

Win 52522:n, Win 35439:n, metisilliinin ja vankomysiinin
in vivo antibakteerinen aktiivisuus hiiren *Staphylococcus*
aureus 39881 -infektiossa (metisilliiniresistentti)

Lääke	Annos** (mg/kg)	Anto- tapa	Hengissä/Kokonais- olevat / lukumäärä		50%:n suoja-annos (mg/kg) (95%:n luotettavuusrajat)
Win 52,522	0,19	sc	0/10	1.1(0.1-4.1)	
	0,39		0/10		
	0.78		2/10		
	1,56		10/10		
	3,13		9/10		
	6.25		10/10		
Win 35,439	1,56	sc	0/10	4.9*	
	3,13		0/10		
	6,25		9/10		
	12.5		7/10		
Win 52,522	0,19	po	0/10	1.6(1.3-2.4)	
	0,39		0/10		
	0.78		1/10		
	1,56		4/10		
	3,13		10/10		
	6,25		10/10		
Win 35,439	1,56	po	1/10	7.2(5.6-10.0)	
	3,13		0/10		
	6.25		3/10		
	12,5		10/10		
Metisiliini	25	sc.	0/10	>100	
	50		0/10		
	100		0/10		
Vankomysiini	6,25	sc	0/10	17.7(13.8-22.6)	
	12,5		1/10		
	25		9/10		
	50		10/10		
Infektoidut kontrollit	-	-	0/20		

* Arvio

** 2 annosta - 0,5 ja 4 tuntia infektioinnin jälkeen

Win 52 522:n teho (sc) samaan infektiin oli 4,5-kertainen Win 35 439:n tehoon ja 16-kertainen vankomysiinin tehoon verrattuna.

Win 52 522:n ja Win 35 439:n in vivo aktiivisuus hiirien *Escherichia coli* Vogel -infektiota vastaan on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4

10

Win 52522:n ja Win 35439:n in vivo antibakteerinen aktiivisuus hiiren *Escherichia coli* Vogel-infektiossa

15	Lääke	Annos (mg/kg)	Anto- tapa	Hen- kokonais- 50%:n suoja-annos	95%(luotettavuusrajat)
				gissi luku- olevat määrä	
20	Win 52,522	1,56	sc	0/10	5,2*
		3,13		0/10	
		6,25		8/10	
		12,5		10/10	
		25		10/10	
25	Win 35,439	3,13	sc	1/10	13,5 (10,5-19,2)
		6,25		0/10	
		12,5		4/10	
		25		10/10	
30	Win 52,522	1,56	po	0/10	8,2 (6,3-10,8)
		3,13		0/10	
		6,25		2/10	
		12,5		9/10	
		25		10/10	
30	Win 35,439	3,13	po	0/10	16,5 (12,6-21,8)
		6,25		0/10	
		12,5		2/10	
		25		9/10	
	Infektoidut kontrollit	-	-	0/20	

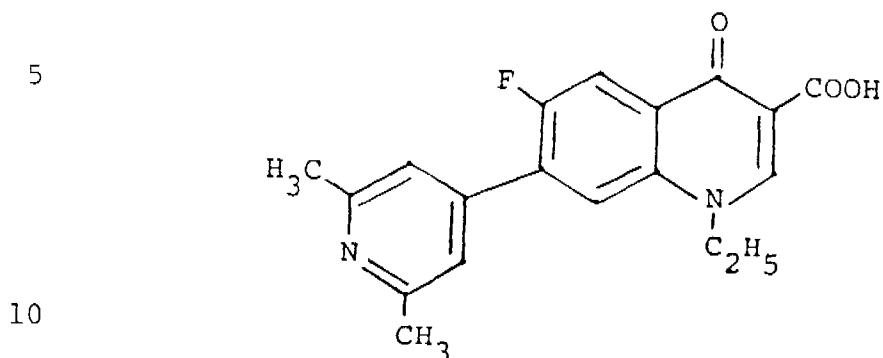
*Arvio

Win 52 522:n PD₅₀-arvot (sc ja po) tätä infektiota vastaan olivat 5,2 ja 8,2 mg/kg eli noin puolet Win 35 439:n vastaavista arvoista.

- Tämän tutkimuksen tulokset osoittavat, että
- 5 Win 52 522 on sekä ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti että suun kautta otettuna erittäin voimakas antibakteerinen aine hiirillä penisilliini-herkillä ja metisilliiniresistenteillä *Staphylococcus aureus* -kannoilla aiheutetuissa infektioissa.
- 10 Kaavan I mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä, myrkytön happoadditiosuola tai kationisuola voidaan valmistaa käyttömuotoon tavanno-
omaisin farmaseuttisin menetelmin; yhdiste voidaan liuottaa tai suspendoida farmaseuttisesti hyväksyt-
15 tävään väliaineeseen, esim. veteen, vesipitoiseen alkoholiin, glykoliin, öljyliuokseksi tai öljy-vesi-
enulsioksi parenteraalista tai oraalista lääkeantoa varten; tai yhdiste voidaan muodostaa yksikköannos-
muotoon, kuten kapseleiksi tai tableteiksi oraalista
20 lääkeantoa varten, joko yksinään tai yhdessä tavanno-
omaisten apu- ja täyteaineiden kanssa, esim. kaliumkarbonaatin, tärkkelyksen, apu- ja täyteaineiden kanssa, esim. kalsiumkarbonaatin, tärkkelyksen talkin, magnesiumstearaatin, akaasiakumin tms. kanssa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä 4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapon valmistamiseksi, jonka kaava on



tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän, myrkyttömän happo-additiosuolan tai kationisuolan valmistamiseksi, t u n - n e t t u siitä, että

15 a. 6-amino-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo muutetaan 6-diatsoniumsuolansa välityksellä 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapoksi, tai

20 b. 6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo tai sen alempi-alkyyliesteri etyloidaan, ja kun reaktio suoritetaan alempi-alkyyliesterin kanssa, saatu 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihapon alempi-alkyyliesteri hydrolysoidaan vastaavaksi hapoksi,

25

ja haluttaessa saati yhdiste muutetaan happoadditiosuolaksi tai yhdiste muutetaan reaktiossa vahvan epäorgaanisen tai orgaanisen emäksen kanssa kationisuolaksi.

30 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n - n e t t u siitä, että kohdan a) mukaisesti käytetty 6-amino-1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo valmistetaan nitraamalla 1-etyyli-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylihappo 1-etyyli-1,4-dihydro-

35

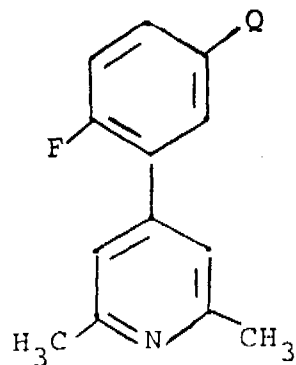
-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-6-nitro-4-okso-3-kinoliinikarboksyylimahapon saamiseksi, ja pelkistämällä tämä 6-nitroyhdiste.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
 5 t u n n e t t u siitä, että kohdan b) mukaisesti käytetty 6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylimahappo valmistetaan pelkistämällä 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini 4-(5-amino-2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniksi, saattamalla viimeksi mainittu yhdiste
 10 (esimerkki 6A) reagoimaan di-alempi-alkyylietoksimeyleenimalonaatin kanssa di-alempi-alkyyli-3-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-fluorianilinometyleenimalonaatin saamiseksi, ja keittämällä viimeksi mainittua yhdistettä
 15 palautusjäähdyttäen, jolloin saadaan alempi-alkyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksylaatti, ja haluttaessa valmistaa karboksylimahappo, hydrolysoimalla saatu alempi-alkyylikarboksylaatti.

20 4. Menetelmä patenttivaatimuksen a a) tai 2 mukaisella menetelmällä valmistetun 1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-kinoliinikarboksyylimahapon puhdistamiseksi, joka happo sisältää epäpuhtauksina vastaavia 5-desifluori- ja 6-hydroksiyhdisteitä, t u n n e t t u siitä, että saatuu yhdiste muu-
 25 tetaan vastaavaksi alempi alkyyli-1-etyyli-6-fluori-1,4-dihydro-7-(2,6-dimetyyli-4-pyridinyyli)-4-okso-3-karboksylaatti. esteri erotetaan reaktioseoksesta ja esteri saippuoidaan, jolloin saadaan puhdistettu happo.

30 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että alempi alkyyli on etyyli.

6. Kemiallinen välituote, jonka kaava on



5
10 jossa Q on vety tai nitro tai tämän yhdisteen happo-additiosuola.

15 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, jossa Q on vety ja joka yhdiste on 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, jossa Q on nitro ja joka yhdiste on 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiini.

20 9. Menetelmä patenttivaatimuksen 6 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyyli-3,5-pyridiinikarboksyylihappoa kuumennetaan, jolloin saadaan 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiinin ja 2,4-dimetyyli-5H- β -bentsopyrano
25 3,4-c/ pyridin-5-onin seos, seoksen komponentit erotetaan 4-(2-fluorifenyyli)-2,6-dimetyylipyridiinin eristämiseksi, ja haluttaessa viimeksi mainittu yhdiste nitrataan 4-(2-fluori-5-nitrofenyyli)-2,6-dimetyylipyridiiniksi.