



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 57745

C(45) Patentti myönnetty 10 10 1980

Patent meddelat

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ C 07 C 101/10

SUOMI—FINLAND

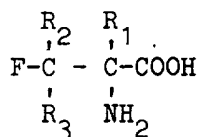
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansöknin 1587/72
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 06.06.72
(23) Alkupaivä — Giltighetsdag 06.06.72
(41) Tulut julkiseksi — Blivit offentlig 19.12.72
(44) Nähtävöksiäpanon ja kuul.julkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 30.06.80
(32)(33)(31) Pyydetty etuolkeus — Begärd prioritet 18.06.71
03.02.72 USA(US) 154695, 223354 Toteen-
näytetty—Styrkt

- (71) Merck & Co., Inc., 126 E. Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey, USA(US)
(72) Janos Kollonitsch, Westfield, New Jersey, USA(US)
(74) Oy Kolster Ab
(54) Menetelmä terapeuttisesti käytettävän 3-fluori-D-alaniinin tai sen deuterioanalogin valmistamiseksi - Förfarande för framställning av terapeutiskt användbar 3-fluor-D-alanin eller dess deuterioanalog

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä terapeuttisesti käytettävän 3-fluori-D-alaniinin tai sen deuterioanalogin valmistamiseksi, joilla yhdisteillä on kaava



jossa R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät vetyä tai deuteriumia. 3-fluori-D-alaniini ja sen deuterio-analogit ovat tehokkaita bakteereja hävittäviä aineita ja ne ovat arvokkaita estettäessä sekä gram-positiivisten että gram-negatiivisten patogeenisten bakteerien kasvua.

57745

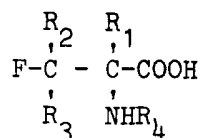
Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että

a) kaavan I mukaisen 3-fluori-DL-alaniinin tai sen deuterioanalogin ja optisesti aktiivisen emäksen suolojen seos alistetaan jakokiteytykseen, jotta saadaan 3-fluori-D-alaniinin suola käytännöllisesti katsoen puhtaassa muodossa, ja että suolaa käsitellään vahvalla hapolla kaavan I mukaisen yhdisteen vapauttamiseksi suolastaan, tai

b) kaavan I mukaisen 3-fluori-DL-alaniinin tai sen deuterioanalogin ja optisesti aktiivisen hapon suolojen seos alistetaan jakokiteytykseen, jotta saadaan 3-fluori-D-alaniinin suola käytännöllisesti katsoen puhtaassa muodossa, ja että suolaa käsitellään vahvalla emäksellä kaavan I mukaisen yhdisteen vapauttamiseksi suolastaan, tai

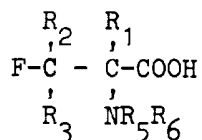
c) kaavan I mukaisen 3-fluori-DL-alaniinin tai sen deuterioanalogin aminosuojatun johdannaisen ja optisesti aktiivisen hapon suolojen seos alistetaan jakokiteytykseen, jotta saadaan vastaava aminosuojattu 3-fluori-D-alaniinisuo-
la käytännöllisesti katsoen puhtaassa muodossa, että saatua suolaa käsitellään vah-
valla hapolla kaavan I mukaisen yhdisteen aminosuojatun johdannaisen vapauttami-
seksi suolastaan, ja että aminoryhmä lohkaistaan lopuksi pois,
tai

d) 3-fluori-D-alaniinista tai sen deuterioanalogin aminosuojatusta johdan-
naisesta, jonka kaava on



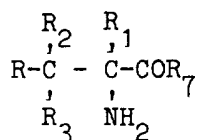
jossa R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät samaa kuin edellä, ja R_4 on karbobentsoksi, bentso-
yyli, klooriasetyyli tai mentoksisasetyyli, lohkaistaan suojaryhmä R_4 hydraamalla
tai hydrolysoimalla pois, tai

e) 3-fluori-D-alaniinista tai sen deuterioanalogin aminosuojatusta johdan-
naisesta, jonka kaava on



jossa R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät samaa kuin edellä, ja joko R_5 on vety ja R_6 on
karbobentsoksi, bentsyyli, α -metyylibentsyyli tai α -karboksibentsyyli, tai
 R_5 ja R_6 ovat kumpikin bentsyyli, lohkaistaan suojaryhmä R_6 katalyyttisesti
hydraamalla pois, tai

f) 3-fluori-D-alaniinista tai sen deuterioanalogin karboksyyli-
suo-
jatusta johdannaisesta, jonka kaava on



jossa R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät samaa kuin edellä, ja R_7 on ester-, amidi- tai syanoryhmä, lohkaistaan suojaryhmä R_7 hydrolysoimalla pois.

Karboksyyli-suojatut ryhmät ovat tavallisesti amideja ja substituoituja amideja, ester-substituentteja, esim. alkyyliestereitä, kuten metyyli-, etyyli- ja t-butyyl-estereitä, aryyliestereitä, aralkyyl-estereitä, kuten bentsyyli-esteri, p-nitrobentsyyliesteri ja sen kaltaiset.

Amino-suojatut ryhmät, joita tavallisesti käytetään, ovat asyyli-tyyppisiä substituentteja, kuten formyyl-, asetyyli-, bentsoyyl-, ftaloyyli-, trifluoriase-tyyli-, 1-metoksiasetyyli-, tolueenisulfonyyli-, dibentsyylifosforyyli-, 2-nitrobentseenisulfonyyli-, trityylisulfonyyli-, o-nitrofenoksiasetyyli ja sen kaltaisia, tai uretaani-suojaavia substituentteja, kuten bentsyylioksikarbonyyli (karbobentoksi) metyylioksikarbonyyli, etyylioksikarbonyyli, p-metoksikarbobentsoksi, p-nitrokarbobentsoksi, t-butylioksikarbonyyli, t-amyylioksikarbonyyli, adamantyylioksi-karbonyyli, 2-(p-bifenyyli)-2-propyylioksikarbonyyli, isonikotinylioksikarbo-nyyli, di-isopropyylimetyylioksikarbonyyli ja sen kaltaiset, tai alkyyl- tai aralkyyl-tyyppisiä substituentteja, kuten bentsyyli-, dibentsyyli-, α -fenyyl-etyyli (α -metyylibentsyyli), trifenyylimetyyli, trialkyylisilyyli, trimetyyli-silyyli ja sen kaltaiset.

Kun 3-fluori-D-alaniini-yhdisteet valmistetaan hajottamalla 3-fluori-DL-alaniinin johdannainen (ei suola) optisesti aktiivisen ryhmän, kuten 1-mentoksi-asetyylin kanssa, tai asymmetrisen synteessin avulla, esim. antamalla fluoriase- aldehydin reagoida optisesti aktiivisen amiinin, kuten D- α -metyylibentsyyliamiinin, R(D)-fenyyli-glysiinin, 1-amino-(S)-2-[(R)-1-hydroksietyyli]-indoliinin ja sen kaltaisten kanssa, tai antamalla amino-suojatun α -amino- β -fluoriakryylihapon, kuten α -bentsamido- β -fluoriakryylihapon reagoida vedyn tai deuteriumin kanssa asymmetrisen katalyytin läsnäollessa, tai kun 3-fluori-D-alaniini-yhdisteitä valmistetaan 2-(atsidokarbonyyli- tai amino-karbonyyli)-3-fluoripropioniesterin tai -nitriilin asymmetrisen uudelleenryhmittymisen avulla, tai valmistamalla N-asyyli-3-fluori-D-alaniinista L-isomeerin selektiivisen entsymaattisen dease-tyloimisen avulla, saadaan mahdollisesti 3-fluori-D-alaniini amino-suojattu ja/tai karboksyyli-suojattu johdannainen, esim. N-1-metoksiasetyyli-3-fluori-D-alaniini, N-(D- α -metyylibentsyyli)-3-fluori-D-alaniini, N-(D- α -karboksibentsyyli)-3-fluori-D-alaniini, N-bentsyyli-3-fluori-D-alaniini, N-karbonyyli-3-fluori-D-alaniini-metyyliesteri, N-etoksikarbonyyli-3-fluori-D-alaniini, N-klooriasetyyli-3-fluori-D-alaniini ja sen kaltaiset.

Valmistettaessa 3-fluori-D-alaniini-yhdisteitä hajottamalla optisesti aktiivisen emäksen ja 3-fluori-DL-alaniinin aminosuojatun johdannaisen suo-
loja saadaan lopullisesti (happameksi tekemisen jälkeen) 3-fluori-D-alaniinin vastaava
amino-suojattu johdannainen, kuten N-karbobentsoksi-3-fluori-D-alaniini, N,N-di-
bentsyyli-3-fluori-D-alaniini ja sen kaltaiset.

Valmistettaessa 3-fluori-D-alaniini-yhdisteitä hajottamalla optisesti aktiivisen hapon ja 3-fluori-DL-alaniinin karboksyyli-suojatun johdannaisen suo-
loja saadaan lopullisesti 3-fluori-D-alaniinin vastaava karboksyyli-suojattu
johdannainen, kuten (sen jälkeen kun on hajotettu käyttämällä viinihappoa,
kamfori-10-riikkihappoa, dibentsyyli-d-viinihappoa ja sen kaltaisia hajotus-
aineena) 3-fluori-D-alaniinin bentsyyliesteri, D-2-amino-3-fluori-propioninitriili,
D-2-amino-3-fluoripropioniamidi ja sen kaltaiset.

Nämä suojatut johdannaiset voidaan kaikki muuttaa vapaaksi 3-fluori-D-ala-
niini-yhdisteeksi antamalla reagoida lohkaisuaineen kanssa. Esim. seuraavissa
amino-suojatuissa johdannaisissa, jotka on lueteltu edellä: N-1-mentoksi-asetyyli,
N-bentsyyli, N-karbonyyli, N-etoksikarbonyyli ja N-klooriasetyyli, on tavalli-
sesti edullista käyttää lohkaisuaineena hapanta hydrolysoimisainetta, kuten vesi-
pitoista kloorivetyhappoa, vesipitoista bromivetyhappoa ja sen kaltaisia; emäksi-
set hydrolysoimisaineet ovat tavallisesti ei-haluttuja, koska ne voivat reagoida
3-fluori-substituentin kanssa.

Muiden jo mainittujen amino-suojattujen johdannaisten, nimittäin N-(D- α -
metyyllibentsyyli)-, N-(D- α -karboksibentsyyli)-, N-karbobentsoksi- ja N,N-dibent-
syyli-johdannaisten yhteydessä on edullista käyttää lohkaisuaineena hydrausainetta,
kuten vetyä, palladiumhiilikatalysaattorin tai palladiumhydroksidihiili-kataly-
saattorin läsnäollessa. Hydraus suoritetaan tavallisesti silloin, kun kysymyksessä
on suhteellisen helposti lohkeavat ryhmät, kuten karbobentsoksiryhmä, suunnilleen
ilmakehän paineessa, ja kun kysymyksessä on vähemmän helposti lohkeavat ryhmät,
kuten N,N-dibentsyyli, N-(D- α -metyyllibentsyyli), N-(D- α -karboksibentsyyli) ja sen
kaltaiset, jopa 2,8 kg/cm² ylipaineessa käytettäessä palladiumhydroksidi-kataly-
saattoria ja jopa 70 kg/cm² ylipaineessa käytettäessä palladiumhiili-katalysaat-
toria.

Edellä esitettyjen karboksyyli-suojattujen johdannaisten, kuten esim. bent-
syyliesterin ja D-2-amino-3-fluori-propionamidin (ja nitriliin) yhteydessä on
edullista käyttää lohkaisuaineena vesipitoista hapanta hydrolysoimisainetta,
kuten vesipitoista kloorivetyhappoa ja sen kaltaista.

Esillä oleva keksintö käsittää myös 3-fluori-DL-alaniinin, sen deuterioanalogien ja amino-suojattujen johdannaisten hajottamisen käyttämällä optisesti aktiivisia emäksiä, kuten D+L- α -fenetyyliamiinia, kiniiniä, brusiinia, kinidiiniä, kinkoniinia, L-lysiiniä, kinkonidiiniä, strykniiniä, morfiinia, 1-mentyyliamiinia, L-arginiinia, d-2-amino-1-hydroksihydrindeeniä, efedriiniä, abietyyliamiinia, amfetamiinia, D+L-treo-1-p-nitrofenyyli-2-amino-1,3-propaanidiolia, D+L-treo-1-fenyyli-2-amino-1,3-propaanidiolia, D+L-N-dimetyyli- α -fenetyyliamiinia, dehydroabietyyliamiinia, D+L-1-(1-naftyyli)etyyliamiinia, D+L-1-(2-naftyyli)-etyyliamiinia, D+L-tyrosiinihydratsidia, D+L- α -fenetyyliamiinia, D+L-treo-2,2-dimetyyli-4-fenyyli-5-amino-1,3-dioksaania, optisesti aktiivisia emäksisiä polymeereja, kuten dimetyyli-(1-fenetyyli)-polystyreeni-divinylibentseeni-kvaternääristä ammoniumyhdistettä, samoin kuin 3-fluori-DL-alaniinin, sen deuterioanalogien ja sen karboksyyli-suojattujen johdannaisten hajottamisen käyttämällä optisesti aktiivisia happoja, kuten d+l-kamfori-10-sulfonihappoa, 3-bromikamfori-8-sulfonihappoa, D+L-viinihappoa, D+L-kamfori-10-sulfonihappoa, 3-bromikamfori-8-sulfonihappoa, D+L-dibentsoyyli-viinihappoa, D+L-ditoluoyyli-viinihappoa, D+L-tartraniliinihappoa, D+L-N-(1-fenetyyli)meripihkamiinihappoa, D+L-N-(1-fenyylietyyli)ftalamiinihappoa, N-asetyylialaniinia, N-asetyyli-leusiinia, pyroglutamiinihappoa, glutamiinihappoa, 1-metoksietikkahappoa, mantelihappoa, maliinihappoa, L-N-asetyylidibromityrosiinia, D+L-N-asetyyli- α -metyyli-3,4-dimetoksifenyylialaniinia, D+L-N-asetyyli- α -metyyli-3,4-metyleenidimetoksifenyylialaniinia ja sen kaltaisia.

Raseeminen yhdiste 3-fluori-D,L-alaniini on tunnettu yhdiste, jota ovat kuvanneet Lettre et al, aikakauslehdessä Ann. Chem. 708, 75-85 (1967). Optisia isomeerejä ei kuitenkaan ole ennen tätä keksintöä selostettu eikä rasemaatin antibakteriaalista aktiviteettia ole tutkittu.

Yllättäen huomattiin, että vain spesifisissä, in vitro suoritetuissa antibakteriaalisissa koestusmenetelmissä todettiin 3-fluori-D-alaniinin ehkäisyvaikutus. Tällöin oli mahdollista osoittaa, että optisten isomeerien antibakteriaalinen aktiviteetti on in vitro samanvertainen. Ja kuitenkin in vivo-olosuhteissa isomeerit eroavat huomattavasti. D-isomeeri säilyttää antibakteriaaliset ominaisuutensa ja suojaa tartunnan saaneen eläimen, kun taas L-isomeeriltä näyttää puuttuvan kyky suojata bakteeri-infektion saaneita eläimiä ja on todella kuolettava sellaisille eläimille käytettynä vain kohtuullisen suuruisina annoksina.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistetut uudet yhdisteet ja niiden suolat ovat antibakteriaalisia aineita, jotka ovat käyttökelpoisia ehkäistäessä patogeenisten bakteerien kasvua, jotka ovat sekä gram-positiivista että gram-negatiivista sukua, kuten esim. Streptococcus, Escherichia, Staphylococcus, Salmonella, Pseudomonas, Diplococcus, Klebsiella, Proteus, Mycobacterium, Vibrio, Pasteurella ja Serratia, samoin kuin niiden antibiooteille vastustuskykyiset lajit. Tyypillisiä sellaisia patogeeneja ovat Escherichia coli, Salmonella schottmuelleri, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus ja Streptococcus pyogenes. Näitä uusia yhdisteitä ja niiden suoloja voidaan käyttää antiseptisina aineina poistamaan epäilyttävät organismit farmaseuttisista, hammaslääkärin ja lääkärin välineistä ja niitä voidaan myöskin käyttää muilla aloilla, jotka joutuvat alttiiksi tällaisen organismin tartunnalle.

Uudet D-isomeerit ja niiden suolat ovat myöskin arvokkaita hoidettaessa edellä mainittujen organismien aiheuttamia sairauksia ihmisillä ja eläimillä ja niitä voidaan antaa monenlaisina terapeuttisina annoksina tavanomaisissa kantaja-aineissa, esimerkiksi antamalla niitä oraalisesti kapselin tai tabletin muodossa tai nesteeseen liuotettuna tai suspendoituna. Sopivat reseptimuodot käsittävät laimennusaineita, rakeistusaineita, säilöntäaineita, sideaineita, makuaineita ja päällystysaineita, jotka ovat tämän alan ammattimiesten hyvin tuntemia, ja tuotteiden annostusta voidaan vaihdella laajasti, jolloin ylärajan määrää tartunnan aiheuttavan organismin autoantagonistinen kynnys 3-fluori-D-alaniinin suhteen sillä alueella, joka joutuu odotetun antibakteriaalisen välittömän vaikutuksen kohteeksi. Annokset saattavat olla esimerkiksi noin 250 mg - noin 500 mg aktiivista aineosaa 2-4 kertaa päivässä kysymyksen ollessa 70 kilon painoisesta aikuisesta ihmisestä. Annettaessa kasvun sallivaa terapiaa ruokintaryhmän kasvaville eläimille tulee niiden saada noin 100 g/tonni täysravintoa. Vaihtoehtoisesti voidaan niitä antaa parenteraalisesti ruiskuttamalla indifferentissä kantoaineessa.

Edelliseen viitatus, in vitro suoritettun antibakteriaalisen kokeen ainutlaatuisuuden aiheuttaa 3-fluori-D-alaniinin se epätavallinen ominaisuus, että se on autoantagonistinen suurissa konsentraatioissa. Tämän vuoksi antibakteriaalisissa standardiseuloissa, jotka ovat tarkoitettut ottamaan talteen suuruusluokaltaan hyvin alhaiset aktiviteetit ja sellaisissa tapauksissa, joissa käytetään suhteellisen suuria koeyhdisteen konsentraatioita, saatetaan menettää 3-fluori-D-alaniinin aktiviteetti.

Tämä autoantagonistinen ominaisuus ei vähennä sen hyödyllisyyttä, koska se ilmenee ainoastaan esimerkiksi in vivo suoritetuissa kokeissa käytettäessä annoksia, jotka ovat suurempia kuin noin 10 kertaa keskimääräinen tehokas parantava ainemäärä.

Kun 3-fluori-L-alaniini metabolisoituu nopeasti ja täydellisesti myrkyllisine seurauksineen, niin tapahtuu 3-fluori-D-alaniinille in vivo paljon hitaampi degradaatio. Mahdollinen vaikuttava tekijä on D-aminohappo-oksidaasientsyymi, jota on runsaasti ihmisissä ja rotissa, mutta paljon vähemmässä määrin hiirissä ja eräissä kasvia syövissä kotieläimissä. Kuitenkaan ei metabolismin nopeus, koska se voi vaikuttaa veressä oleviin terapeuttisen aineen määriin, eikä tämän metabolismin sivutuotteet vaikuta yhdisteen käyttämistä vastaan annosmäärän ollessa sellainen kuin mitä ihmisille tai eläimille on tarkoitettu.

Lisäksi on huomattu, että deuterio-muodot ovat huomattavasti vähemmän herkkiä D-aminohappo-oksidaasin vaikutukselle ja silti säilyttävät lähtöyhdisteen antibakteriaalisen tehon. Tällöin in vivo-aktiiviteetti suurenee ja säilyy.

3-fluori-D-alaniinin teho verrattuna muihin antibiootteihin käsiteltäessä tartunnan saaneita hiiriä.

Naaraspuolisiin C.D. 1 hiiriin, joiden keskimääräinen paino oli 21,0 g, ruiskutettiin intraperitoneaalisesti 0,5 ml sopivasti laimennettua 16 tunnin lihaliemiviljelmää, joka sisälsi kysymyksessä olevia patogeenejä. (Infektiouhan voimakkuutta edustaa kussakin tapauksessa lihaliemiviljelyn laimennuksen kerrannainen, joka on kuolettava vain 50 %:lle käsittelemättömistä koe-eläimistä, mikä tarkoittaa LD₅₀-annosta). Terapeuttia annettiin nopeasti 0,5 mm:n tilavuusmäärä jollakin seuraavalla tavalla: joko subkutaanisesti selkäpintaan (S.C.), intraperitoneaalisesti (I.P.) tai letkuruokinnan avulla (oraalisesti, P.O.). Kysymyksen ollessa hiiristä, joille oli aiheutettu tartunta Streptococcus- tai Diplococcus-organismeilla, annettiin lisäksi toinen annos terapeuttia 6 tuntia tartunnan jälkeen. Näiden kokeiden tuloksen on ilmaistu tilastollisesti interpoloituna annoksena, joka tarvitaan suojaamaan 50 % tartunnan saaneista koe-eläimistä 7 päivän ajan tartunnan ja käsittelyn jälkeen, (kuolemiset käsittelyn puutteellisuuden ja ei-lääkittyjen vertailueläimien osalta tapahtuivat kaikissa tapauksissa ensimmäisten 3 päivän aikana). Vertailussa käytettyjen yhdisteiden lyhenykset ovat seuraavat:

3FDA = 3-fluori-D-alaniini

CYC = D-sykloseriniini

TET = tetrasykliini

CLM = kloramfenikoli.

Organismi	Terapeuttinen teho (ED ₅₀) mg				
	Antotapa	3FDA	CYCLO	TET	CLM
<u>Escherichia coli</u> 2017	I.P.	0,331	---	0,008	0,040
7-10 LD ₅₀	S.C.	0,361	2,50	0,044	0,52
	P.O.	0,377	2,36	0,600	0,446
<u>Klebsiella pneumoniae</u> "B"	S.C.	0,162	0,332	0,190	0,340
10-30 LD ₅₀	P.O.	0,109	1,51	1,42	0,440
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> 2616 9 LD ₅₀	S.C.	0,897	---	2,4	7,66
<u>Streptococcus pyogenes</u> 3009 9 LD ₅₀	S.C. (x2)	0,023	1,25	0,02	0,71
<u>Staphylococcus aureus</u> 2949 3 LD ₅₀	S.C.	0,538	0,726	0,046	1,5
<u>Diplococcus pneumoniae</u> I-37 17 LD ₅₀	S.C. (x2)	0,104	>10	0,084	1,780
<u>Salmonella schottmuelleri</u> 3010 14 LD ₅₀	P.O.	0,294	2,5	1,217	0,440

Huomattava ylivoimaisuus tehossa käsiteltäessä erilaisia bakteeri-infektioita saavutetaan 3-fluori-D-alaniinilla. Erityisesti suoritettaessa käsittely oraalisesti 3-fluori-D-alaniini tuottaa tehoasteen, joka on samanvertainen käytettyjen antibioottien kloramfenikolin ja tetrasykliinin tehon kanssa tai ylittää sen.

3-fluori-L-alaniinin (3-FLS) ja 3-fluori-D-alaniinin (3FDA) varmuuden ja hoidon tehon vertailu hiirillä

Ryhmiä, jotka käsittävät 5 naaraspuolista C.D.1hiirtä, joiden keskimääräinen paino oli 21 g, käytettiin joko ei tartunnan saaneina koe-eläiminä tai antibakteriaalisen terapian kohteina, joille annettiin intraperitoneaalisenä ruiskeena 0,5 ml *Escherichia coli* 2017:n laimennettua lihaliemiviljelmää, mikä edustaa 7 LD₅₀ bakteeripatogeeneja. Terapeuttia annettiin ilmoitettuna annoksina 0,5 ml:n tilavuus oraalisesti kussakin tapauksessa.

Eloonjääneiden eläinten %:määrä

Annos mg	Ei tartuntaa saaneet vertailuhiiret		Tartunnan saaneet hiiret	
	3-FLA	3-FDA	3-FLA	3-FDA
0	100	100	0	0
0,078	-	-	0	0
0,312	100	100	0	20
1,250	100	100	0	100
5	0	100	0	80
20	-	100	-	-
40	-	100	-	-

Hiirien sietokyky 3-FDA:n suhteen ylittää sietokyvyn 3-FLA:n suhteen ainakin kertoimella 10. Sietomaksimiannoksen alapuolella 3-FLA on ilman terapeuttista vaikutusta. Sitävastoin 3-FDA:n kohtuulliset annokset olivat täysin suojaavia, suuremmat määrät osoittavat in vivo, samoin kuin ne osoittavat in vitro, autoantagonismin ilmenemisen.

3-FDA:n ja 3-FLA:n konsentraatiogradienttien vaikutus bakteerien kasvuun, mikä ilmentää autoantagonismia

Petrimaljassa olevan 2 mm paksun ravintoagarkerroksen päälle levitettiin 10^4 organismeja/cm² Escherichia coli 2017-viljelmää ja sen jälkeen sen päälle asetettiin paperikiekot, joiden halkaisija oli 7 mm ja jotka kantoivat ilmoitetut määrät 3-FDA tai 3-FLA. Sen jälkeen kun oli suoritettu 16 tuntia kestävä haudonta 37°C:ssa, mitattiin ympyränmuotoiset vyöhykkeet, jotka olivat vapaat kiekkoja ympäröivästä bakteerikasvusta. On ainutlaatuista, että tapauksessa, jossa käytettiin 3-FDA, ja tällöinkin vain suurilla lääkeainemäärillä havaittiin paperikiekoon liittyvä kasvurengas, jota seurasi bakteerivapaan agarin rengas. Sisempi kasvuvyöhyke, täsmällisesti sanoen diffundoituvan lääkkeen aikaansaamassa konsentraatiogradientin korkean konsentraation alueessa, on esitetty autoantagonismin vyöhykkeenä.

Kiekkojen ympärillä olevien vyöhykkeiden halkaisija, mm

Määrä kiekolla µg	<u>3-FLA</u>		<u>3-FDA</u>	
	ehkäisy	autoanta- gonismi	ehkäisy	autoanta- gonismi
25	24	0	30	0
50	28	0	33	11
100	32	0	35	13
200	34	0	38	15
400	37	0	41	17

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksinnön mukaista menetelmää.

Esimerkki 1

Liuokseen, jossa on 20 g 3-fluori-DL-alaniinia 200 ml:ssa vettä ja 56 ml:ssa 2,5-n natriumhydroksidiliuosta, lisätään viitenä eränä 15 minuutin välein 62,0 g karbobentsoksikloridia samalla voimakkaasti sekoittaen ja jäähauteella jäähdyttäen. Sekoittamista ja jäähdyttämistä jatketaan vielä 3 tuntia. Reaktion aikana pH ylläpidetään arvossa 10-11 lisäämällä 2,5-n natriumhydroksidin vesiliuosta. Reaktioseos uutetaan etyyliasetaatilla ja uute hylätään. Vesipitoinen faasi säädetään pH-arvoon 2 laimealla kloorivetyhapon vesiliuoksella ja saatu liuos uuteaan useita kertoja etyyliasetaatilla. Etyyliasetaattiuutteet kuivataan vedetömällä magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan kuiviin. Jäännös kiteytetään 400 ml:sta kosteata hiilitetrakloridia ja kuivataan, jolloin saadaan noin 33 g N-karbobentsoksi-3-fluori-DL-alaniinia.

Seos, jossa on 22,3 g L-tyrosiinihydratsidia ja 24,1 g N-karbobentsoksi-3-fluori-DL-alaniinia, liuotetaan samalla kuumentaen etanolin 50-% vesiliuokseen ja liuos haihdutetaan kuiviin vähennetyssä paineessa, jolloin saadaan diastereoisomeeristen L-tyrosiinihydratsidi-suolojen seos, joka sen jälkeen erotetaan jakokiteyttämällä etanolista.

L-tyrosiinihydratsidi-N-karbobentsoksi-3-fluori-D-alaniinisuolet suspensioi-

daan laimeaan kloorivetyhappoon ja suspensio muutetaan useita kertoja etyyliasetaatilla. Etyyliasetaatatti haihdutetaan, jolloin saadaan N-karbobentsoksi-3-fluori-D-alaniini.

Noin 1 g N-karbobentsoksi-3-fluori-D-alaniinia liuotetaan 50 ml:aan metanolia ja saadun liuoksen annetaan reagoida vedyn kanssa ilmakehän paineessa kun läsnä on 1 g 5 %:sta palladiumia hiilikatalyytillä. Katalyytti erotetaan suodattamalla ja metanoli haihdutetaan suodoksesta tyhjöissä. Jällelle jäänyt aine kiteytetään vedestä, jolloin saadaan olennaisesti puhdas 3-fluori-D-alaniini.

Esimerkki 2

Nopeasti sekoitettuun liuokseen, jossa on 20,4 g 3-fluori-DL-alaniinia 200 ml:ssa vettä ja 56 ml:ssa natriumhydroksidin 2,5N vesiliuosta, lisätään pisarittain 28,0 g vasemmalle kiertävää mentoksisetyylikloridia. Lisätään vielä lisää natriumhydroksidin 2,5N vesiliuosta pH:n ylläpitämiseksi alueella 10-11. Sitten reaktioliuos kaadetaan hitaasti kloorivetyhapon laimeaan vesiliuokseen, joka sisältää jätää. Saostunut aine otetaan talteen suodattamalla ja siten saadut sekadiastereo-isomeerit erotetaan jakokiteyttämällä vesipitoisesta etanolista.

Siten saatua N-1-mentoksisetyyli-3-fluori-D-alaniini-stereoisomeeria kuumennetaan paluujäähdyttäen kloorivetyhapon 6N vesiliuoksessa, joka sisältää pienen määrän etanolia liuostarkoitusta varten. Sen jälkeen kun on kuumennettu paluujäähdyttäen 18 tuntia liuos haihdutetaan osittain ja uutetaan kahdesti eetterillä. Vesipitoinen liuos haihdutetaan sitten kuiviin ylimääräisen kloorivetyhapon poistamiseksi. Jällelle jäänyt 3-fluori-D-alaniini-hydrokloridi liuotetaan mahdollisimman pieneen määrään vettä ja pH saatetaan arvoon 4,8 lisäämällä ammoniumhydroksidin väkevää vesiliuosta. Saatu seos jäähdytetään 0°C:seen ja optisesti puhdas 3-fluori-D-alaniini otetaan talteen suodattamalla.

Vaihtoehtoisesti 3-fluori-D-alaniini-hydrokloridi liuotetaan veteen ja liuos johdetaan voimakkaan happaman kationinvaihtohartsin (H⁺-vaihe) lävitse. Kolonni pestään vedellä kloridi-ionien poistamiseksi; kolonni eluoidaan ammoniumhydroksidin laimealla vesiliuoksella ja eluaatti haihdutetaan, jolloin 3-fluori-D-alaniini saostuu ja se poistetaan suodattamalla ja kuivataan.

Esimerkki 3

Suspensio, jossa on 20,7 g 3-fluori-DL-alaniinia 200 ml:ssa bentsyylialkoholia kuumennetaan 100°C:seen samalla kun kuivan kloorivedyn annetaan kuplia seoksen lävitse. Reaktioseosta pidetään 100°C:ssa siihen saakka kunnes saadaan kirkas liuos. Sitten bentsyylialkoholi haihdutetaan pois vähennetyssä paineessa ja jällelle jäänyt öljy liuotetaan 50 ml:aan vettä ja lisätään 200 ml metyleenikloridia. Lisätään kiinteä natriumkarbonaatti samalla sekoittaen kunnes kuohuminen päättyy.

Metyleenikloridikerros erotetaan ja pestään vedellä. Metyleenikloridikerros haihdutetaan sitten tyhjössä, jolloin saadaan 3-fluori-DL-alaniini bentsyyliesteri viskoosisena öljynä.

Noin 10 g 3-fluori-DL-alaniinin bentsyyliesteriä, joka edellä on valmistettu, ja 9,0 g dibentsoyyli-D-viinihappoa yhdistetään 100 ml:ssa etanolia ja seosta lämmitetään lievästi liuoksen saamiseksi. Sitten liuos haihdutetaan kuiviin. Jällelle jäänyt aine liuotetaan mahdollisimman pieneen määrään kuumaa etanolia ja seka-diastereo-isomeerit erotetaan jakokiteyttämällä.

Siten saatu 3-fluori-D-alaniinin bentsyyliesterin dibentsoyyli-D-viinihapposuola lisätään kloorivetyhapon laimeaan vesiliuokseen ja saatu seos uutetaan viidesti 25 ml:n erillä metyleenikloridia, jolloin dibentsoyyli-d-viinihappo saadaan uutetuksi hapon vesiliuoksesta, joka sisältää 3-fluori-D-alaniinihydrokloridin bentsyyliesterin. Hapon vesiliuosta kuumennetaan sitten kiehumaan 5 tunnin ajaksi, jolloin bentsyyliesteri hydrolysoituu (hajoo). Reaktioliuos jäädytetään ja sitten uutetaan metyleenikloridilla. Vesiliuos haihdutetaan kuiviin, jolloin ylimääräinen kloorivetyhappo poistuu. Jällelle jäänyt 3-fluori-D-alaniini-hydrokloridi liuotetaan mahdollisimman pieneen määrään vettä, pH saatetaan arvoon 4,8 lisäämällä ammoniumhydroksidin väkevää vesiliuosta ja sen jälkeen saostunut 3-fluori-D-alaniini otetaan talteen suodattamalla.

Vaihtoehtoisesti sen jälkeen kun dibentsoyyli-D-viinihappo on uutettu 3-fluori-D-alaniinin bentsyyliesterin vesipitoinen hapan liuos hydrataan käyttäen 1,0 g 10 %:sta palladiumia hiilellä, jolloin saadaan 3-fluori-D-alaniini-hydrokloridi, joka muutetaan vapaaksi aminohapoksi 3-fluori-D-alaniiniksi käsittelemällä ammoniumhydroksidin väkevällä vesiliuoksella edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 4

Noin 39,4 g dibentsyyliamiinia lisätään liuokseen, jossa n.17,1 g 2-bromi-3-fluoripropionihappoa 50 ml:ssa isopropanolia. Seoksen annetaan seistä 25°C:ssa 5 tuntia ja sen jälkeen kuumennetaan paluujäädyttään vielä 3 tuntia. Isopropanoli haihdutetaan tyhjössä ja jällelle jääneeseen aineeseen lisätään 200 ml natriumkarbonaatin 10 %:sta vesiliuosta. Saatu vesiliuos uutetaan viidesti 100 ml:n erillä eetteriä. Vesikerros tehdään sitten happameksi etikkahapolla ja uutetaan kahdesti 50 ml:n erillä kloroformia. Kloroformi haihdutetaan tyhjössä ja jällelle jäänyt aine kiteytetään sykloheksaanista N,N-dibentsyyli-3-fluori-DL-alaniinin saamiseksi.

Noin 5,7 g N,N-dibentsyyli-3-fluori-DL-alaniinia ja 4,24 g D(-)-treo-1-p-nitrofenyyli-2-aminopropaani-1,3-diolia yhdistetään 150 ml:ssa kuumaa etanolin 50 %:sta vesiliuosta diastereoisomeeristen suolojen seoksen muodostamiseksi. Jako-

kiteyttämällä vesipitoisesta etanolista saadaan N,N-dibentsyyli-3-fluori-D-alaniinin D(-)-treo-1-p-nitrofenyyli-2-aminopropaani-1,3-dioli-suola. Suola puhdistetaan kiteyttämällä uudelleen etanolin 50 %:sesta vesiliuoksesta.

Noin 2 g N,N-dibentsyyli-3-fluori-D-alaniinin D(-)-treo-1-p-nitrofenyyli-2-amino-propaani-1,3-dioli-suolaa käsitellään 10 ml:lla natriumkarbonaatin 10 %:sta vesiliuosta ja saostunut D(-)-treo-1-p-nitrofenyyli-2-amino-propaani-1,3-dioli erotetaan suodattamalla. Suodos tehdään happameksi etikkahapolla ja N,N-dibentsyyli-3-fluori-D-alaniini uutetaan kloroformiin; haihdutettaessa kloroformiuute saadaan N,N-dibentsyyli-3-fluori-D-alaniini.

Liuos, jossa on 1,0 g N,N-dibentsyyli-3-fluori-D-alaniinia 10 ml:ssa etanolia ja 10 ml:ssa 6N kloorivetyhappoa, hydrataan paineessa $2,8 \text{ kg/cm}^2$ käyttäen 1,0 g 10 %:sta palladiumia hiilellä. Kun vedyn absorboituminen on päättynyt suodattetaan katalyytti ja suodos haihdutetaan kuiviin 3-fluori-D-alaniinin hydrokloridisuolan saamiseksi. Tämä suola liuotetaan veteen ja vesiliuos johdetaan voimakkaasti happamen kationinvaihtohartsin (H^+ -vaihe) lävitse. Kolonni pestään vedellä kloridi-ionien poistamiseksi ja kolonni eluoidaan sitten ammoniumhydroksidin laimealla vesiliuoksella. Saatu eluaatti haihdutetaan ammoniakki poistamiseksi ja saostunut aine otetaan talteen ja kuivataan, jolloin saadaan 3-fluori-D-alaniini.

Esimerkki 5

Liuokseen, jossa on 2 g 3-fluori-DL-alaniinia 20 ml:ssa vettä ja 5,6 ml:ssa natriumhydroksidin 2,5N vesiliuosta, lisätään viidessä erässä 15 minuutin väliajoin noin 6 g karbobentsoksikloridia samalla voimakkaasti sekoittaen ja jäähauteella jäähdyttäen. Sekoittamista ja jäähdyttämistä jatketaan vielä 3 tuntia. Reaktion aikana pH-arvo ylläpidetään alueella 10-11 lisäämällä natriumhydroksidin 2,5N vesiliuosta. Reaktioseos uutetaan etyyliasetaatilla ja vesipitoinen faasi saatetaan pH-arvoon 2 kloorivetyhapon laimealla vesiliuoksella. Vesipitoinen hapan liuos uutetaan sitten etyyliasetaatilla useita kertoja ja uutteen yhdistetään, kuivataan vedettömällä magnesiumsulfaatilla ja haihdutetaan kuiviin. Jällelle jäänyt aine kiteytetään 40 ml:sta kosteaa hiilitetrakloridia ja kuivataan, jolloin saadaan noin 3 g N-karbobentsoksi-3-fluori-DL-alaniinia.

Liuokseen, jossa on 0,150 g N-karbobentsoksi-3-fluori-DL-alaniinia 5 ml:ssa etyyliasetaattia, lisätään 0,094 g 1-~~A~~fenyylietyyliamiinia. Saatu seos haihdutetaan kuiviin, jällelle jäänyt aine liuotetaan 1 ml:aan etyyliasetaattia ja saatu seos jakokiteytetään, jolloin saadaan N-karbobentsoksi-3-fluori-D-alaniinin 1-~~A~~fenyylietyyliamiinisuola. Noin 0,100 g tätä suolaa liuotetaan veteen, liuos tehdään happameksi pH-arvoon 2, hapan liuos uutetaan etyyliasetaatilla ja etyyli-

asetaattiliuos haihdutetaan kuiviin N-karbobentsoksi-3-fluori-D-alaniinin saamiseksi.

Noin 0,255 g N-karbobentsoksi-3-fluori-D-alaniinia liuotetaan 10 ml:aan metanolia ja lisätään 0,3 g 5 %:sta palladiumia hiilellä. Vetykaasun annetaan kuplia seoksen lävitse huoneen lämpötilassa 12 tuntia. Katalyytti poistetaan suodattamalla ja suodatettu liuos haihdutetaan kuiviin. Jällelle jäänyt aine kiteytetään vesi-isopropanolista, jolloin saadaan 3-fluori-D-alaniini.

Esimerkki 6

Noin 12,4 g juuri valmistettua fluoriasetaldehydiä tislataan hitaasti 24,3 g:aan D(+)- α -metyyllibentsyyliamiinia, jota jäähdytetään jää-metanoli-hauteella. Seokseen lisätään noin 50 g vedetöntä kalsiumsulfaattia ja saatua seosta sekoitetaan yli yön huoneen lämpötilassa. Lisätään noin 200 ml eetteriä ja kalsiumsulfaattia erotetaan suodattamalla. Sitten eetterisuodos haihdutetaan tyhjöissä, jällelle jäänyt N-(D- α -metyyllibentsyyli)- β -fluori-asetaldimiini liuotetaan vedettömään etanoliin, etanolipitoinen liuos jäähdytetään -10°C :seen ja lisätään noin 7,9 ml vetysyanidia. Saatua seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa noin 16 tuntia ja etanoli haihdutetaan tyhjöissä 2-(D- α -metyyllibentsyyliamino)-3-fluori-D-propionitriilin saamiseksi. Noin 200 ml kylmää kloorivetyhapon väkevää vesiliuosta lisätään jäähdytettyyn jäännösnitriiliin, seosta sekoitetaan yli yön huoneen lämpötilassa, sen jälkeen kuumennetaan paluujäähdyttäen 8 tuntia ja reaktioliuos haihdutetaan kuiviin tyhjöissä. Ylimäärä kloorivetyhappoa poistetaan jällelle jääneestä aineesta lisäämällä 100 ml t-butanolia ja haihduttamalla kuiviin, jolloin saadaan N-(D- α -metyyllibentsyyli)-3-fluori-D-alaniinin hydrokloridisuola. Tämä suola liuotetaan absoluuttiseen etanoliin, liuos suodatetaan ja lisätään 16 ml propyleenioksidia aminohapon vapauttamiseksi kloorivetysuolasta; seoksen annetaan seistä huoneen lämpötilassa yli yön reaktion saamiseksi täydelliseksi, jolloin saadaan N-(D- α -metyyllibentsyyli)-3-fluori-D-alaniini, joka otetaan talteen suodattamalla, pestään etanolilla ja kiteytetään vesipitoisesta etanolista.

N-(D- α -metyyllibentsyyli)-3-fluori-D-alaniini liuotetaan etanoliin, joka sisältää ekvivalenttisen määrän vetykloridia, ja hydrataan paineessa $2,3 \text{ kg/cm}^2$ kun läsnä on 10 %:sta palladiumhydroksidia hiilellä, jolloin α -metyyllibentsyyli-ryhmä lohkeaa pois. Katalyytti suodatetaan ja suodos haihdutetaan kuiviin 3-fluori-D-alaniini-hydrokloridin saamiseksi. Jällelle jäänyt hydrokloridisuola liuotetaan mahdollisimman pieneen määrään vettä ja pH saatetaan arvoon 4,8 ammoniumhydroksidin väkevällä vesiliuksella. Saatu seos jäähdytetään 0°C :seen ja optisesti puhdas 3-fluori-D-alaniini erotetaan siitä suodattamalla.

Vaihtoehtoisesti 3-fluori-D-alaniinin hydrokloridisuola liuotetaan veteen ja johdetaan voimakkaasti happaman kationinvaihtohartsin (H^+ -vaihe) lävitse. Kolonni pestään vedellä kloridi-ionien poistamiseksi ja kolonni eluoidaan ammoniumhydroksidin laimealla vesiliuoksella. Haihdutettaessa eluaatti muodostuu sakka, joka otetaan talteen suodattamalla ja kuivataan 3-fluori-D-alaniinin saamiseksi.

Esimerkki 7

Kylmä liuos, jossa on 12,1 g D-~~L~~metyylibentsyyliamiinia 100 ml:ssa etanolia, lisätään hitaasti liuokseen, jossa on 5,3 g fluoripalorypälehappoa 250 ml:ssa etanolia, samalla kun saatua liuosta ylläpidetään $0^{\circ}C$:ssa. Liuoksen annetaan lämmetä $25^{\circ}C$:seen ja pidetään tässä lämpötilassa 1 tunti. Liuoksen, joka sisältää 2-(D-~~L~~metyylibentsyyli-imino)-3-fluori-propionihappoa, annetaan sen jälkeen reagoida vedyn kanssa paineessa $2,8 \text{ kg/cm}^2$ käyttäen 5,0 g 10 %:sta palladiumia hiilellä, jolloin hydrausta jatketaan siihen saakka kunnes vedyn absorboituminen päättyy. Katalyytti poistetaan suodattamalla ja suodos haihdutetaan puoleen tilavuuteen. Lisätään noin 100 ml vettä vesipitoisen etanoliliuoksen muodostamiseksi, joka sisältää N-(D-~~L~~metyylibentsyyli)-3-fluori-D-alaniinin, ja metyylibentsyyli-ryhmä hydrataan paineessa $2,8 \text{ kg/cm}^2$ käyttäen 5,0 g 10 %:sta palladiumhydroksidia hiilellä. Kun vedyn absorboituminen on päättynyt katalyytti poistetaan suodattamalla, suodos haihdutetaan kuiviin tyhjöissä ja jällelle jäänyt aine kiteytetään uudelleen 50 %:sta isopropanoli-vedestä ja sen jälkeen vedestä, jolloin saadaan olennaisesti puhdas 3-fluori-D-alaniini.

Esimerkki 8

Kylmä liuos, jossa on 12,1 g D-~~L~~metyylibentsyyliamiinia 100 ml:ssa etanolia, lisätään hitaasti liuokseen, jossa on 5,3 g fluoripalorypälehappoa 250 ml:ssa etanolia, samalla kun saatua liuosta ylläpidetään $0^{\circ}C$:ssa. Liuoksen annetaan lämmetä $25^{\circ}C$:seen ja pidetään tässä lämpötilassa 1 tunti. Liuoksen, joka sisältää 2-(D-~~L~~metyylibentsyyli-imino)-3-fluori-propionihappoa, annetaan sen jälkeen reagoida deuteriumin kanssa paineessa $2,8 \text{ kg/cm}^2$ käyttäen 5,0 g 10 %:sta palladiumia hiilellä, jolloin hydrausta jatketaan siihen saakka kunnes deuteriumin absorboituminen päättyy. Katalyytti poistetaan suodattamalla ja suodos haihdutetaan puoleen tilavuuteen. Lisätään noin 100 ml vettä vesipitoisen etanoliliuoksen muodostamiseksi, joka sisältää N-(D-~~L~~metyylibentsyyli)-2-deutero-3-fluori-D-alaniinin, ja metyylibentsyyli-ryhmä hydrataan hiilellä. Kun vedyn absorboituminen on päättynyt katalyytti poistetaan suodattamalla, suodos haihdutetaan kuiviin tyhjöissä ja jällelle jäänyt aine kiteytetään uudelleen 50 %:sesta isopropanoli-vedestä ja sen jälkeen vedestä, jolloin saadaan olennaisesti puhdas 2-deutero-3-fluori-D-alaniini.

Esimerkki 9

Noin 0,1 millimoolia asymmetristä difosfiini-rodium-katalyyttiä (valmistettu siten kuin on kuvattu julkaisussa Chem. Comm 1971 s. 481) liuotetaan 50 ml:aan bentseeni-etanolia (1:2), ja liuokseen lisätään 11,0 g α -bentsamido- β -fluori-akryylihappoa. Seoksen annetaan reagoida vedyn kanssa paineessa 7 kg/cm² ja lämpötilassa 25°C. Reaktioliuos haihdutetaan kuiviin ja järeille jäänyt aine liuotetaan kloroformiin. Kloroformiuute pestään vedellä, käsitellään hiilellä, suodatetaan ja haihdutetaan kuiviin N-bentsoyyli-3-fluori-D-alaniinin saamiseksi. Lisätään kloorivetyhapon väkevää vesiliuosta ja seosta kuumennetaan paluujäähdyttään 8 tuntia, jolloin bentsoyyli-substituentti hydrolysoituu.

Saatu liuos haihdutetaan kuiviin ja järeille jäänyt aine liuotetaan mahdollisimman pieneen määrään vettä. Vesiliuos säädetään pH-arvoon 4,8 ammoniumhydroksidin väkevällä vesiliuoksella, jäähdytetään ja saatu saostunut aine otetaan talteen suodattamalla, jolloin saadaan raaka 3-fluori-D-alaniini, joka sekoitetaan 5 tilavuuden kanssa vettä 25°C:ssa 24 tuntia. Suodatettaessa saadaan olennaisesti puhdas 3-fluori-D-alaniini.

Esimerkki 10

Noin 0,1 millimoolia asymmetristä difosfiini-rodium-katalyyttiä (valmistettu siten kuin on kuvattu julkaisussa Chem. Comm 1971 s. 481) liuotetaan 50 ml:aan bentseeni-etanolia (1:2), ja liuokseen lisätään 11,0 g α -bentsamido- β -fluori-akryylihappoa. Seoksen annetaan reagoida deuteriumin kanssa paineessa 7 kg/cm² ja lämpötilassa 25°C. Reaktioliuos haihdutetaan kuiviin ja järeille jäänyt aine liuotetaan kloroformiin. Kloroformiuute pestään vedellä, käsitellään hiilellä, suodatetaan ja haihdutetaan kuiviin N-bentsoyyli-2,3-dideutero-3-fluori-D-alaniinin saamiseksi. Lisätään kloorivetyhapon väkevää vesiliuosta ja seosta kuumennetaan paluujäähdyttään 8 tuntia, jolloin bentsoyyli-substituentti hydrolysoituu. Saatu liuos haihdutetaan kuiviin ja järeille jäänyt aine liuotetaan mahdollisimman pieneen määrään vettä. Vesiliuos säädetään pH-arvoon 4,8 ammoniumhydroksidin väkevällä vesiliuoksella, jäähdytetään ja saatu saostunut aine otetaan talteen suodattamalla, jolloin saadaan raaka 2,3-dideutero-3-fluori-D-alaniini, joka sekoitetaan 5 tilavuuden kanssa vettä 25°C:ssa 24 tuntia. Suodatettaessa saadaan olennaisesti puhdas 2,3-dideutero-3-fluori-D-alaniini.

Esimerkki 11

Noin 50 g dimetyylimetyleenimalonaattia (2-metoksikarbonyyliakryylihappometyyliesteri) lisätään 200 ml:aan vedetöntä fluorivetyä lämpötilassa alle -20°C. Fluorivety haihdutetaan ja lisätään 500 ml eetteriä. Eetteriliuos pestään jäävedel-

lä, kuivataan ja suodatetaan. Suodos haihdutetaan kuiviin ja jällelle jäänyt öljy tislataan tyhjössä, jolloin saadaan 3-fluorimetyylimalonihapon (metyyli-2-metoksi-karbonyyli-3-fluoripropionaatti) olennaisesti puhdas dimetyyliesteri.

Tarkalleen 16,4 g tätä metyyli-2-metoksikarbonyyli-3-fluoripropionaattia liuotetaan 100 ml:aan metanolia, lisätään 10 ml natriumhydroksidin 1N vesiliuosta ja lämpötilaa ylläpidetään 0°C:ssa, jolloin muodostuu vesipitoinen metanoliliuos, joka sisältää metyyli-2-karboksi-3-fluoripropionaatin natriumsuolan. Tämä liuos neutraloidaan kloorivedyn laimealla vesiliuoksella, uutetaan kloroformilla ja kloroformiliuos kuivataan ja haihdutetaan tyhjössä, jolloin saadaan metyyli-2-karboksi-3-fluoripropionaatti.

Noin 15 g tätä yhdistettä liuotetaan metanoli-bentseeniin, lisätään stökiömetrisesti ekvivalenttinen määrä ~~L~~-metyylibentsyyliamiinia ja metyyli-2-karboksi-3-fluoripropionaatin saadut diastereoisomeeri-suolat erotetaan jakokiteyttämällä. Metyyli-S-2-karboksi-3-fluoripropionaatin siten saatu ~~L~~-metyylibentsyyliamiini-suola saatetaan reagoimaan vesiliuoksessa tarkalleen yhden stökiömetrisesti ekvivalentin määrän kanssa vesipitoista kloorivetyhappoa, saatu vesiliuos uutetaan kloroformilla ja kloroformiuute kuivataan ja haihdutetaan tyhjössä metyyli-S-2-karboksi-3-fluori-propionaatin saamiseksi.

Noin 3,0 g metyyli-S-2-karboksi-3-fluoripropionaattia liuotetaan 25 ml:aan asetonia ja liuosta käsitellään 0°C:ssa ensinnä 2,02 g:lla trietyyliamiinia ja sitten ylimäärällä etyyliklooriformaattia. Saatuun seokseen lisätään 10 ml vettä ja liuosta sekoitetaan 0°C:ssa noin 30 minuuttia, jolloin muodostuu vesipitoinen asetoniliuos, joka sisältää metyyli-S-2-karboksi-3-fluoripropionaatin vastaavan karboksietoksiesteri-seka-anhydridin. Tähän liuokseen lisätään 1,3 g natriumatsidia ja seosta sekoitetaan vielä 2 tuntia lämpötilassa -5 - 0°C. Reaktioseos kaadetaan jääkylmään natriumkloridin kyllästettyyn vesiliuokseen ja seosta uutetaan useita kertoja eetterillä. Eetteriliuos, joka sisältää metyyli-S-2-atsido-karbonyyli-3-fluoripropionaatin, kuivataan vedettömällä natriumsulfaattilla ja suodatetaan ja lisätään 100 ml dioksaania. Sen jälkeen eetteri haihdutetaan ja saatua dioksaaniliuosta kuumennetaan varovaisesti kiehumispisteeseen (suojaesteen takana), minkä jälkeen atsidi hajoaa ja ryhmittyy uudelleen, jolloin muodostuu metyyli-S-2-isosyanato-3-fluori-propionaatti, so. N-karbonyyli-3-fluori-D-alaniini-metyyliesteri.

Tähän isosyanaattiin lisätään 100 ml vettä ja 50 ml kloorivetyhapon vesiliuosta ja seosta kuumennetaan paluujäähdyttämällä 2 tuntia, jona aikana sekä isosyanaatti- että metyyli-esteriryhmä hydrolysoituu. Vesipitoinen reaktioliuos haih-

dutetaan tyhjöissä, jolloin saadaan raaka 3-fluori-D-alaniini-hydrokloridi (S-3-fluorialaniini-hydrokloridi).

3-fluori-D-alaniinin hydrokloridisuola liuotetaan veteen ja liuos johdetaan voimakkaasti happamen kationinvaihtohartsin (H^+ -vaihe) lävitse. Kolonni pestään vedellä kloridi-ionin poistamiseksi ja kolonni eluoidaan ammoniumhydroksidin laimealla vesiliuoksella. Eluaatti haihdutetaan ja saostunut aine otetaan talteen suodattamalla, kuivataan ja kiteytetään 50 %:sesta vesipitoisesta isopropanolista olennaisesti puhtaan 3-fluori-D-alaniinin (S-3-fluori-alaniinin) saamiseksi.

Vaihtoehtoisesti jos metyyli-S-2-atsidokarbonyyli-3-fluoripropionaatti hajotetaan etanoliuoksessa muodostuu 3-fluori-D-alaniini-metyyliesterin vastaava etyyli-uretaani (S-3-fluorialaniinimetyyliesterin etyyli-uretaani). Viimeksimainitun annetaan sitten reagoida vesipitoisen kloorivetyhapon kanssa 3-fluori-D-alaniini-hydrokloridin muodostamiseksi, joka muutetaan 3-fluori-D-alaniiniksi edellä kuvatulla tavalla.

Optisesti aktiiviset yhdisteet tässä esimerkissä merkitään toisinaan merkinnöillä "R" ja "S" julkaisun IUPAC Tentative Rules for the Nomenclature tai Organic Chemistry; Section E Fundamental Stereochemistry, J. Org. Chem 35 s. 2663-7 (1970) mukaan.

Samalla tavoin metyyli-S-2-karboksi-3-fluoripropionaatin karboetoksiesteri-seka-anhydridin annetaan reagoida ammoniakin (natriumatsidin asemesta) kanssa, jolloin muodostuu metyyli-S-2-amino-karbonyyli-3-fluoripropionaatti, jonka annetaan sitten reagoida natriumhypobromidin kanssa, jolloin amidoryhmä ryhmittyy uudelleen ja muodostuu käytettäessä dioksaania liuottimena metyyli-S-2-isosyanato-3-fluoripropionaatti ja käytettäessä etanolia liuottimena 3-fluori-D-alaniinin vastaava etyyli-uretaani, so. N-etoksikarbonyyli-3-fluori-D-alaniini.

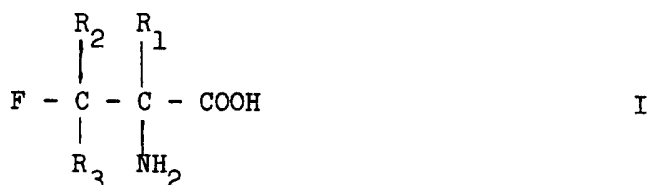
Vaihtoehtoisesti ja edellä kuvatun menetelmän mukaisesti 2-syano-akryylihapon annetaan reagoida fluorivedyn kanssa 2-karboksi-3-fluoripropionitriilin muodostamiseksi, joka erotetaan stereoisomeereikseen käyttämällä L-~~metyyli~~metyylibentsyyliamiinia hajotusaineena R-2-karboksi-3-fluoripropionitriilin muodostamiseksi, joka muutetaan seka-anhydridiksi ja viimeksimainitun annetaan reagoida natriumatsidin kanssa edellä kuvatulla tavalla R-2-atsidokarbonyyli-3-fluoripropionitriilin muodostamiseksi. Tätä kuumennetaan atsidin hajottamiseksi ja S-2-isosyanato-3-fluoripropionitriilin muodostamiseksi, jota sitten kuumennetaan paluujäähdyttämällä vesipitoisen kloorivetyhapon (kuten metyyli-S-2-isosyanato-3-fluori-propionaatin hydrolyysin yhteydessä) kanssa, jolloin sekä isosyanato- että nitriiliryhmä hydrolysoituu ja muodostuu 3-fluori-D-alaniini-hydrokloridi.

Vaihtoehtoisesti saadaan optisesti aktiiviset D-2-amino-3-fluori-propionitriili-yhdisteet hajottamalla vastaava DL-2-amino-3-fluori-propionitriili-yhdiste. Esim. DL-2-amino-3-fluoripropionitriili itse hajotetaan käyttäen optisesti aktiivista hajotusainetta, kuten viinihappoa, kamfori-10-sulfonihappoa ja sen kaltaisia, jolloin muodostuu D-2-amino-3-fluori-propionitriilin optisesti aktiivinen suola, joka käsiteltäessä vesipitoisella ammoniakilla muuttuu vapaaksi D-2-amino-3-fluoripropionitriiliksi, joka uutetaan vesiliuoksesta eetterillä. D-2-amino-3-fluori-propionitriili saatetaan sitten reagoimaan lämpötilassa alle 0°C väkevöidyn (50 % HCl) kloorivetyhapon kanssa D-2-amino-3-fluoripropioamidin muodostamiseksi. Sitä kuumennetaan kloorivetyhapon väkevän vesiliuoksen kanssa paluujäähdyttäen 3-fluori-D-alaniinin hydrokloridin suolan muodostamiseksi.

Erilaisia muutoksia ja muunnelmia voidaan tehdä esillä olevasta keksinnöstä poikkeamatta keksinnön perusideasta.

Patenttivaatimus:

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen 3-fluori-D-alaniinin tai sen deuterioanalogin valmistamiseksi, joilla yhdisteillä on kaava



jossa R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät vetyä tai deuteriumia, t u n n e t t u siitä, että

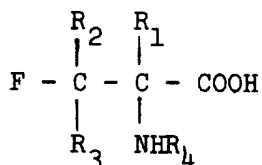
a) kaavan I mukaisen 3-fluori-DL-alaniinin tai sen deuterioanalogin ja optisesti aktiivisen emäksen suolojen seos alistetaan jakokiteytykseen, jotta saadaan 3-fluori-D-alaniinin suola käytännöllisesti katsoen puhtaassa muodossa, ja että suolaa käsitellään vahvalla hapolla kaavan I mukaisen yhdisteen vapauttamiseksi suolastaan, tai

b) kaavan I mukaisen 3-fluori-DL-alaniinin tai sen deuterioanalogin ja optisesti aktiivisen hapon suolojen seos alistetaan jakokiteytykseen, jotta saadaan 3-fluori-D-alaniinin suola käytännöllisesti katsoen puhtaassa muodossa, ja että suolaa käsitellään vahvalla emäksellä kaavan I mukaisen yhdisteen vapauttamiseksi suolastaan, tai

c) kaavan I mukaisen 3-fluori-DL-alaniinin tai sen deuterioanalogin aminosuojatun johdannaisen ja optisesti aktiivisen hapon suolojen seos alistetaan jakokiteytykseen, jotta saadaan vastaava aminosuojattu 3-fluori-D-alaniinisuo-la käytännöllisesti katsoen puhtaassa muodossa, että saatua suolaa käsitellään vahvalla hapolla kaavan I mukaisen yhdisteen aminosuojatun johdannaisen vapauttamiseksi suolastaan, ja että aminosuojaryhmä lohkaistaan lopuksi pois.

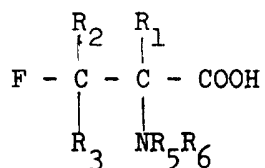
tai

d) 3-fluori-D-alaniinista tai sen deuterioanalogin aminosuojatusta johdannaisesta, jonka kaava on



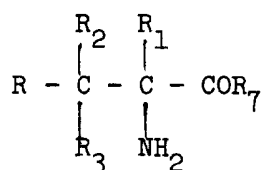
jossa R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät samaa kuin edellä, ja R_4 on karbobentsoksi, bentso-yyli, klooriasetyyli tai mentoksisetyyli, lohkaistaan suojaryhmä R_4 hydraamalla tai hydrolysoimalla pois.

e) 3-fluori-D-alaniinista tai sen deuterioanalogin aminosuojatusta johdannaisesta, jonka kaava on



jossa R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät samaa kuin edellä, ja joko R_5 on vety ja R_6 on karbobentsoksi, bentsyyli, α -metyylibentsyyli tai α -karboksibentsyyli, tai R_5 ja R_6 ovat kumpikin bentsyyli, lohkaistaan suojaryhmä R_6 katalyyttisesti hydraamalla pois, tai

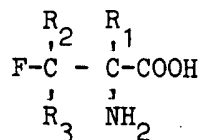
f) 3-fluori-D-alaniinista tai sen deuterioanalogin karboksyyლისuojatusta johdannaisesta, jonka kaava on



jossa R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät samaa kuin edellä, ja R_7 on esteri-, amidi- tai syanoryhmä, lohkaistaan suojaryhmä R_7 hydrolysoimalla pois.

Patentkrav:

Förfarande för framställning av terapeutiskt användbar 3-fluor-D-alanin eller dess deuterioanalog, vilka föreningar har formeln



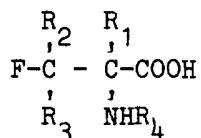
där R_1 , R_2 och R_3 betecknar väte eller deuterium, k ä n n e t e c k n a t därav, att

a) en blandning av 3-fluor-DL-alanin med formeln I eller dess deuterioanalog och av salter av en optiskt aktiv bas underkastas fraktionerad kristallisering, för att bilda ett salt av 3-fluor-D-alanin i praktiskt taget ren form, och att saltet behandlas med en stark bas i och för frigöring av en förening med formeln I från dess salt, eller

b) en blandning av 3-fluor-DL-alanin med formeln I eller dess deuterioanalog och av salter av en optiskt aktiv syra underkastas fraktionerad kristallisering, för att bilda ett salt av 3-fluor-D-alanin i praktiskt taget ren form, och att saltet behandlas med en stark bas för frigöring av en förening med formeln I från dess salt, eller

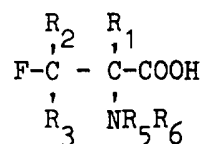
c) en blandning av 3-fluor-DL-alanin med formeln I eller av ett aminoskyddat derivat av dess deuterioanalog och av salter av en optiskt aktiv syra underkastas fraktionerad kristallisering, för att bilda ett motsvarande aminoskyddat salt av 3-fluor-D-alanin i praktiskt taget ren form, och att det erhållna saltet behandlas med en stark syra för frigöring av ett aminoskyddat derivat av en förening med formeln I ur dess salt, och att aminoskyddsgruppen till slut avspaltas, eller

d) från ett aminoskyddat derivat av 3-fluor-D-alanin eller dess deuterioanalog, vilket derivat har formeln



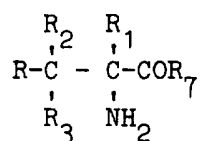
där R_1 , R_2 och R_3 har ovannämnda betydelse, och R_4 är karbobensoxi, bensoyl, kloracetyl eller mentoxiacetyl, avspaltas skyddsgruppen R_4 genom hydratisering eller hydrolysering, eller

e) från ett aminoskyddat derivat av 3-fluor-D-alanin eller dess deuterio-analog, vilket derivat har formeln



där R_1 , R_2 och R_3 har ovannämnda betydelse, och antingen R_5 är väte och R_6 är karbo ensoxi, bensyl, α -metylbensyl eller α -karboxibensyl, eller R_5 och R_6 båda betecknar bensyl, avspaltas skyddsgruppen R_6 genom katalytisk hydratisering

f) från ett karboxylskyddat derivat av 3-fluor-D-alanin eller dess deuterioanalog, vilket derivat har formeln



där R_1 , R_2 och R_3 har ovannämnda betydelse, och R_7 är en ester-, amid- eller cyanogrupp avspaltas skyddsgruppen R_7 genom hydrolysering.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia:-Offentliga finska patentansökningar: 3729/71.

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 136 067.