



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

220 962 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 98 02988
(22) A bejelentés napja: 1989. 11. 13.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
P9201587 1989. 11. 13. HU
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 89/05228
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/07501

(51) Int. Cl.⁷

C 12 P 41/00

C 07 D 239/10

C 07 C 233/00

C 07 C 255/31

(40) A közzététel napja: 1994. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2002. 07. 29.

(72) Feltaláló:

Saccomano, Nicholas A., Ledyard, Connecticut
(US)

(73) Szabadalmaz:

Pfizer Inc., New York, New York (US)

(74) Képvisező:

dr. Vitális László, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

Optikailag aktív

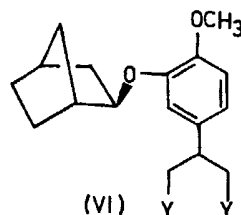
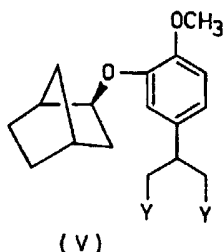
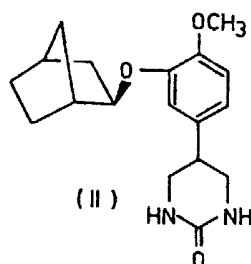
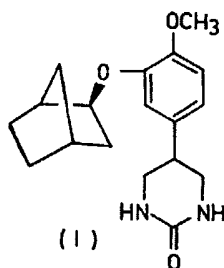
**5-[3-(exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi)-4-metoxi-fenil]-3,4,5,6-tetrahidro-
pirimidin-2(1H)-on, enantiomere, valamint intermedierek**

KIVONAT

A találmány tárgyköréhez tartoznak az (I) és (II) abszolút sztereokémiai képletű, optikailag aktív vegyületek, továbbá az (V) és (VI) általános, abszolút sztereoké-

miai képletű, optikailag aktív vegyületek, ahol a képletben

Y jelentése –CN vagy –CONH₂ képletű csoport.



HU 220 962 B1

A találmány tárgya optikailag aktív, (I) képletű 5-(3-[(2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidro-pirimidin-2-(1H)-on és (II) képletű enantiomere, az 5-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidro-pirimidin-2-(1H)-on, továbbá a szintézisük során használt (III) és (IV) képletű, valamint az (V) és (VI) általános képletű köztitermékek.

Az (I) és (II) képletű vegyületek különösen értékes változatai a WO 87/06576 számú nemzetközi közrebecsítési iratban ismertetett, depresszióellenes szerként használható számos vegyületnek. Bár a fenti közrebecsítési irat ismerteti a racém 5-(3-[(2S,2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidro-pirimidin-2-(1H)-ont, és utal optikailag aktív változataira, érdemben azonban nem tárgyalja az enantiomereket vagy azok előállítását. A leírás további részében tárgyaltak értelmében a találmány szerinti, (I) és (II) képletű vegyületek különösen hasznosak asztma és bizonyos bőrbetegségek kezelése szempontjából is.

Optikailag aktív (2R)- és (2S)-endo-norborneolokat eddig racém exo-norborneol-hemifitalát-észter optikailag aktív fenetil-aminokkal végzett rezolválása, optikailag aktív exo-norborneolokká történő hidrolízise, króm(VI)-oxiddal optikailag aktív norbornánokká történő oxidálása, és végül Li(szek-Bu)₃BH alkalmazásával a kívánt endo-izomerekre történő redukálása útján állítottak elő [Irwin és munkatársai: J. Am. Chem. Soc., 98, pp. 8476–8481 (1979)]. A fenti irodalmi forrásnak megfelelően az endo-norborneolok enantiomerdúsítását a racém 2-norbornanon lómájából kivont alkohol-dehidrogenáz által katalizált, nem teljesen végigvitt redukciója útján érték el; míg a racém exo-norborneol ugyanezen enzim által katalizált, nem teljesen végigvitt oxidációja az enantiomerek szempontjából dúsított exo-norborneolokat eredményezett. Aszimmetrikus hidrobórozás útján is előállítottak (-)-exo-norborneolt [Brown és munkatársai: J. Org. Chem., 47, pp. 5065–5069 (1982)].

A (2R)-endo-norborneol név használatos még a (2R)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-ol vagy (1S,2R,4R)-biciklo[2.2.1]heptan-2-ol megjelölésére is. Hasonlóképpen (2S)-endo-norborneolnak is nevezik az enantiomer (2S)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-olt vagy az (1R,2S,4S)-biciklo[2.2.1]heptan-2-olt. A fentiek analógiájára a (2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il és (2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il származtatott helyettesítő csoportokat (1S,2S,4R)-biciklo[2.2.1]hept-2-il-, illetve az (1R,2R,4S)-biciklo[2.2.1]hept-2-il-csoportot (1S,2S,4R)-biciklo[2.2.1]hept-2-il-csoportnak is nevezzük.

Bizonyos királis alkoholokat eddig sertés-pankreatinlipáz által katalizált, közel vízmentes szerves oldószerben végzett átészterezésével rezolváltak [Kirchner és munkatársai: J. Am. Chem. Soc. 107, pp. 7072–7076 (1985)]. Racém 2-oktanol és 2,2,2-triklór-etil-butirát 47%-os konverziója például nagy optikai tisztaságú (R)-2-oktil-butirátot eredményezett. Ezen eljárást racém exo-norborneolra alkalmazva azonban mind a visszanyert alkohol, mind a butirát-észter-

termék lényegében racém maradt, bár az átészterezés ki-mondottan az enzim közvetítésével ment végbe (amit igazol az, hogy a reakció csak az enzim jelenlétében játszódik le).

Annak ellenére, hogy az exo-norborneol lipáz által katalizált átészterezése nem teszi lehetővé az exo-izomer optikai rezolválását, a kutatást tovább folytatva felismer-tük, hogy ez az eljárás egyszerű és hatásos módszert biz-tosít endo-norborneol optikai rezolválására.

Fentiek alapján a találmány az (I) és (II) képletű opti-kailag aktív vegyületek, valamint az (V) és (VI) általá-nos képletű optikailag aktív köztitermékek, ahol a képle-tekben Y jelentése –CN vagy –CONH₂ képletű csoport.

Optikailag aktív (2S)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-ol vagy (2R)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-ol előállításá-ra úgy járunk el, hogy

i) racém endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-olt és 2,2,2-triklór-etil-butirátot a reakcióra nézve inert, vízmentes oldószerben katalitikus mennyiségű emlős-pankrea-tinlipázzal 15 és 40 °C közötti hőmérsékleten 40–50%-os konverzióig részlegesen átészterezünk, és így (2S)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-ol és (2R)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-ol vajsav-észterének keverékét állítjuk elő, majd

ii) a kapott keverékből elválasztjuk a (2S)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-olt, vagy

a kapott keverékből elválasztjuk a (2R)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-ol vajsav-észterét, és azt ismert módon (2R)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-ollá hidrolizáljuk.

Analóg kifejezéseket használva a kiindulási anya-gok részleges átészterezését követően a kapott reak-cióelegyből (VII) képletű reagálatlan (-)-(2S)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-olt, azaz (2S)-endo-norborneolt és (2R)-endo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-butirátot különí-tünk el, utóbbi olyan észter, amely (VIII) képletű enan-tiomer (+)-(2R)-endo-biciklo[2.2.1]heptan-2-ol, azaz (2R)-endo-norborneol képződése közben hidrolizál.

A leírásban használt „reakcióra nézve inert” kifeje-zés olyan oldószerre vonatkozik, amely a kiindulási anyagokkal, reagensekkel, köztitermékekkel vagy ter-mékekkel nem lép olyan módon kölcsönhatásba, amely hátrányosan befolyásolja a kívánt termék vagy termé-kek kitermelését.

A fenti eljárás előnyös változatában sertésből száрма-zó lipázt, oldószerként pedig étert alkalmazunk. Eljárha-tunk úgy, hogy a ii) lépésben kapott (2S)-endo-bicik-lo[2.2.1]heptan-2-olt, illetve (2R)-endo-bicik-lo[2.2.1]heptan-2-olt 5-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-onná vagy 5-(3-[(2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-onná alakítjuk. Ehhez

iii) a ii) lépésben kapott (2S)-endo-bicik-lo[2.2.1]heptan-2-olt vagy (2R)-endo-biciklo[2.2.1]hep-tan-2-olt legalább 1 mólekvalens 3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehiddel 1 mólekvalens trifenil-foszfín és 1 mól-ekvalens dietil-azo-dikarboxilát jelenlétében a reakció-ra nézve inert oldószerben 50–100 °C hőmérsékleten 3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-

benzaldehyddé vagy 3-[(2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-benzaldehyddé alakítjuk;

iv) a kapott 3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-benzaldehydet vagy 3-[(2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-benzaldehydet piridinben legalább 2 mólekivivalens, 2-ciano-ecetsavval katalitikus mennyiségű piperidin jelenlétében 25–100 °C hőmérsékleten 3-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-pentán-dinitrillé vagy 3-(3-[(2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-pentán-dinitrillé alakítjuk;

v) a kapott 3-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-pentán-dinitrilt vagy 3-(3-[(2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-pentán-dinitrilt ismert módon 3-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-glutáramiddá vagy 3-(3-[(2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-glutáramiddá hidrogénezzük; és

vi) a kapott 3-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-glutáramidot vagy 3-(3-[(2S)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-glutáramidot piridinben, ólom-tetraacetát moláris feleslege jelenlétében 5-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-onná vagy 5-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-onná ciklizáljuk.

A fenti eljárás különböző változatai könnyen lefolytathatók. Ennek megfelelően racém endo-norborneolt és 2,2,2-triklór-etil-butirát-észtert a reakcióra nézve inert, szerves oldószerben oldunk mólekivivalensnyi mennyiségekben. Oldószerként előnyösen étereket, így dietil-étert, diizopropil-étert, tetrahidrofuránt vagy dioxánt alkalmazunk, amelyek lényegében vízmentesek, és ugyanakkor jól oldják a fenti kiindulási anyagokat. Száraz porként részletekben emlős-pankreatinlipázt (előnyösen a kereskedelmi forgalomban könnyen hozzáférhető, sertésből származó pankreatinlipázt) alkalmazunk olyan mennyiségben, amely elfogadható sebességű átszterezés lefolytatásához szükséges. A hőmérséklet nagyon kritikus paraméter, ennek értékét általában 15 °C és 40 °C között tartjuk. Ha a hőmérséklet túl alacsony, a reakciósebesség túl lassú, míg túl magas hőmérsékletek könnyen inaktívválik az enzimet. A reakció lefolyását analitikai eljárásokkal követjük (ehhez kényelmes módszert nyújt az ¹H-NMR-eljárás, amellyel könnyen megkülönböztethetjük a kiindulási anyagokat és a kapott észtert). A kinyert (2S)-endo-norborneol és (2R)-endo-norbornil-butirát lehető legnagyobb optikai tisztaságának biztosítására 40–50%-os konverzió esetén a reakciót megszüntetjük. Ezeket a termékeket hagyományos eljárásokkal, alkalmasan kromatográfias eljárásokkal választjuk el, és (2R)-endo-norborneol előállítására az észtert ismert módon hidrolizáljuk.

A kapott, optikailag aktív (2R)- és (2S)-endo-norborneolt a fent idézett WO 87/06576 számú nemzetközi közrebocsátási iratban ismertetett eljárással (III), illetve (IV) képletű aldehiddé alakítjuk.

Ezt követően a fenti, (III) vagy (IV) képletű aldehidet legalább 2 mólekivivalens mennyiségű ciano-

ecetsavval kondenzáltatjuk, ennek során (V) vagy (VI) általános képletű dinitrilt kapunk, ahol a képletben Y jelentése –CN képletű csoport. A kondenzációs reakciót alkalmasan piridinben folytatjuk le, amely részben bázikus katalizátorként is szolgál, szekunder amin, előnyösen nem gátolt szekunder amin, így piperidin vagy pirrolidin jelenlétében. A szekunder amin a sztöchiometrikus arányhoz viszonyítva általában moláris feleslegben alkalmazzuk. Bár a reakció kezdeti szakaszát lefolytatjuk környezeti hőmérsékleten, a (dekarboxilezést is magában foglaló) reakciót legcélszerűbben 80–110 °C-ig történő melegítés közben fejezhetjük be.

Az (V) vagy (VI) általános képletű dinitrilt szokásos eljárással végzett vízfelvétel útján (V) vagy (VI) általános képletű biszamidá alakítjuk, ahol a képletben Y jelentése –CONH₂ képletű csoport. Ezt a reakciót alkalmasan úgy folytatjuk le, hogy a dinitrilt a reakcióra nézve inert, vízzel hígított szerves oldószerben (így 2:1 térfogatarányú aceton:víz elegyben) H₂O₂ 0,5 moláris mennyiségével, nátrium-karbonát feleslegének jelenlétében reagáltatjuk 0–30 °C hőmérsékleten.

A (VI) általános képletű biszamidokat ciklizálva végül (I) vagy (II) képletű, optikailag aktív 5-(3-[exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-ont kapunk. Ezt a reakciót legalkalmasabban moláris feleslegben lévő ólom-tetraacetát útján folytathatjuk le oldószerként feleslegben lévő piridint használva. A hőmérséklet értéke nem kritikus, 0–60 °C hőmérséklet-tartományban általában kielégítő eredményt kapunk. Környezeti hőmérsékletet alkalmazva elkerüljük a fűtés vagy hűtés költségét.

A fent idézett WO 87/06576 számú nemzetközi közrebocsátási irat 25. oldalán közöltek szerint az 5-(3-[exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-on patkányok agykérgéből készített foszfodiészterázok inhibitoraként *in vitro* aktivitást mutat. Az asztma kezelésére való alkalmassága szempontjából mértékadóbb azonban a tengerimalac tüdejéből származó foszfodiészterázok inhibitoraként mutatott hatásossága, amelyet részletesen bemutat az 1. példa, amelynek adatai szerint a találmány szerinti, (I) és (II) képletű, optikailag aktív vegyületek hasonló aktivitást mutatnak. Az asztma kezelésére való alkalmasságot mutatja továbbá az a körülmény is, hogy a találmány szerinti vegyületek inhibítálják az *in vivo* eozinofil migrációt antigén hatásának kitett tengerimalacok érzékenyített tüdőszövetébe, amint azt a 2. példa részletesen bemutatja. A találmány szerinti vegyületek alkalmasságát érintkezéssel szembeni túlérzékenység által kiváltott pikkelysömör és bőrgyulladás esetén az mutatja, hogy a találmány szerinti vegyületek képesek *in vivo* bőrdéma inhibálására ovalbuminnal szemben érzékennyé tett tengerimalacokban, amint a 3. példa szemlélteti.

Asztma vagy gyulladásoz bőrbetegségek (I) vagy (II) képletű vegyületekkel vagy a megfelelő racém vegyülettel történő kezelése során az adagolás általában 0,01–2 mg/kg/nap (0,5–100 mg/nap egy 50 kg testtömegű ember esetén) egyetlen adagban vagy megosztott adagokban függetlenül a beadás módjától. A konkrét vegyülettől és az egyed betegségének természetétől füg-

gőn a kezelőorvos megítélése szerint a fenti tartományon kívüli dózisok is előírhatók. Az asztma kezelése szempontjából általában előnyös (a cseppek vagy permet alakjában alkalmazott) intranazális beadás, aeroszol szájon keresztüli inhalálása és a hagyományos orális beadás. Ha azonban a beteg képtelen nyelni, vagy az orális beadás egyéb szempontból kedvezőtlen, a beadás előnyös szisztémás módja parenterális (intramuszkuláris vagy intravénás). Gyulladásos bőrbetegségek kezelése esetén a beadás előnyös módja orális vagy topikus. A légutak gyulladásos betegségeinek kezelése esetén az intranazális vagy orális beadás előnyös.

A találmány szerinti vegyületeket általában gyógyászati készítmények alakjában adják be, amelyek egy vagy több, találmány szerinti vegyületet gyógyászatiilag elfogadható hordozóanyaggal vagy hígítóanyaggal együtt tartalmaznak. Az ilyen készítményeket általában hagyományos módon formálják a kívánt beadás szempontjából alkalmas szilárd vagy folyékony hordozóanyagokat vagy hígítóanyagokat használva. Orális beadás esetén tabletták, kemény vagy lágy zselatinkapszulák, szuszpenziók, granulátumok, porok és hasonló; parenterális beadás esetén injektálható oldatok vagy szuszpenziók és hasonló; topikális alkalmazás esetén oldatok, arcvizek, balzsamok, gyógykrémek és hasonló használatosak, amelyek egységnyi térfogatban általában 0,1–1 tömeg% hatóanyagot tartalmaznak; intranazális beadás vagy inhalálás céljára általában olyan oldat használatos, amely egy térfogategységben általában 0,1–1 tömeg% hatóanyagot tartalmaz.

A következőkben a találmányt nem korlátozó jellegű példákkal szemléltetjük.

1. példa

Tüdőből származó foszfodiészteráz (PDEIV) inhibíciója

Tengerimalacok tüdőszövetét annak 1 g tömegére számítva 10 ml térfogatú homogenizáló pufferoldatba (20 mmol/l bisz-Tris, 5 mmol/l 2-merkapto-etanol, 2 mmol/l benzamidin, 2 mmol/l EDTA, 50 mmol/l nátrium-acetát; pH=6,5) tettük. A szövetet homogenizáltuk, ehhez Tekmar Tissumizer típusú berendezést használtunk 10 másodperc időtartamig teljes sebességgel. 2-Propanolban lévő 50 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) adagoltunk a pufferhez közvetlenül a homogenizálás előtt a PMSF végső 50 µmol/l koncentrációjának beállítására. A homogenizált keveréket 10 perc időtartamig 12 000×g mellett centrifugáltuk 4 °C hőmérsékleten. A felülúszót gézen és üveggyapo-

ton szűrtük, majd 17×1,5 cm méretű, DEAE-Sepharose CL-6B típusú oszlopra vittük, amelynek egyensúlyát előzőleg 4 °C hőmérsékletű homogenizálópufferrel állítottuk be. 1 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. Miután a felülúszó áthaladt az oszlopon, az oszlopot a felülúszó térfogatának legalább kétszeresét kitevő térfogatú homogenizálópufferrel mostuk át. A PDE eluálására lineáris gradiensű 0,05–0,1 mol/l nátrium-acetát-oldatot alkalmaztunk. 100, egyenként 5 ml térfogatú frakciót gyűjtöttünk össze. A frakciókat a sajátos PDEIV-aktivitás szempontjából megvizsgáltuk, ehhez [³H]cAMP útján végzett hidrolízist és ismert PDEIV-vel történő összehasonlítást használtunk.

A vizsgált vegyületek előállítás

A vegyületeket DMSO-ban oldottuk 10⁻² mol/l koncentrációban, majd vízzel 1:25 térfogatarányban hígítottuk (4×10⁻⁴ mol/l vegyület, 4 tömeg% DMSO). A további sorozathígításokat 4 tömeg%-os DMSO-ban készítettük a kívánt koncentrációk biztosítására. A vizsgálati csövek végső DMSO-koncentrációja 1 tömeg% volt.

3 párhuzamos mintát használva 12×75 mm méretű üvegcsövekbe sorrendben a következőket adagoltuk 0 °C hőmérsékleten (valamennyi koncentráció a vizsgálati csőben lévő koncentrációként van megadva):

- 25 µl vizsgálati vegyület vagy DMSO (1 tömeg%, ellenőrző és vakpróba számára);
- 25 µl vizsgálati puffer (50 mmol/l Tris, 10 mmol/l MgCl₂, pH=7,5);
- 25 µl [³H]-cAMP (1 µmol/l) és
- 25 µl PDEIV enzim (a vakpróba-hoz az enzimet 10 percen keresztül forrásban lévő vízfürdőben előinkubáltuk).

Az üvegcsöveket rázás után 10 perc időtartamra 37 °C hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztük, amely időtartam elteltékor a reakciót leállítottuk. Ehhez a csöveket 2 perc időtartamra forrásban lévő vízfürdőbe helyeztük. A jeges fürdőbe helyezett csövek mindegyikébe mosópuffert (0,5 ml, 0,1 mol/l HEPES/0,1 mol/l NaCl; pH=8,5) adtunk. Mindegyik cső tartalmát Affi-Gel 601 típusú oszlopra (bóraffinitású gél, ágytérfogat: 1,2 ml) vittük, amelyet előzőleg mosópufferrel egyensúlyi állapotba hoztunk. 2×6 ml térfogatú mosópufferrel kimostuk a [³H]-cAMP-t, majd a [³H]5'AMP-t 6 ml (0,25 mol/l-es) ecetsavoldattal eluáltuk. Intenzív keverés után egy megfelelő ampullában lévő 3 ml Atomlight szcintillációs folyadékhoz 1 ml eluátumot adtunk, és intenzív keverés után megmértük a [³H]-ra vonatkozó beütések számát.

A százalékokban kifejezett inhibíciót a következő képlet alapján határozzuk meg:

$$\text{inhibíció (\%)} = 1 - \frac{\text{átlagos beütés/perc (vizsgált vegyület)} - \text{átlagos beütés/perc [vakpróba (forralt enzim)]}{\text{átlagos beütés/perc [ellenőrző minta (vizsgált vegyület nélkül)] - \text{átlagos beütés/perc [vakpróba (forralt enzim)]}}$$

IC₅₀-ként definiáljuk a vegyületek azon koncentrációját, amely a [³H]cAMP [³H]5'AMP-vé történő sajátos hidrolízisének 50%-os mértékben gátolja.

Ebben a vizsgálatban a racém 5-(3-[exobicyclo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tet-

rahidropirimidin-2-(1H)-on IC₅₀ értéke 0,5 µmol/l. A vizsgálat szerint ugyanilyen aktivitást mutatott a két megfelelő optikailag aktív, enantiomer vegyület.

2. példa

Fozinofil migráció gátlása antigén hatásának kitett, érzékenyített tüdőszövetben tengerimalacok esetén

Normál (300–350 g testtömegű) Hartley-típusú tengerimalacokat (szállító: Charles River Laboratories) érzékenyítés előtt 5–7 napig tartottunk. A tengerimalacokat ezután 0,5 mg/kg anti-OA IgG1-gyel érzékenyítettük vagy az ellenőrző vizsgálatok számára sóoldattal kezeltük. 48–72 óra múlva a tengerimalacoknak 6–6 állatból álló csoportokban 32 mg/kg-ig terjedő dózisokban orálisan adtuk be a vizsgált vegyületeket, ennek során hordozóanyagként 2 tömeg% Tween 80 szolgált. 1–1,5 óra múlva az állatokba 5 mg/kg piril-amint injektáltunk. A piril-amin beadását követő 30 perc múlva az állatokat 10 perc időtartamra 0,1 tömeg% ovalbumin (OA) aeroszol hatásának tettük ki, amit 15 perces ködkésleltetési periódus követett Tri-R típusú levegő útján fertőző berendezésben (komprimált légáram=20 l/perc, fő légáram=8,4 l/perc). A tengerimalacokat eltávolítottuk a berendezésből, és megölésük, továbbá az azt követő tüdőöblítést megelőzően 18 órán keresztül ketrecekben tartottuk.

A tengerimalacokat 3 ml uretánnal (0,5 g/ml) öltük meg, majd légcsövüket elválasztottuk az azzal szomszédos szövetről. A légcső körül lazán sebészeti fonalat kötöttünk, majd a csecsemőmirigytől 1–2 cm távolságban bemetszettük a légcsövet. Egy 15G típusú, tompa, 1 cm-es adagolótűt helyeztünk a légcsőbe, és a tű helyzetének biztosítására a fonalat szorosra húztuk. 3×10 ml sóoldatot ürítettünk a tüdőbe 5 alkalommal.

Az oldat 20–25 ml térfogatú részét visszanyertük, és jégre helyezett 50 ml térfogatú, kúpos csőbe tettük. A mosófolyadék egyenként 0,475 ml térfogatú részleteit 0,025 ml 2 tömeg%-os Triton X-100 típusú mosószert tartalmazó polisztirolcsőbe vittük át (két párhuzamos mintát alkalmazva).

A mosószert tartalmazó alikvot mintát 1 ml PBS/0,1 tömeg% Triton pufferrel (pH=7,0) hígítottuk. A hígított minta (0,025 ml térfogatú) azonos részleteihez további 0,125 ml PBS/0,1 tömeg% Triton puffert adtunk. A kolorimetriás reakciót azáltal indítjuk meg, hogy o-fenilén-diamin-dihidroklorid (OPD) 50 mmol/l (8,0 pH-jú) Tris puffer/0,1 tömeg% Tritonban készített 0,9 mg/ml koncentrációjú oldatának 0,300 ml-ét és 1 µl/ml hidrogén-peroxidot adagolunk. 5 perc időtartamú inkubáció után 0,250 ml 4 mol/l koncentrációjú kén-savoldat hozzáadásával a reakciót megszüntetjük. Az elegy O.D.-értékét 490 nm hullámhosszon mértük, ennek során a háttér (üres cső) O.D.-értékét levontuk.

Minden egyes állat esetén két O.D. leolvasásból alapítottuk meg az átlagértéket. Az állatok hatos csoportjain belül meghatároztuk O.D. átlagértékét, valamint a szórást. Az antigén hatására bekövetkező sajátos EPO válaszadást a következő módon számítjuk:

1000×[átlagos O.D. (érzékenyített, antigén behatású) – átlagos O.D. (nem érzékenyített, antigén behatású)]

A sajátos EPO válasz %-ban kifejezett gátlása a hatóanyaggal történő előkezelés következtében a következő módon számítható:

[átlagos O.D. (érzékenyített, hatóanyaggal kezelt, antigén behatású) – átlagos O.D. (nem érzékenyített, antigén behatású)]

× 100%

[átlagos O.D. (érzékenyített, antigén behatású) – átlagos O.D. (nem érzékenyített, antigén behatású)]

Ebben a vizsgálatban a racém 5-(3-[exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-on ED₅₀-értéke 10 mg/kg adódott.

3. példa

Bőrödéma gátlása ovalbumin iránt érzékenyített tengerimalacokban

Négy (Hartley-típusú, 350–400 g testtömegű, hím) tengerimalacot anti-ovalbumin IgG1 antitesttel érzékenyítettünk. Két tengerimalacnak orálisan 32 mg/kg vizsgált vegyületet adtunk be, két további tengerimalacnak pedig hordozóanyagot (2 tömeg% Tween-80) adtunk be. A beadást követő 1 óra múlva mindegyik tengerimalacnak 1 ml Evan Blue készítményt (7 mg/ml) adtunk be intravénásan, majd bőrét intradermálisan 0,1 ml (0,1 tömeg%-os) ovalbumin vagy PBS hatásának tettük ki. A behatást követő 20 perc múlva a bőrt eltávolítottuk, és vizuálisan megvizsgáltuk a bőr ödémás helyeit (kör alakú kék foltok a behatás helyein).

Az ovalbumin behatása ödémaképződést okozott a bőr ovalbumin hatásának kitett helyein, míg a PBS hatása kevés bőrödémát okozott. A hordozóanyagot kapott állatok ödémájához viszonyítva az antigén behatású kék foltoknak mind az intenzitása, mind a területe jelentősen

csökkent azon két tengerimalac esetén, amelyeknek racém 5-(3-[exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-ont adtunk be.

Ez az eredmény szemlélteti, hogy a vegyület hatásos tengerimalacokban antigén által kiváltott bőrödéma ellen.

4. példa

(+)-(2R)- és (-)-(2S)-endo-Norborneol [(2R)- és (2S)-endo-Biciklo[2.2.1]heptan-2-ol]

5,0 g (44,6 mmol) DL-endo-norborneolt és 5,1 g (23,2 mmol) triklór-etil-butirátot 40 ml dietil-éterben feloldottunk. Az elegyhez (4 g) 4 A molekulaszűrőt adtunk, majd szobahőmérsékleten kevertük. Sertésbőr szármaszó (Sigma, II típusú, nyers) pankreatin lipázt adagoltunk rendre 0,5 g; 1,0 g; 1,0 g; 1,0 g és 0,5 g mennyiségben 0, 20, 43, 50 és 67 óra időpontban. A reakciót ¹H-NMR útján követtük, és 50%-os konverzióval (92 óra) a reakcióelegyet diatómaföldön keresztül szűrtük és vákuumban melegítés nélkül bepároltuk. (Az alkohol könnyen elpárolog.) A nyers maradékot szilikagélén elárasztásos kromatográfiás eljárásnak vetettük alá 2–25 térfogat% dietil-éter/hexán gradiens eluálószerrendszert alkalmazva, ennek során tiszta olajként 2,9 g

(15,9 mmol) (2R)-endo-norbornil-butirátot és fehér szilárd anyagként 1,8 g (16,0 mmol) (2S)-endo-norborneolt kaptunk; $[\alpha]_D = -2,03^\circ$; e.e. 87,2% (az (S)- α -metoxi- α -(trifluor-metil)-fenil-ecetsav (MTPA) észter származék ^1H -NMR-vizsgálata alapján). Minthogy a

fajlagos rotáció olyan csekély értékű, az NMR-vizsgálatok alapján meghatározott e.e. értékek az optikai tisztaság sokkal megbízhatóbb mértékét jelentik.

A kinyert 2,3 g (12,6 mmol) endo-norbornil-butirátot, továbbá 2,5 g (18,0 mmol) kálium-karbonátot és 65 ml metanolt szobahőmérsékleten 64 órán keresztül kevertük, mielőtt dietil-éter és víz elegyével extraháltuk. A szerves réteget vízzel és sóoldattal mostuk, vízmentes nátrium-szulfát felett szárítottuk, szűrtük, majd vákuumban betöményítettük, ennek során 1,3 g (11,6 mmol) (2R)-endo-norborneolt kaptunk (kitermelés: 91,9%); $[\alpha]_D = +2,7^\circ$; e.e. 87,6% (MTPA-észter ^1H -NMR-vizsgálata alapján).

Ezeket az eljárási lépéseket megismételtük észtercserével, ami csak 44%-os konverziót eredményezett, ennek során 90%-ot meghaladó kitermeléssel kaptunk alacsonyabb optikai tisztaságú (2S)-endo-norborneolt; $[\alpha]_D = -0,88$; e.e. 71,4% (a fentiek szerinti ^1H -NMR vizsgálatok alapján); továbbá 56,4%-os kitermeléssel nagyobb optikai tisztaságú (2R)-endo-norborneolt; e.e. nagyobb, mint 95% (a fenti ^1H -NMR-vizsgálatok alapján).

5. példa

3-[(2S)-exo-Biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxibenzaldehid

28,5 g (27,7 ml, 0,141 mol) dietil-azodikarboxilátot és 36,9 g (0,141 mol) trifenil-foszfint feloldottunk 200 ml tetrahidrofuranban. Ehhez az oldathoz 7,9 g (0,0705 mol) (+)-(2R)-endo-norborneol 100 ml tetrahidrofuranban készített oldatát adtuk, majd 100 ml tetrahidrofuranban lévő 21,4 g (0,141 mol) 3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehidet (izovanillint). A kapott elegyet 2 napon keresztül reflux hőmérsékleten tartottuk, majd lehűtöttük, 1,5 l dietil-éterrel hígítottuk, az elegy térfogata felének megfelelő térfogatú vízzel (két alkalommal), 0,5 mol/l nátrium-hidroxid-oldattal (két alkalommal), majd vízzel és sóoldattal a fenti sorrendben mostuk; vízmentes nátrium-szulfát felett szárítottuk, sztrippeltük, és a maradékot szilikagélen kromatografáltuk 0–10 térfogat% etil-acetát-gradiens mellett, ennek során 8,5 g cím szerinti terméket kaptunk (kitermelés: 49%), $[\alpha]_D = +24,5^\circ$ (deutero-kloroform).

Ugyanezen eljárással (–)-(2S)-endo-norborneolt 3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxibenzaldehyddé alakítottunk, amely fizikai tulajdonságait tekintve – a forgatás előjelét kivéve – azonos.

6. példa

3-(3-[(2S)-exo-Biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-metoxifenil)-pentán-dinitril

Az előző példa cím szerinti termékének 8,5 g-ját (0,0346 mol) 250 ml piridinben oldottuk. 14,6 g (0,171 mol) ciano-ecetsavat és 5 ml piperidint adtunk az oldathoz, majd az elegyet szobahőmérsékleten 4 órán keresztül, majd 60 °C-on 2 órán keresztül, végül 100 °C-on

24 órán keresztül kevertük. Az oldószert vákuumban végzett sztrippeléssel eltávolítottuk, és a maradékot 250 ml etil-acetátban felvettük, telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd vízzel mostuk, ezt követően ismét sztrippelést végeztünk. Izopropil-alkohol/izopropil-éter elegyből kristályosítva 5,84 g cím szerinti terméket kaptunk (kitermelés: 54%); olvadáspont: 121–123 °C; $[\alpha]_D = +17,8^\circ$ (deutero-kloroform).

Ugyanezen eljárást alkalmazva az előző példa enantiomer termékét 3-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-pentán-dinitrillé alakítottuk, amelynek fizikai tulajdonságai – a rotáció előjelét kivéve – azonosak.

7. példa

3-(3-[(2S)-exo-Biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-glutáramid

Az előző példa 5,82 g (0,0188 mol) cím szerinti, 150 ml térfogatú 2:1 térfogatarányú aceton:víz elegyben lévő termékéhez 5 ml 10 tömeg%-os nátrium-karbonát-oldatot, majd cseppenként 8 ml (0,094 mol) 30%-os hidrogén-peroxidot adtunk. Ennek során a hőmérsékletet 0–5 °C között tartottuk. Miután az elegyet 16 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertük, 300 ml víz és 500 ml etil-acetát elegyébe öntöttük, majd az elegyet 1 órán keresztül keverve az összes szilárd anyagot feloldottuk. A szerves réteget elválasztottuk, vízzel és sóoldattal mostuk, majd szárítottuk és kristályos maradékká sztrippeltük, amit szilikagélen elárasztásos kromatográfiás módszerrel, 15:1 térfogatarányú CH_2Cl_2 : CH_3OH eluálószerrel kezelve 3,7 g cím szerinti terméket kaptunk; olvadáspont: 198,5–199,5 °C; IR (KBr) 3335, 3177, 2952, 1674, 1631, 1516, 1406, 1256, 1142, 1003, 809, 685, 641 cm^{-1} .

Ugyanezen módszerrel az előző példa enantiomer termékét 3-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-glutáramiddá alakítottuk, amelynek fizikai tulajdonságai – a rotáció előjelének kivételével – azonosak.

8. példa

5-(3-[(2S)-exo-Biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-on

Az előző példa cím szerinti termékének 3,7 g-ját (0,0107 mol) 250 ml piridinben feloldottuk, majd 25 ml piridinben lévő 10,92 g (0,0246 mol) ólom-tetraacetátot adtunk hozzá. 30 óra időtartamú keverés után a reakcióelegyet vákuumban sztrippeltük, és az olajos maradékot 100 ml CH_2Cl_2 -ban felvettük, vízzel és sóoldattal mostuk, majd vízmentes nátrium-szulfát felett szárítottuk, sztrippeltük, végül a kapott szilárd anyagot dietil-éterrel eldörzsölve fehér, szilárd anyagként 1,21 g cím szerinti terméket kaptunk; olvadáspont: 202–203 °C; $[\alpha]_D = +14,45^\circ$ (deutero-kloroform).

Ugyanezen eljárással az előző példa enantiomer termékét 5-(3-[(2R)-exo-biciklo[2.2.1]hept-2-il-oxi]-4-metoxi-fenil)-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-(1H)-onná alakítottuk, amelynek fizikai tulajdonságai – a rotáció előjelének kivételével – azonosak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (I) és/vagy (II) abszolút sztereokémiai képletű, optikailag aktív vegyület.

2. Az 1. igénypont szerinti, (I) képletű vegyület.

3. Az 1. igénypont szerinti, (II) képletű vegyület.

4. (V) és/vagy (VI) általános, abszolút sztereokémiai képletű, optikailag aktív vegyület, ahol a képletben

Y jelentése –CN vagy –CONH₂ képletű csoport.

5. A 4. igénypont szerinti vegyület, amelynek képletében Y jelentése –CN képletű csoport.

6. A 4. igénypont szerinti vegyület, amelynek képletében Y jelentése –CONH₂ képletű csoport.

