

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 932013 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **932013**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C07C215/28
C07C213/00
A61K 31/135**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **04.05.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.05.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **06.11.1993**

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

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

05.05.1992 FR 9205519

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Institut de Recherche Jouveinal (I.R.J.), 3-9, rue de la Loge, B.P. 100, 94265 Fresnes Cedex, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Aubard, Gilbert, France, RANSKA, (FR)

2 •Bure, Jacques, France, RANSKA, (FR)

3 •Calvet, Alain, France, RANSKA, (FR)

4 •Gouret, Claude-Jean, France, RANSKA, (FR)

5 •Grouhel, Agnes, France, RANSKA, (FR)

6 •Junien, Jean-Louis, Sevres, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

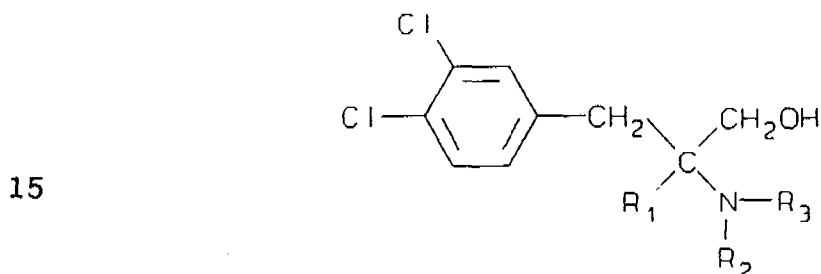
Uudet (S)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolista johdetut enantiomeerit

Nya enantiomerer härledda från (S)-2-amino-2-(3,4-diklorbensyl)-1-propanol

Uudet (S)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolista johdetut enantiomeerit

5 Käsillä oleva keksintö kohdistuu uusiin yhdisteisiin, jotka on johdettu (S)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolista, menetelmään niiden valmistamiseksi sekä niiden terapeuttiseen käyttöön.

10 EP-patenttijulkaisussa, joka on julkaistu numerolla 237 366, kuvataan seuraavan kaavan mukaisia aminoalkoholeja



joissa

R₁ on alempi alkyylili,

20 R₂ on H tai alempi alkyylili,

R₃ on H, alempi alkyylili, alempi alkenyyli, fenyyli(alempi alkyylili) tai alempi sykloalkyylialkyyli, jonka renkaassa on 3 - 6 hiiliatomia, tai R₂ ja R₃ yhdessä typpiatomin kanssa, johon ne ovat liittyneet, muodostavat tyydyttyneen viisi - seitsenjäsenen heterosyklin, joka voi sisältää toisena heteroatomina, joka ei ole liittynyt suoraan typpiin, hapen, rikin tai typen, jolloin on mahdollista, että tässä jälkimmäisessä typpiheteroatomissa on C₁₋₄-alkyyli-

25

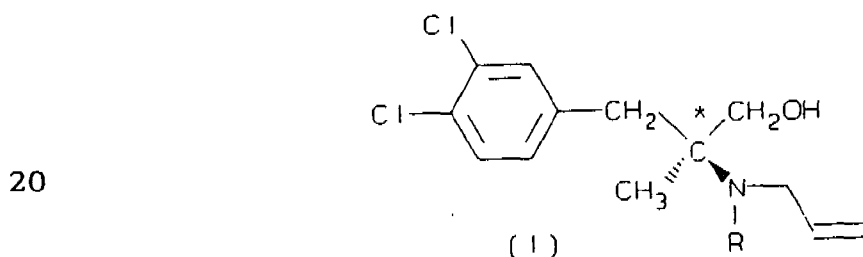
30 substituentti, näiden aminoalkoholien raseemisesti tai optisesti aktiivisia muotoja sekä niiden additiosuoloja happojen kanssa.

Käsillä olevan keksinnön mukaiset tuotteet osoittavat sekä psykotrooppisia että analgeettisia ominaisuuksia, jotka ovat erityisen sopivia hoidettaessa psykopatologisia

ja neuropatologisia häiriöitä, samoin kuin kivuliaita poikkeavuuksien etiologioiden syndroomia.

Itse asiassa nyt on havaittu, että EP-patenttijulkaisussa 237 366 yleisen kaavan kattamien tiettyjen yhdisteiden sarjassa (S)-konfiguraation omaavilla enantiomeereilla, jotka ovat uusia, koska niitä ei syntetisoitu edellä mainitussa patentissa, on odottamattomia antihistaminisia ja antiallergisistä ominaisuuksia, jotka ovat erityisen sopivia hoidettaessa symptomatologioita, joita aiheuttavat useat allergeenit ja erityisesti välittyvät histamiinin vapautumisella.

Käsillä oleva keksintö kohdistuu, uusien tuotteiden kautta, (S)-konfiguraation omaaviin enantiomeereihin, säännön mukaan, jonka ovat luoneet Cahn-Ingold-Prelog, jotka vastaavat kaavaa I



jossa R on vety tai metyyli- tai radikaali, niiden additiosuoloihin myrkyttömien orgaanisten tai epäorgaanisten happojen kanssa, niiden käyttöön antiallergeina ja erityisesti antihistamiinisina lääkkeellisinä tuotteina.

Additiosuoloja saadaan sellaisten terapeuttisesti hyväksyttävien happojen kanssa, joista voidaan mainita esimerkiksi etikkahappo, bentseenisulfonihappo, kamferisulfonihappo, sitruunahappo, etaanisulfonihappo, fumaarihappo, hydrobromihappo, suolahappo, maitohappo, maleiinihappo, malonihappo, metaanisulfonihappo, typpihappo, palmitiinihappo, fosforihappo, salisyylihappo, steariinihappo, meripihkahappo, rikkihappo ja viinihappo.

Suolojen valmistus suoritetaan alan ammattimiehen sinänsä tuntemilla menetelmillä, kuten tuotteen (I) emäksen additioreaktiona jonkun sopivan hapon kanssa liuoksessa vesiliukoisessa liuottimessa, kuten etanolissa tai asetonissa, tai veteen liukenemattomassa liuottimessa, kuten kloroformissa tai dikloorimetaanissa, ja sitten muodostunut suola erotetaan konsentroimalla ja/tai jäähdyttämällä reaktioväliaine, tai vaihtoehtoisesti saostamalla suola sellaisen liuottimen avulla, johon se ei liukene, kuten esimerkiksi dietyylieetterissä.

Käsillä oleva keksintö kohdistuu myös käsillä olevan keksinnön mukaisten yhdisteiden (I) valmistusmenetelmään, joka käsittää joko niitä vastaavien, EP-patenttijulkaisussa 237 366 kuvattujen rasemaattien liuottamisen tai (S)-konfiguraation omaavien prekursorienantiomeerien kemiallisen synteessin suorittamisen.

Prosessi, jossa käytetään raseemisten yhdisteiden liuottamista, käsittää optisesti aktiivisen hapon käytön, jolloin saadaan käsiteltävän raseemisen yhdisteen kanssa joko kaksi diastereoisomeeristä additiosuolaa tai kaksi optisesti aktiivista esteriä, jotka erotetaan, ja joista (S)-konfiguraation omaava enantiomeeri on käsillä olevan keksinnön kohde ja jota kutsutaan tekstissä myös termillä "eutomeeri" ja lisäksi (R) konfiguraation omaava antipodi, jota pidetään inaktiivisena ja jota tekstissä kutsutaan termillä "distomeeri", tuotetaan sopivalla käsittelyllä. On mahdollista myös käyttää raseemisen yhdisteen suoraa liuotusmenetelmää korkeatehonestekromatografialla (HPLC). Spesifisemmin nämä valmisteet sisältävät seuraavaa:

a) diastereoisomeeristen suolojen avulla suoritettussa liuottamisprosessissa annetaan raseemisen yhdisteen, joka sisältää seosta, jossa on yhtä suuret osat eutomeeriä ja distomeeriä, reagoida sopivassa liuottimessa optisesti aktiivisen hapon kanssa, jolloin muodostuu kaksi diastereoisomeeristä suolaa, jotka erotetaan niiden käytetyssä

liuottimessa esiintyvän liukoisuuseron perusteella. Näissä olosuhteissa alhaisemman liukoisuuden omaava diastereoiso-meeri saostuu ja se erotetaan suodattamalla.

Saadut erotetut suolat voidaan kiteyttää uudelleen
 5 valituissa liuottimissa, jolloin saadaan tyydyttävä opti-
 nen puhtaus, tai niitä voidaan käsitellä muuten, yleensä
 emäksisessä väliaineessa, jolloin saadaan talteen uudel-
 leen vastaavat enantiomeeriset aminoalkoholit. Jälkimmäi-
 set voidaan sitten puhdistaa uudelleenkiteytyksellä tai ne
 10 voidaan vaihtoehtoisesti laittaa toiseen puhdistusvaihee-
 seen diastereoisomeeristen suolojen tuoreella muodostumi-
 sella, joka suoritetaan valinnaisesti optisesti aktiivi-
 sella hapolla, joka on joku muu kuin aiemmin käytetty.

Yleisesti käytettyjä happojen enantiomeerejä käsil-
 15 lä olevan keksinnön mukaisen prosessin mukaisten diastere-
 oisomeeristen suolojen valmistuksessa ovat, keksintöä ra-
 joittamatta, α -fenyyli glysiinin, α -fenyylialaniinin ja
 niiden N-karboksyloitujen johdannaisten, maleiinihapon,
 mantelihapon, viinihapon ja niiden esteröintijohdannaisten
 20 happojen kanssa, tai vaihtoehtoisesti kamfaanihapon, 3-
 bromi-8-kamferisulfonihapon ja sen paikkasidonnaisten iso-
 meerien sekä α -metoksi- α -trifluorimetyylifenyylietikkaha-
 pon enantiomeerit.

Näiden happojen enantiomeerit ovat kaupallisesti
 25 saatavilla ja niiden käyttö, jossa ne tehdään sopiviksi
 käytettäviksi rasemaattien, kaavan (I) mukaisten eutomee-
 rien resoluutiossa, ja sitten diastereoisomeeristen suolo-
 jen erottaminen, tai diastereoisomeerien valmistusta var-
 ten aiemmin rikastetun tuotteen puhdistamiseksi suhteessa
 30 eutomeeriin (I), joka on käsillä olevan keksinnön kohde,
 on alan ammattimiehelle sinänsä tunnettua.

Diastereoisomeeristen suolojen valmistuksessa anne-
 taan erotettavan tai puhdistettavan aminoalkoholimoolia
 kohden reagoida 0,25 - 2,00 moolia hapon enantiomeerin
 35 kanssa liuoksessa liuottimessa tai liuotinten seoksessa,

jotka ovat edullisesti kokonaan tai osittain vesiliukoisia ja jotka yleensä on valittu alkoholeista, ketoneista, alhaisen molekyyllipainon omaavista eettereistä tai joka vaihtoehtoisesti on asetonitriili.

5 Edullisesti reaktio suoritetaan liuoksessa etanolissa, metanolissa tai asetonissa antamalla 0,5 - 1,25 moolia hapon enantiomeeriä reagoida käsiteltävän tuotteen happomoolia kohden lämpötilavälillä 20 °C - käytetyn liuottimen kiehumispiste, joka on yleensä edullinen. Suolan
10 muodostus on täydellinen aikavälillä 5 minuuttia - 3 tuntia. Tämän jälkeen reaktioseos jätetään ensin huoneenlämpöön ja sitten, mikäli tarpeenmukaista, noin 0 °C:een vähemmän liukoisen diastereoisomeerin kiteyttämiseksi, jota voidaan edistää laittamalla seokseen muutama kide odotet-
15 tua suolaa, mikäli sitä on jo valmistettu. Kun kiteytyminen on mennyt loppuun tai vaiheessa, jota pidetään tarkoituksenmukaisena halutun optisen puhtauden saavuttamisen suhteen, kiteytynyt diastereoisomeeri erotetaan suodattamalla. Kahta faasia, jotka kumpikin sisältävät enemmän tai
20 vähemmän puhdistettua diastereoisomeeriä, käsitellään erikseen joko diastereoisomeerin puhdistamiseksi tai enantiomeerisen aminoalkoholin vapauttamiseksi suolastaan, ja tämä suoritetaan emäskäsittelyllä vesipitoisessa väliaineessa, jota seuraa vapautuneen enantiomeerin suodattami-
25 nen tai vaihtoehtoisesti uuttaminen veteen sekoittumattoman orgaanisen liuottimen kanssa.

b) Vaihtoehtoisesti raseemisen yhdisteen tai eutomeeriä (I) sisältävän seoksen resoluutio käsittää esteröinnin optisesti aktiivisen karboksyylihapon kanssa diastereoisomeeristen estereiden seoksen saamiseksi, jotka
30 esterit erotetaan ja sitten saippuoidaan, jotta saadaan erilliset aminoalkoholin enantiomeerit, käsittäen eutomeerin (I), ja vastaava distomeerinen antipodi.

Tämän prosessin mukaisesti raseeminen tai osittain
35 rikastettu yhdiste laitetaan esteröintireaktioon optisesti

puhtaan karboksyylihapon tai yhden sen johdannaisen, kuten halidin, anhydridin tai esterin kanssa. Esimerkiksi α -metoksi- α -trifluorimetyylifenyylietikkahapon ja niiden johdannaisten (+) ja (-) enantiomeerejä käytetään. Reaktio

5 suoritetaan inertissä liuottimessa, joka voi olla tolueeni, tetrahydrofuraani tai vaihtoehtoisesti dikloorimetaani tai kloroformi, ja valinnaisesti orgaanisen tai epäorgaanisen hapon ollessa läsnä, jonka tehtävä on katalysoida reaktiota, kun käytettävä optisesti aktiivinen happojohdanna-

10 dannainen on esteri, tai vaihtoehtoisesti neutraloida reaktiossa muodostuneet happoiset sivutuotteet. Katalyyttejä ovat edullisesti natrium ja sen alkoholaatit, kuten natriummetylaatti, joka on edullinen, tai vaihtoehtoisesti metallialkoholaatti, kuten alumiinin alkoholaatit. Neutra-

15 loinnissa käytetyt emäkset voivat olla epäorgaanisia, kuten alkalimetalli- tai alkalimaametallihydroksidit tai näiden metallien suolat, joista natriumkarbonaatti on edullinen, tai vaihtoehtoisesti orgaanisia, esimerkiksi amiinit, kuten trialkyyliamiinit, N,N-dialkyylianiliinit tai aromaattiset amiinit. Näiden amiinien joukosta tri-

20 etyyliamiini ja pyridiini ovat edullisia.

Reaktion jälkeen saadut diastereoisomeerit erotetaan ja puhdistetaan alan ammattimiehen sinänsä tuntemilla menetelmillä, kuten fraktiokiteytyksellä tai kromatografisella erotusmenetelmällä, ja sitten ne hydrolysoidaan vah-

25 van emäksellä, kuten alkalimetallihydroksidillä, ja tavallisesti vesipitoisessa alkoholisessa väliaineessa, jolloin saadaan erotettuja ja puhdistettuja aminoalkoholien enantiomeerejä ja erityisemmin käsillä olevan keksinnön mu-

30 kaista kaavan (I) mukaista (S)-konfiguraation omaavaa eutomeeriä.

c) raseemisen yhdisteen resoluutio tai rikastetun seoksen puhdistus eutomeerin (I) suhteen korkeatehoneste-

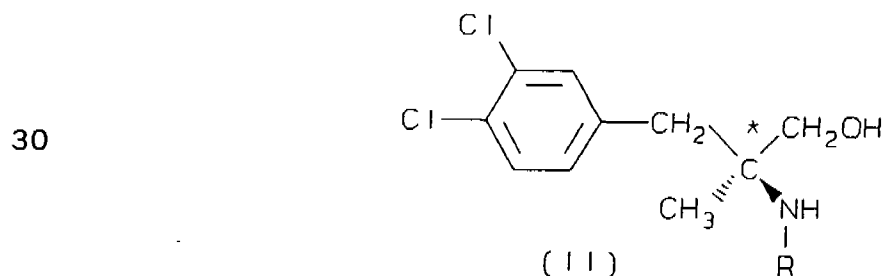
35 kromatografisesti suoritetaan erottamalla enantiomeerit kolonnissa, joka sisältää stationaarifaasina happoglyko-

proteiinin, joka on α_1 -AGP, joka on immobilisoitu huokoiselle silikatäytteelle, ja jonka pallojen keskimääräinen halkaisija on 5 μm - CHIRAL-AGP^R kolonnit - (yhtiöstä Chrom Tech).

5 Selektiivisessä eluutiossa käytetty liikkuva faasi on seos, jossa on pH 6 puskuriliuosta (0,01 M KH_2PO_4 liuosta, jonka pH on säädetty arvoon 6 liuoksella N KOH) ja vesiliukoista polaarista liuotinta, joka on valittu a - 3 hiiliatomia sisältävistä alifaattisista alkoholeista tai
10 asetonitriilistä. Jälkimmäinen liuotin ja isopropanoli ovat edullisia; ne sekoitetaan puskuriliuoksen kanssa suhteessa 0,1 - 25 % (v/v) enantiomeerien eluomiseksi stationaarifaasista. Eluointi suoritetaan olosuhteissa, jotka ovat sopivat isomeerien hyvää erottamista ajatellen, ni-
15 mittäin lämpötilavälillä 10 - 40 °C ja virtausnopeudella, joka on yhteensopiva käytetyn materiaalin resistenssin kanssa, mutta joka voi saavuttaa pisteen, jossa paine on 10⁷ Pa.

 Kuitenkin edulliset menetelmät (S)-konfiguraation
20 (I) omaavien enantiomeerien valmistamiseksi ovat ne, joissa käytetään (S)-konfiguraation omaavia prekursorienantio-meerejä tutkijoiden Cahn-Ingold-Prelog luoman säännön mukaisesti.

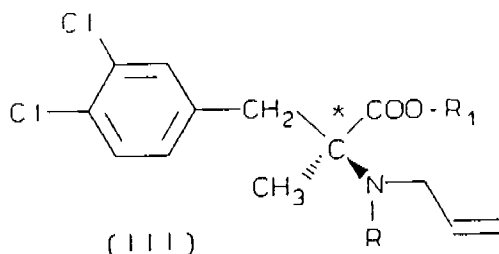
 Edullisessa prosessissa annetaan allyylihalididin
25 reagoida seuraavan kaavan mukaisen (S)-konfiguraation omaavan prekursoriaminoalkoholin kanssa



 Vaihtoehtoisessa prosessissa pelkistetään boorista
35 ja alumiinista johdetulla kompleksihydridillä seuraavan

kaavan mukaisen (S)-konfiguraation omaavan prekursoriami-
noesterin karbonyylifunktio

5

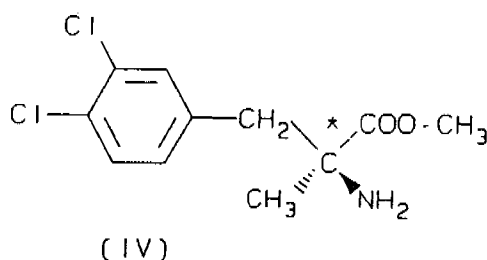


10

jossa R on vety tai metyyli ja R₁ on vety tai alempi alkyy-
liradikaali, kuten metyyli tai etyyli.

Käsillä olevan keksinnön mukaisten yhdisteiden (S)-
konfiguraatiota ja prekursoreita (II) ja (III) koskien
tämä osoitettiin analogialla prekursoriin, joka on yleinen
niille, kaavan (IV) mukainen metyyli (S)-(-)-3-(3,4-di-
kloorifenyyli)-2-metyylialaninaatti,

20



jonka enantioselektiivinen synteesi suoritettiin U. Schöl-
lkopfin kuvaamalla menetelmällä (Synthesis, s. 969, 1981)
ja jossa alkyloidaan (2R,5SR)-(-)-2,5-dihydro-3,6-dimetok-
si-2-isopropyyli-5-metyylipyratsiini (Merckin tuote, viite
818314) 3,4-diklooribentsyylikloridin kanssa, ja sitten
suoritetaan (2R,5S)-5-(3,4-diklooribentsyyli)-2,5-dihydro-
3,6-dimetoksi-2-isopropyyli-5-metyylipyratsiinin happohyd-
rolyysi, jolloin saadaan kaavan (IV) mukaista metyylieste-
riä, joka N-alkylaatiolla allyylihalidin kanssa tuottaa
prekursorin (III), jossa R on vety, tai joka pelkistyksel-
lä organometallisen hydridin kanssa tuottaa prekursorin

(II), jossa R on vety tai metyyli, eutomeerin (I) saamiseksi.

Erityisen edullinen menetelmä käsillä olevan keksinnön mukaisten yhdisteiden (I) valmistamiseksi käsittää:

- 5 - annetaan allyylihalidin reagoida aminoalkoholin (II) kanssa, jossa R on vety, käsillä olevan keksinnön mukaisen eutomeerin (I), jossa R on vety, valmistamiseksi,
 - ja sitten suoritetaan tämän eutomeerin (I) metylointi formaldehydillä ja muurahaishapolla, jolloin saadaan käsillä olevan keksinnön mukainen eutomeeri (I), jossa R on metyyli-
10 radikaali.

Tämän prosessin toteutus käsittää:

- annetaan (S)-(-)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolin, joka on kuvattu EP-patenttijulkaisun
15 237 366 esimerkissä 1C, reagoida allyylihalidin, kuten kloridin tai jodidin, tai edullisesti allyylibromidin kanssa inertissä liuottimessa, kuten tolueenissa tai asetonitriilissä. Valinnaisesti reaktioalustaan lisätään emäksistä ainetta, epäorgaanista, kuten natriumkarbonaattia, tai orgaanista, kuten trietyyliamiinia, reaktion
20 edistämiseksi. Käytännössä käytetään 0,5 - 1,5 moolia allyylihalidia käytettyä aminoalkoholimoolia kohden, ja reaktio suoritetaan liuoksessa, jossa on 2 - 3 litraa valittua liuotinta. Liuottimesta ja käytetystä halidista riipuen saadaan tyydyttävä tulos reaktioajanjakson 1 - 24
25 tunnin kuluttua lämpötilaolosuhteissa 20 - 110 °C. Edulliset olosuhteet käyttäen allyylibromidia ovat 2 - 5 tuntia reaktiolämpötilassa 40 - 100 °C ja saatu aminoalkoholi (I) eristetään ja puhdistetaan tunnetuilla menetelmillä, erityisesti fraktiokiteytyksellä, ja sitten tämän saadun yhdisteen (I) N-metylointi suoritetaan, kuten edellä on kuvattu.

- Tähän loppuun suoritetaan pelkistävä metylointireaktio formaldehydin vesiliuoksella ja muurahaishapolla
35 Eschweiler-Clarke prosessin mukaisesti.

N-metyloitavaa aminoalkoholimoolia (I) kohden käytetään sellainen määrä vesipitoista liuosta, joka vastaa 1,2 - 3,5 moolia puhdasta formaldehydiä, ja 2 - 5 moolia puhdasta muurahaishappoa.

5 Käytännössä formaldehydi lisätään ensin tuotteeseen ja sitten eksotermisen reaktion jälkeen suoritetaan muurahaishapon lisäys ja pelkistysreaktio suoritetaan lämmittämällä seosta 1 - 2 tuntia lämpötilassa 90 - 100 °C.

10 Käsittelyjen jälkeen eutomeeri (I), jossa R on metyyli, puhdistetaan tavanomaisilla, erityisesti kromatografisilla menetelmillä.

Koskien (S)-(-)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolin valmistusta on FR-patenttijulkaisun numero 2 378 746 esimerkissä 2-d kuvattu vasemmalle kiertävän 1-3-(3,4-dikloorifenyyli)-2-metyylialaniinin viisivaiheista synteesiä metyyli 2-isosyanopropionaatista ja 3,4-diklooribentsyylibromidista, ja lisäksi EP-patenttijulkaisun numero 237 366 esimerkissä 1-C, jossa kuvataan tämän hapon pelkistystä boraanidimetyylisulfidikompleksilla.

20 Edullisesti, verrattuna edellä mainittuun valmistukseen, joka sisältää kaiken kaikkiaan kuusi vaihetta, käsillä olevan keksinnön mukainen edullinen prosessi, joka on nopeampi ja taloudellisempi, mahdollistaa (S)-(-)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolin valmistuksen
25 neljässä synteesivaiheessa 3,4-dikloorifenyyliasetonista. Olennaisesti prosessissa annetaan ketonin reagoida Bucherer-Berg reaktiolla kaliumsyanidin ja ammoniumkarbonaatin kanssa, jolloin saadaan (+/-)-5-(3,4-diklooribentsyyli)-5-metyylihydantoiinia, joka laitetaan emäksiseen vesipitoi-
30 seen asetoniväliaineeseen stereospesifiseen suolan muodostukseen (R)-(+)- α -metyyllibentsyyliamiinin kanssa, jotta saadaan sen additiosuola hydantoiinin (S)-(-)-enantiomeerin kanssa, joka liukenemattomana suodatetaan pois, ja josta saadaan (S)-(-)-5-(3,4-diklooribentsyyli)-5-metyyli-

hydantoiinia, jonka optinen puhtausaste on suurempi kuin 98 % käsittelyllä happoliuoksella.

Tämän hydantoiinin (S)-enantiomeeri hydrolysoidaan tavanomaisella tavalla emäksisessä vesipitoisessa väliaineessa, jolloin saadaan (S)-(-)-2-(3,4-diklooribentsyyli)-alaniinia, joka pelkistetään, kuten EP-patenttijulkaisun 237 366 esimerkissä 1 on kuvattu, boraani-dimetyylisulfi-dikompleksilla (S)-(-)-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolin saamiseksi.

Näitä edullisia valmistusprosesseja kuvataan jäljempänä esitetyissä valmistusosassa ja esimerkeissä.

Valmistus: (S)-(-)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli [(II); R = H]

Vaihe 1

(+/-)-5-(3,4-diklooribentsyyli)-5-metyylihydantoiini

Reaktoriin laitetaan 160,0 g (0,79 mol) 3,4-dikloorifenyyliasetonia 700 ml:ssa etanolia ja seos lämmitetään 40 °C:een liukenemisen saavuttamiseksi. Sitten siihen lisätään 53,0 g (0,81 mol) kaliumsyanidia, 149,0 g ammoniumseskvikarbonaattia ja 700 ml vettä.

Seosta lämmitetään samalla sekoittaen lämpötilavälillä 65 - 70 °C 15 tuntia. Suspensio jäädytetään samalla sekoittaen 10 - 15 °C:een ja sitä pidetään tässä lämpötilassa 16 tuntia. Liukenematon aines suodatetaan pois ja pestään vedellä ja sitten di-isopropyylieetterillä ennen kuivaamista tyhjössä 50 °C:ssa vakiopainoon.

Saadun tuotteen paino oli 155,0 g, saanto 72 % ja sp. 240 °C.

Vaihe 2

(S)-(-)-5-(3,4-diklooribentsyyli)-5-metyylihydantoiini

100 ml demineralisoitua vettä sekoitetaan 150 ml asetonin kanssa reaktorissa, joka on laitettu refluksiase-

maan, ja sitten siihen lisätään 3,7 g (0,091 mol) natriumhydroksidipellettejä.

Sitten siihen lisätään peräkkäin 50,0 g (0,183 mol) edellisessä vaiheessa saatua raseemista hydantoiinia ja
5 22,2 g (0,183 mol) (R)-(+)- α -metyyli-bentsyyliamiinia.

Seosta pidetään refluksissa samalla sekoittaen, kunnes reagoivat aineet ovat liuenneet. Sitten siihen lisätään 100 ml vettä samalla, kun seos lämmitetään asteittain 70°C:een ja sen jälkeen liuoksen annetaan jäähtyä
10 samalla sekoittaen.

Kiteytymistä aletaan nähdä noin 60 °C:ssa ja sitten seosta pidetään 50 °C:ssa 1 tunti 30 minuuttia kiteytymisen lopettamiseksi ja sen jälkeen se jäähdytetään noin 20 °C:een 30 minuutiksi.

15 Kiteinen sakka suodatetaan pois ja pestään kaksi kertaa 100 millilitralla 2:1 (v/v) asetoni/vesiseoksella.

Liukenematon aines suspentoidaan ilman lisäkasittelystä 250 millilitraan vettä ja seos tehdään happamaksi pH-arvoon 1 lisäämällä asteittain konsentroitua suolahappoliuosta ($d = 1,18$).
20

Liukenematon aines suodatetaan pois ja pestään vedellä. Tuotteen optinen puhtaus, joka määritettiin HPLC:lla, on 98,6 %.

Märkä tuote kiteytetään uudelleen refluksissa 200
25 millilitrassa 1:1 (v/v) vesi/asetoniseosta.

Sen jälkeen, kun se on ollut 15 °C:ssa kaksi tuntia, suodatetaan liukenematon aines pois, pestään asetoni/vesiseoksella ja sitten kuivataan tyhjössä 50 °C:ssa.

18,79 g S-(-)-5-(3,4-diklooribentsyyli)-5-metyylihydantoiinia saadaan.
30

Saadun tuotteen saanto oli 75 %, optinen puhtaus 100 % (HPLC), $sp. 276\text{ °C}$ ja $[\alpha]_D^{20} = 28,4^\circ$ ($c = 1$, EtOH).

Vaihe 3

(S)-(-)-2-(3,4-diklooribentsyyli)alaniini

4,7 g (115 mmol) natriumhydroksidipellettejä liuotetaan 25 millilitraan vettä autoklaavissa. 7,0 g (25,6 mmol) edellä kuvatusa vaiheesta 2 saatua (S)-(-)-hydantoinia lisätään. Sen jälkeen, kun laite on suljettu kaasunpitävästi, seosta lämmitetään samalla sekoitaen 8 tuntia 140 - 145 °C:een paineessa 3 - 4 atm (3 - 4 baari).

Lämpötilaan 20 - 25 °C jäädyttämisen jälkeen saatu kastanjanruskea liuos tehdään happamaksi, samalla sekoittaen, konsentroidulla suolahappoliuoksella pH-arvoon 5,8 - 6,2. Lämpötilaan 10 °C jäädyttämisen jälkeen 30 minuutiksi liukenematon aines suodatetaan pois, pestään vedellä ja sitten tolueenilla ja kuivataan tyhjiössä 80 °C:ssa.

Saadun tuotteen paino oli 5,5 g, saanto 86 % ja $[\alpha]_D^{20} = -6,9^\circ$ (c = 1,5, CH₃OH).

Vaihe 4

(S)-(-)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli

62,5 ml tetrahydrofuraania (THF) ja sitten 2,48 g (10 mmol) (S)-(-)-2-(3,4-diklooribentsyyli)alaniinia laitetaan reaktoriin, joka on suojattu kosteudelta, typen ilmakehässä. Saatuun suspensioon lisätään 3,80 (50 mmol) boraanidimetyylisulfidikompleksia (BMS) tipoittain 30 minuutin aikana ja lämpötilassa 20 °C. Sekoitusta jatketaan 15 minuuttia huoneenlämmössä ja sitten seos lämmitetään refluksiin 4 tunniksi 30 minuutiksi. Lämpötilaan 5 °C jäädyttämisen jälkeen lisätään 7,5 ml metanolia asteittain siten, että lämpötila ei nouse 20 °C:een yläpuolelle, ja sitten identtisellä tavalla 7,5 ml N natriumhydroksidiliuosta. Saadun suspension annetaan seistä yön yli ja liukenematon aines suodatetaan pois ja poistetaan. Suodos, joka on haihdutettu tyhjiössä ja vesihauteessa, antaa valkoista jäännöstä, joka otetaan talteen 50 millilitralla

vettä. Seos tehdään happamaksi arvoon pH 1 lisäämällä konsentroitua suolahappoa ($d = 1,18$).

Saatua liuosta uutetaan kaksi kertaa 15 millilitralla eetteriä. Eetterifaasit heitetään pois ja happofaasi tehdään emäksiseksi kylmässä tilassa pH-arvoon 12 lisäämällä konsentroitua natriumhydroksidiliuosta ($d = 1,38$) ja sitten kyllästetään natriumkloridilla.

Alkalista seosta uutetaan 3 kertaa eetterillä (20 ml) ja yhdistetyt eetterifaasit pestään kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella ja sitten kuivataan.

Eetterin haihduttamisen jälkeen saadaan aminoalkoholia valkoisen ja amorfisen kiinteän jäännöksen muodossa. Tuotteen paino oli 2,10 g, s.p. $86\text{ }^{\circ}\text{C}$, saanto 90 %, $[\alpha]_D^{20} = -1,8^{\circ}$ ($c = 5$, CH_3OH [lacuna]).

15 Esimerkki 1

(S)-(-)-N-allyyli-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli [(I); $R = H$]

35,0 g (0,15 mol) (S)-(-)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolia, $[\alpha]_D^{20} = -1,8^{\circ}$ ($c = 5$, metanoli), liuotetaan 350 millilitraan vedetöntä asetonitriiliä kosteudelta suojatussa reaktorissa.

Liuokseen lisätään 12,9 ml (18,08 g, 0,15 mol) allylibromidia sekoittaen $20 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa noin 5 minuutin aikana. Liuosta pidetään samassa lämpötilassa sekoittaen 1 tunti ja sitten liuos lämmitetään asteittain lämpötilaan $50 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tätä lämpötilaa pidetään yllä kaksi ja puoli tuntia, jonka ajanjakson aikana ilmestyy sakkaa. Sitten suspensio jäähdytetään hauteessa, jossa on jääkylmää vettä, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Sitten sakka suodatetaan pois, 800 millilitralla vettä, tehdään emäksiseksi pH-arvoon yksitoista 10 N natriumhydroksidiliuoksella ja seosta uutetaan 3 kertaa 250 millilitralla dietyylieetteriä.

Yhdistettyjä eetterifaaseja uutetaan kyllästetyllä NaCl-liuoksella ja sitten kuivataan yhdisteellä Na_2SO_4 . Eetteri haihdutetaan pois tyhjöissä ja vesihauteessa. Raaka

kiinteä jäännös otetaan talteen liuottamalla 500 millilitraan heksaaneja refluksissa. Jäähdyttämisen jälkeen puhdistetun(S)-(-)-N-allyyli-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolin kiteinen valkoinen sakka suodatetaan pois ja sitten se saadaan vakiopainoiseksi uunissa 40 °C:ssa tyhjössä.

Tuotteen paino oli 25,4 g, sp. 87 - 88 °C, saanto 62 %, $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ (c = 0,5, N HCl).

Huomaa: havaittu poikkeama ei ole merkitsevä liuotimille (c = 5, C₂H₅OH) ja (c = 1, C₂H₅OH/N HCl).

¹H NMR (CDCl₃, TMS): δ (ppm) 1,00 (s, 3H), 1,00 - 2,90 (m, 2H eks. D₂O), 2,65 (s, 2H), 3,10 - 3,40 (m, 4H), 5,00 - 5,35 (m, 2H), 5,65 - 6,15 (m, 1H), 6,90 - 7,45 (m, 3H).

15 Esimerkki 2

(S)-(+)-N-allyyli-2-metyyliamino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli [(I); R = CH₃]

13,5 g (49 mmol) esimerkissä 1 valmistettua (S)-N-allyyliaminopropanolia ja 13,5 ml 37-prosenttista (w/v) formaldehydiliuosta (ekvivalentti 5,0 g, 133 mmol) sekoitetaan reaktorissa, joka on varustettu tehokkaalla sekoittajalla.

Seos lämmitetään noin 40 - 50 °C:een homogenoinnin edistämiseksi samalla sekoittaen ja sitten se jäähdytetään 15 °C:een. Sitten 9,3 ml 100-prosenttista muurahaishappoa (d = 1,22, ekvivalentti 11,35 g, 247 mmol) lisätään tiipottain. Saatua kirkasta liuosta pidetään kaksi ja puoli tuntia samalla sekoittaen kiehuvaan vesihauteeseen. Jäähdyttämisen jälkeen lisätään 200 ml vettä ja seos tehdään happamaksi pH-arvoon 1 lisäämällä konsentroitu suolahappoa ja sitä uutetaan kolme kertaa 10 millilitralla dietyylieetteriä. Eetterifaasit heitetään pois, happofaasi tehdään emäksiseksi pH-arvoon yksitoista 10 N natriumhydroksidiliuoksella ylittämättä lämpötilaa 25 °C ja sitten seosta uutetaan 3 kertaa 150 millilitralla eetteriä.

Yhdistetyt eetterifaasit pestään kyllästetyllä NaCl-liuoksella ja sitten kuivataan yhdisteellä Na_2SO_4 . Eetteri haihdutetaan pois ja raaka 14,0 gramman jäännös puhdistetaan niin kutsutun "Chromatoflash" kromatografisen tekniikan avulla pylväässä, joka on pakattu silikalla.

Eluointi 95:5 (v/v) dikloorimetaani/metanoliseoksella mahdollistaa puhdistetun (S)-(+)-N-allyyli-2-metyyliamino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolin saamisen öljy-
muodossa, joka kiteytyy hitaasti tuotteeksi, jolla on al-
hainen sulamispiste.

Tuotteen paino oli 11,5 g, saanto 81 %, $[\alpha]_D^{20} = +13^\circ$ (c = 1, N HCl).

^1H NMR (CDCl_3 , TMS): δ (ppm) 0,95 (s, 3H), 2,30 (s, 3H), 2,70 (s, 2H), 2,95 (s, 1H eks. D_2O), 3,05 - 3,45 (m, 4H), 5,00 - 5,35 (m, 2H), 5,60 - 6,05 (m, 1H), 6,95 - 7,40 (m, 3H).

HPLC: optisen puhtauden määrittäminen "Chiral-AGP[®] supplier Chromtech" kolonnilla, eluoiden seoksella, jossa on 0,01 M KH_2PO_4 , jonka pH on säädetty arvoon 6, ja isopropanolia - (v/v). Tulos: prosentuaalinen puhtaus > 98 %.

Hydrokloridi: edellä saatu eutomeeri (I) liuotetaan 150 millilitraan dikloorimetaania. Liuokseen lisätään ylimäärä haihtuvaa vetykloridia samalla kun lämpötila pidetään alle 25 °C:ssa, ja sitten seos jätetään sekoittumaan tunniksi samalla suojaten sitä kosteudelta.

Liuottimet haihdutetaan pois tyhjössä ja vesihauhteessa. Kiinteä jäännös liuotetaan minimimäärään metanolia 20 - 25 °C:ssa ja puhdistettu hydrokloridi saadaan saostamalla sen jälkeen, kun siihen on lisätty vedetöntä dietyylieetteriä. Sulamispiste 171- 172 °C.

Alkuaineanalyysi ($\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{NO} = 324,69$):

Laskettu:	C 51,79	H 6,21	Cl 32,76	N 4,31	O 4,93
Havaittu:	C 51,71	H 6,30	Cl 32,72	N 4,20	O 5,22

IR (KBr): 3250, 2600, 1470, 1400, 1060, 1030, 950, 830 cm^{-1} .

Esimerkeissä 1 ja 2 esitettyjen yhdisteiden distomeeriset antipodit:

(R)-(+)-N-allyyli-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli: sp. 89 °C, $[\alpha]_D^{20} = +11^\circ$ (c = 0,5, N HCl).

5 (R)-(-)-N-allyyli-2-metyyliamino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli: sp. < 50 °C, $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ (c = 1, N HCl).

10 Ne valmistettiin edellä esitettyjen esimerkkien menetelmän mukaisesti (R)-(-)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanolista, joka on kuvattu EP-patenttijulkaisun 237 366 esimerkissä 1-B.

15 Käsillä olevan keksinnön mukaisten tuotteiden alhainen toksisuus ja havaitut odottamattomat farmakologiset ominaisuudet tekevät mahdolliseksi yhdisteiden arvon allergisia ilmenemismuotoja, erityisesti histamiinin vapautumisesta aiheutuvien ilmenemismuotoja, ehkäisevässä tai parantavassa hoidossa.

20 Yhdisteiden (I) akuuttia toksisuutta tutkittiin oraalisesti uroshiirissä. Tähän mennessä tuotteita on annettu vesiliuoksissa annoksina 2 ml 100 painogrammaa kohden. Eläimiä tarkkailtiin antamisesta kolmen tunnin aikana ja sitten päivittäin 14 päivää, jonka jälkeen ne tapettiin ja avattiin.

25 LD₅₀ arvot (letaalit annokset, jotka aiheuttavat kuoleman 50 prosentille eläimistä) ovat alueella 1 000 mg/kg, jota voidaan pitää suhteellisen alhaisena tuotteiden toksisuutena.

30 Eutomeerien (I) antiallergiset ominaisuudet osoitettiin niiden kapasiteetilla inhiboida ovalbumiinille herkistetyissä marsuissa anafylaktista bronkokonstriktiovaikutusta, jonka tuottaa tätä samaa allergeenia sisältävä aerosoli.

35 Tekniikka suoritetaan aiemmin herkistetyissä marsuissa, jotka painavat 250 - 300 g, kahdella intraperitoneaalisella injektioilla, jotka annetaan 24 tunnin välein,

ja jotka sisältävät 0,5 ml fysiologisen suolaliuoksen (0,9 % NaCl) steriiliä suspensiota, joka sisältää 20 µg ovalbumiinia (luokka V, Sigma) ja 100 mg alumiinihydroksidia $Al(OH)_3$.

- 5 Samaan aikaan herkistämättömiä kontrollieläimiä käsitellään kahdella injeksiolla suspensiota, joka ei sisällä ovalbumiinia.

Varsinainen koe suoritetaan eläinten herkistämiseen tarvittavan 14 - 21 päivän ajanjakson jälkeen. Yleensä
10 siihen päästään 18 päivän jälkeen ja kokeessa ensin annetaan lisääntyviä määriä testituotetta liuoksessa vedessä oraalisesti viiden eläimen ryhmille 0,5 - 1,0 ml per eläin, jotka vastaavat annoksia 1 - 10 µmol/kg tuotetta.

Sitten eläimet nukutetaan 50 minuuttia tämän antamisen jälkeen intraperitoneaalisella uretaaniliuosinjektiolla. Sitten ne läpikäyvät leikkausvalmistelun, jossa:

- 15 - laitetaan kanyyli vasempaan päänvaltimoon, jotta verenpaine ja sydämenlyönnit pystytään määrittämään jatkuvasti,

20 - laitetaan kanyyli oikeaan kaulavaltimoon liuosten intravenoosista antoa varten,

 - ylemmän servikaalisen trakeotomian jälkeen laitetaan polystyreenikanyyli (sisähalkaisija 2,65 mm, pituus 9 - 11 mm) eläimen ventiloimiseksi (Harvard 50-1728 pump-
25 pu, Kent, Iso-Britannia) frekvenssillä 60 sisään puhaltamista minuutissa ja joista jokainen on tilavuudeltaan 1,2 ml/kg.

Tämän operaation ja intratrakeaalisen paineen ja verenpaineen stabilisoitumisen jälkeen annetaan ovalbumiiniaerosolia ultraäänisumuttimen (Pulmosonic laite, malli
30 2511) avulla. Laite jakaa 30 sumutusta 30 sekunnissa trakeaalisen ventilaation kautta kokonaistilavuudessa 30 µl ovalbumiinisuspensiota sisältäen 5 mg/ml. 60 minuutin kulu-
luttua elohopeamillimetreinä mitattu intratrakeaalinen
35 paine määritetään jokaisesta testiryhmän ja kontrolliryh-

män eläimestä. Nämä mittaukset mahdollistavat määritettävän testituotteen tuottaman brunkokonstriktion (keuhkoputken kuristuman) inhibition suuruuden määrittämisen. Tulokset ilmaistaan tuotteen ED_{50} arvona, joka on se tehokas annos, ilmaistuna mikromoleina kilogrammaa kohden ($\mu\text{mol/kg}$), joka kykenee inhiboimaan 50 % ovalbumiinin aiheuttamasta brunkokonstriktiosta herkistetyssä eläimessä koeolosuhteissa.

Näissä olosuhteissa määritetty esimerkin 2 eutomeerin (I) hydrokloridin inhiboiva ED_{50} arvo on 1,84 $\mu\text{mol/kg}$.

Antihistamiinisia ominaisuuksia tutkittiin lisäksi marsuissa brunkokonstriktioteistillä, joka suoritettiin H. Konzettin ja R. Rosslerin menetelmän mukaisesti (Arch. Exp. Path. Pharmac., Naunym Schmiedeberg 195 (1940) 71 - 74).

Käsillä olevan keksinnön mukaisia tuotteita tutkittiin tällä testillä sen jälkeen, kun niitä oli annettu liuoksessa tai suspensiossa intravenoosista ja intraduodenaalista kautta ja myös jauhemuodossa intranasaalista kautta.

Antoreitistä riippumatta testissä käytettyjen eläinten valmistelussa nukutetaan ensin urosmarsuja, jotka painavat 350 - 400 g intraperitoneaalisisella (i.p.) injektioilla, jossa on steriiliä ja isotonista liuosta, joka sisältää 25 % (w/v) etyylikarbamaattia 6,0 ml/kg ja sitten eläimiin laitetaan trakeaalinen kanyyli pulmonaarisen paineen mittaamisen mahdollistamiseksi, kanyyli oikeaan kaulavaltimoon liuoksen intravenoosista (i.v.) antoa varten, ja lisäksi kanyyli vasempaan päänvaltimoon verenpaineen kvalitatiivista havainnointia varten.

Sitten eläimet yhdistetään pumppuun (Harvard, viite 50-1718) keinotekoisen hengityksen ylläpitämiseksi frekvenssillä 60 puhallusta per minuutti; intratrakeaalinen paine merkitään ylös kokoonpanolla, jossa on muunnin, vah-

vistin ja piirturi (Gould, vastaavat viitteet 13-4615-50 ja 8188-G4400-06).

Tällä tavoin varustettuina eläinten annettiin olla niitä häiritsemättä 10 minuuttia ennen varsinaisen kokeen alkamista, joka koe suoritettiin eri tavoilla tarkasteltavan antoreitin mukaisesti.

a) i.v. anto

Emäsmuodossa testituotteet liuotetaan isotoniseen liuokseen (0,9 % NaCl), joka sisältää 10 % (v/v) Transcutolia^R. Laimennokset suoritetaan lisäämällä isotonista liuosta. Suolamuodossa, erityisesti hydrokloridimuodossa liuokset valmistetaan isotonisessa liuoksessa.

Eläinten hoito koostuu histamiinidihydrokloridiliuoksen antosarjoista siten, että niille annetaan 100 µmol/kg ennen käsittelyä ja käsittelyn jälkeen testituotteen liuoksen kanssa ja tämä hoito suoritetaan seuraavan aikataulun mukaisesti:

	t = -20 minuuttia	- histamiini (100 µmol/kg)
	t = -10 minuuttia	- toisto <u>kontrolli</u>
20	t = 0	- injektio testituotetta
	t = +10 minuuttia	- histamiini (100 µmol/kg)
	t = +20 minuuttia	- sama kuin edellä
	t = +30 minuuttia	- sama kuin edellä
	t = +40 minuuttia	- sama kuin edellä
25	t = +50 minuuttia	- sama kuin edellä
	t = +60 minuuttia	- sama kuin edellä

Testien tulokset on esitetty taulukossa 1.

b) i.d. anto

Emäsmuodossa testituotteet suspendoidaan liuokseen, joka sisältää 1 % w/v karboksimeetyyliselluloosaa (CMC) ja suolamuodossa ne liuotetaan isotoniseen liuokseen ennen sen antamista eläimen pohjukaissuoleen laitetun kanyylin kautta.

Aikataulu histamiini perättäiseksi antamiseksi i.v. reitin kautta ja koeliuoksen antamiseksi i.d. reitin kautta ovat identtisiä kohdassa a) kuvatun aikataulun kanssa.

Näiden testien tulokset on esitetty taulukossa 2.

5 **c) intranasaalinen-jauhe (in.p.) anto**

Testituote annetaan jauheen, joka sisältää 20 mg laktoosia, jossa on sopiva määrä testituotetta, nasaalisen puhalluksen kautta. Ennen tätä puhallusta eläimen keinotekoinen hengitys pysäytetään hetkellisestiyhdisteen pulmo-
10 naarisen penetraation helpottamiseksi. Aikataulu histamiinin antamiseksi i.v. kautta ja testituotteen in.p. reitin kautta on seuraava:

	t = -15 minuuttia	- histamiini (100 µmol/kg)
	t = -5 minuuttia	- toisto <u>kontrolli</u>
15	t = 0 minuuttia	- testituotteen puhallus
	t = 5 minuuttia	- histamiini (100 µmol/kg)

Näiden testien tulokset on esitetty taulukossa 3.

Tulosten laskeminen ja ilmaiseminen:

Jokaista antoreittiä kohden ja jokaista histamiinin
20 antoaikaa kohden tuotteiden aktiivisuus ilmaistaan prosentuaalisena muutoksena keuhkoputken kuristuman amplitudissa, joka on laskettu suhteessa histamiini "kontrolli" annon tuottamaan aktiivisuuteen, joka edeltää testituotteen antamista. Prosentuaalinen muutos lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti:
25

$$\% \text{-muutos} = 100 - \left(\frac{Bc(tx) - Bo(tx)}{Bc(to) - Bo(to)} \times 100 \right)$$

30

jossa

Bc(tx) tarkoittaa bronkokonstriktion kuristuman amplitudia millimetreissä aikana x;

35 Bo(tx) tarkoittaa perusviivarespiraation amplitudia millimetreissä aikana x;

Bc(to) ja Bo(to) tarkoittavat vastaavia amplitudeja millimetreissä testituotteen antamista edeltävän histamiinin "kontrolli"antamisen jälkeen.

5 Testituotteiden inhiboiva aktiivisuus histamiini-indusoituun bronkokonstriktioon ilmaistaan tutkimusten eri aikoina niiden ED₅₀ arvona, joka on tuotteen tehokas annos ilmaistuna $\mu\text{mol/kg}$, ja joka kykenee inhiboimaan 50 prosenttia histamiini-indusoidusta bronkokonstriktiosta kyseessä olevana aikana.

10 Tämän ilmenemisen heiketessä tulokset ilmaistaan prosentuaalisena muutoksena kyseessä olevana aikana ja annetun testituotteen pitoisuuden suhteen. Näissä olosuhteissa positiivinen prosentti vastaa voimistuvaa tehoa bronkokonstriktioon ja negatiivinen prosentti inhiboivaa vaikutusta.

15 Tulosten statistiset analyysit suoritettiin Student *t* testillä. *p*:n arvoa $< 0,05$ pidetään merkitsevänä.

Käsillä olevan keksinnön mukaisia esimerkeissä 1 ja 2 kuvattuja yhdisteitä käytettiin näissä testeissä. Lisäksi vertailutuotteena esimerkin 1 eutomeerille käytettiin sitä vastaavaa raseemista (R,S) yhdistettä, joka on kuvattu ja valmistettu EP-patenttijulkaisun 237 366 esimerkissä 7. Esimerkin 2 eutomeerin ja sen hydrokloridin suhteen näissä testeissä käytettiin vertailuna raseemisen (R,S) 20 yhdisteen hydrokloridia, joka on myös vastaava edellä kuvatun mukaisesti valmistettu (R) konfiguraation omaava distomeerinen antipodi.

25 Fenspiridihydrokloridia (INN), jonka tiedetään olevan allergeenien antagonisti, joka on aktiivinen ilmäteissä, ja kromakalimia (INN), jonka tiedetään olevan bronkodilataatori, käytettiin myös näissä testeissä referenssiyhdisteinä.

30

Taulukko 1. Inhiboiva vaikutus i.v. kautta keuhkoputken kuristumaan, jonka aiheuttaa histamiini annoksella 100 umol/kg.

Testit i.v. kautta (Tulokset: ED₅₀ umol/kg)

Yhdiste	Rakenne	t=10'	t=20'	t=30'	t=40'	t=50'	t=60'
Keksinnön esimerkki 1	(S)	4,89	2,88	2,54	2,58	3,17	3,55
Vertailurasemaatti	(R, S)	6,65	4,10	4,38	3,39	3,02	3,52
Keksinnön esimerkki 2	(S)	1,27	0,93	0,74	0,96	1,01	0,76
- emäs	(S)	1,68	0,70	0,58	0,57	0,51	0,53
- hydrokloridi	(R, S)	3,72	2,11	1,88	2,07	2,34	2,22
Vertailurasemaatti. HCl	(R)	+6,3	+18,4	+28,2	+35,4	+36,7	+41,1
Vertailudistomeeri *							
Referenssi:							
Fenspiridi (INN). HCl	-	4,25	4,99	6,26	8,90	8,01	11,03

* % teho vaikutukset keuhkoputken kuristumaan statistisesti ei-merkitsevät annoksella 3,5 umol/kg.

Taulukko 2. Inhihoiva vaikutus i.d. kautta keuhkoputken kuristumaan, jonka aiheuttaa histamiini annoksella 100 $\mu\text{mol/kg}$.

Testit i.d. kautta (Tulokset: ED_{50} $\mu\text{mol/kg}$)

Yhdiste	Rakenne	t=10'	t=20'	t=30'	t=40'	t=50'	t=60'
Keksinnön esimerkki 1	(S)	-	1,00	0,78	0,69	1,28	2,17
Keksinnön esimerkki 2	(S)	-	1,45	0,59	0,65	0,63	0,62
- emäs	(S)	1,59	0,42	0,33	0,48	0,51	0,56
- hydrokloridi	(R)	+5,8	+14,6	+32,4	+44,5	+35,6	+30,0
Vertailudistomeeri *							

* % teho vaikutukset keuhkoputken kuristumaan statistisesti ei-merkitsevät annoksella 3,5 $\mu\text{mol/kg}$.

Taulukko 3

Inhiboiva vaikutus in.p. (intranasaalinen-jauhe) kautta keuhkoputken kuristumaan, jonka histamiini aiheuttaa annoksella 100 nmol/kg

5

Testi in.p. reitin kautta (tulokset: ED₅₀ µmol/kg)

Yhdiste	Rakenne	ED ₅₀ ajassa t = 5 min.
Keksinnön esimerkki 2		
10	-emäs	(S)
	-hydrokloridi	(S)
	Kromakalimi (INN)	
		1,28
		1,77
		1,88

Näiden testien tulokset osoittavat vakuuttavasti käsillä olevan keksinnön mukaisten yhdisteiden inhiboivaa aktiivisuutta ovalbumiini- ja histamiini-indusoidun bronkokonstriktion omaavissa marsuissa.

Lisäksi ne osoittavat käsillä olevan keksinnön kohteena olevien esimerkkien 1 ja 2 mukaisten yhdisteiden (S) konfiguraation antihistamiinista aktiivisuutta.

Todellakin, käsillä olevan keksinnön mukaiset yhdisteet osoittautuvat verrattuna niiden raseemisiin (R,S) analogeihin noin vähintään kaksi kertaa aktiivisimmiksi.

Lisäksi i.v. tai in.p. annettuna käsillä olevan keksinnön mukaiset yhdisteet osoittavat yhtä suurta tai suurempaa aktiivisuutta kuin referenssiyhdisteet, joihin niitä verrataan.

Yllättävästi on havaittu, että käsillä olevan keksinnön esimerkin 2 mukaisen tuotteen kohdalla sekä i.v. että i.d. reitin kautta vastaava (R) konfiguraation omaava distomeeri osoittaa ilmeistä vaikkakaan statistisesti ei-merkitsevää vahvaa tehoa histamiiniaktiivisuuteen.

Näiden antiallergisten ja erityisesti antihistamiinisten ominaisuuksien bronkokonstriktioteestissä ei katsota olevan ilmeisiä sinänsä tunnetun tekniikan tason pe-

rusteella ja näitä ominaisuuksia pidetään merkittävinä kaavan (I) mukaisten eutomeerien ja niiden antipodien välillä olevan havaitun dissosiaatioaktiivisuuden näkökulmasta.

5 Ne osoittavat käsillä olevan keksinnön kohteen ja täten käsillä oleva keksintö kohdistuu, uusien yhdisteiden kautta, S-konfiguraation omaaviin enantiomeereihin (I), joita ovat:

10 (S)-(-)-N-allyyli-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli,

(S)-(+)-N-allyyli-2-metyyliamino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli,

15 sekä niiden suoloihin, prosessiin niiden valmistamiseksi ja niiden käyttöön lääkkeellisten tuotteiden muodossa, joilla ehkäistään tai parannetaan allergisten tilojen hoitoa, erityisesti histamiinin vapautumisen aiheuttamien tilojen hoitoja.

20 Sopivien farmaseuttisten koostumusten muodossa käsillä olevan keksinnön mukaiset yhdisteet antiallergisen aktiivisuutensa vuoksi ovat hyödyllisiä hoidettaessa astmaattisia tiloja, ja erityisesti ne inhiboivat allergisesta astmasta tai akuutista tai kroonisesta keuhkoputkentulehduksesta johtuvaa bronkokonstriktiota tai bronkospasmia. Yhdisteiden antihistamininen aktiivisuus oikeuttaa
25 niiden käyttöön symptomatologioissa, joita aiheuttaa histamiinin vapautuminen, kuten esimerkiksi nenä- ja sidekalvomukoosa-allergioissa, allergisessa nuhassa ja tietyissä turvotusmuodoissa, ihotautimuodoissa, kutinamuodoissa tai ihottumamuodoissa.

30 Tuotteiden alhainen toksisuus sallii päivittäiset annokset 1 000 milligrammaan asti oraalisesti annettuina odotettujen vaikutusten saamiseksi. Tavallisesti näitä tuotteita annetaan oraalisesti 50 - 500 mg päivässä jaetuna tarvittaessa useisiin annoksiin.

Käsillä olevan keksinnön mukaisia tuotteita ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja annetaan sopivien koostumusten muodossa sitä kautta, joka sopii hoidettavan häiriön luonteeseen ja laajuuteen.

5 Tällaisia koostumuksia ovat esimerkiksi tabletit, rakeet, kapselit, jauheet, peräpuikot, geelit, suspensiot tai vaihtoehtoisesti liuokset, joita injektoidaan tai niellään.

10 Nämä koostumukset valmistetaan alan ammattimiehen hyvin tuntemilla menetelmillä. Ne sisältävät 1 - 50 painoprosenttia aktiivistayhdistettä, joka koostuu yhdisteestä (I) tai yhdestä sen suolasta, ja 99 - 50 painoprosenttia farmaseuttisesti sopivaa vehikkeliä, joka on yhteen sopiva aktiivisen yhdisteen ja tarkasteltavan koostumuksen fysi-

15 kaalisen muodon kanssa.

Keksintöä rajoittamattomina esimerkkeinä esitetään käsillä olevan keksinnön mukaisia yhdisteitä sisältävien tablettien ja injektoitavien isotonisten liuosten valmistus.

20 **Tabletit:**

Formulaatio:

Esimerkin 2 mukainen aktiivinen	
aine (I)	5 - 75 mg
Polyvinyylipyrrolidoni	2 mg
25 Karboksimeetyylitärkkelys	8 mg
Magnesiumstearaatti	3 mg
Laktoosi	60 - 76 mg
Yksikiteinen selluloosa per	
200 mg painava tabletti	122 - 76 mg

30

Valmistus:

Polyvinyylipyrrolidoni, jota on 0,1 - 1,0 painoprosenttia, liuotetaan veteen, alhaisen molekyylipainon omaavaan alkoholiin, kuten etanoliin tai vesi-alkoholiseokseen.

35

Erikseen valmistetaan yksittäinen seos, jossa on aktiivista ainetta, laktoosia ja puolet määrästä sellulosaa ja karboksimeetyylitärkkelystä, ja tämä seos kostutetaan edellä saadulla liuoksella.

- 5 Tahna rakeistetaan, rakeet kuivataan ja ne sihdataan seulalla. Loput komponenteista lisätään, seosta sekoitetaan hyvin ja sitten tabletoidaan siten, että jokainen yksikkö painaa 200 mg.

Injektoitava isotoninen liuos

10 Formulaatio:

Esimerkin 2 mukaisen aktiivisen

aineen (I) hydrokloridi	10 mg
-------------------------	-------

Natriumkloridi	9 mg
----------------	------

Tislattu vesi	q.s.	1,0 ml
---------------	------	--------

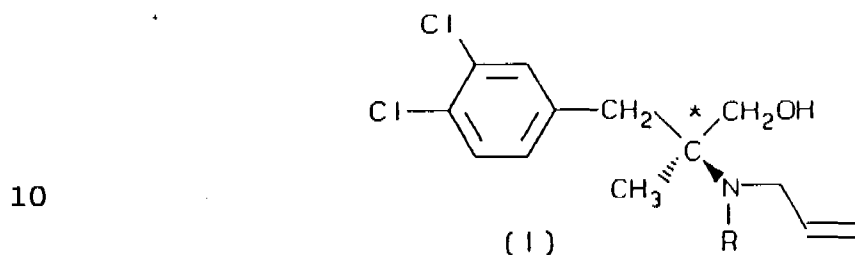
15

Valmistus:

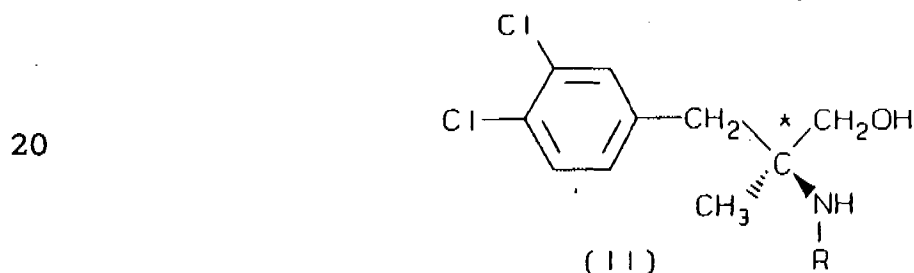
- 20 Liuos jaetaan ampulleihin, jotka steriloidaan tavomaisilla termaalisilla tavoilla niiden sulkemisen jälkeen; liuos voidaan steriloida myös suodattamalla ja jakamalla se ampulleihin, jotka sitten suljetaan, jolloin nämä toimenpiteet suoritetaan steriilissä ilmassa.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä Cahn-Ingold-Prelogin säännön määrittämän absoluuttisen (S)-konfiguraation omaavien enantiomeerien valmistamiseksi, joilla on kaava



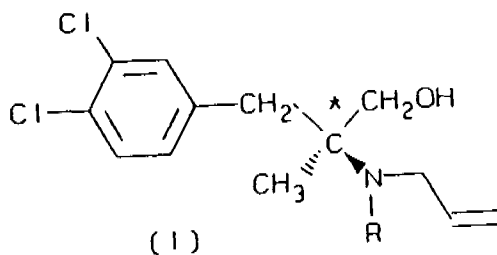
joissa R on vety tai metyyli- radikaali, sekä niiden additiosuolojen valmistamiseksi myrkyttömien happojen kanssa, t u n n e t t u siitä, että absoluuttisen S-konfiguraation omaava välituoteaminoalkoholi, jolla on kaava



jossa R on vety tai metyyli- radikaali, N-allyloidaan allyylihalogendilla inertissä liuottimessa, kuten toluenissa tai asetonitriilissä.

2. Menetelmä Cahn-Ingold-Prelogin säännön määrittämän absoluuttisen (S)-konfiguraation omaavien enantiomeerien valmistamiseksi, joilla on kaava

30



joissa R on vety tai metyyli-
radikaali, sekä niiden addi-
tiosuolojen valmistamiseksi myrkyttömien happojen kanssa,
t u n n e t t u siitä, että ensimmäisessä vaiheessa (S)-
(-)-2-amino-2-(3,4-diklooribentsyyli)-1-propanoli N-ally-
5 loidaan allyylibromidilla inertissä liuottimessa, kuten
tolueenissa tai asetonitriilissä, kaavan I mukaisen yhdis-
teen saamiseksi, jossa R on vety, ja sitten toisessa vai-
heessa mainittu yhdiste N-metyloidaan saattamalla se rea-
goimaan formaldehydin ja muurahaishapon kanssa kaavan I
10 mukaisen yhdisteen saamiseksi, jossa R on metyyli.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kaavan (I) mukaisen (S)-enan-
tiomeerin suola valmistetaan käyttämällä myrkyttö-
ntä hap-
poa.

15 4. Menetelmä farmaseuttisen koostumuksen valmista-
miseksi, t u n n e t t u siitä, että koostumus sisältää
tehokkaan määrän antiallergista tehoa omaavaa, patentti-
vaatimuksessa 1 tai 2 määriteltä kaavan (I) mukaista yh-
distettä, tai sen myrkyttömien happojen kanssa muodostet-
20 tua additiosuolaa yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän
kantajan kanssa.

5. Kaavan (I) mukaisen (S)-enantiomeerin ja sen
myrkyttömien happojen kanssa muodostettujen additiosuolo-
jen käyttö valmistettaessa lääkettä, jolla hoidetaan al-
25 lergisia ja/tai histamiinivälitteisiä sairauksia.