

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 935286 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 935286

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07H 15/24

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 26.11.1993

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 26.11.1993

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 31.05.1994

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

30.11.1992 US 983004

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Bristol-Myers Squibb Company, 345 Park Avenue, New York, NY 10154, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Hoshi, Hideaki, Japan, JAPANI, (JP)

2 • Aburaki, Shimpei, Japan, JAPANI, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

C11-modifioituja pradimisiinijohdannaisia

C11-modifierade pradimicinderivat

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

55288 ATCC

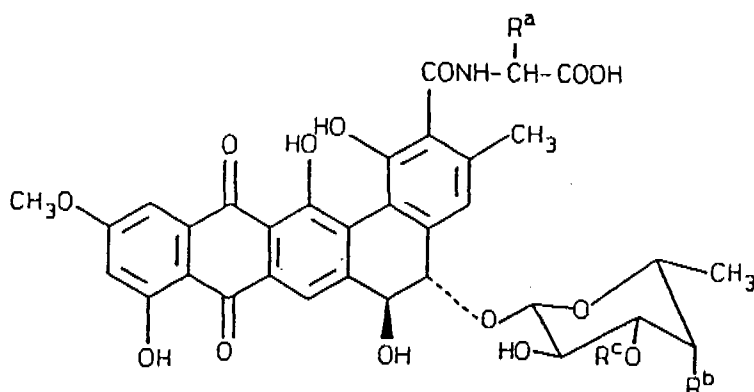
C11-modifioituja pradimisiini johdannaisia

Tausta

Sieniä tappavien antibioottien etsiminen on johtanut pradimisiinien löytämiseen. Pradimisiinit ovat peräisin luonnossa ilmenevistä organismeista kuten Actinomyces, ja ne suojaavat hiiriä tappavilta systeemisiltä infektioilta, kuten Candida albicans, Cryptococcus neoformans ja Aspergillus fumigatus.

US-patentit 4 870 165, 4 973 673, 4 990 497, 4 992 425, 5 053 395 ja 5 091 418 paljastavat pradimisiineja, jotka ovat vastaavasti sieniä tappavia aineita ja alfa-glukosidaasin inhibiittoreita.

Yhdellä tunnettujen pradimisiinien ryhmällä on kaava A:



jossa R^a on H, CH_3 ja CH_2OH ,
 R^b on NH_2 , OH tai $NHCH_3$, ja
 R^c on H tai β -D-ksyloosi.

Kaikilla näillä yhdisteillä on metoksiryhmä tai OCH_3 -ryhmä C-11-asemassa.

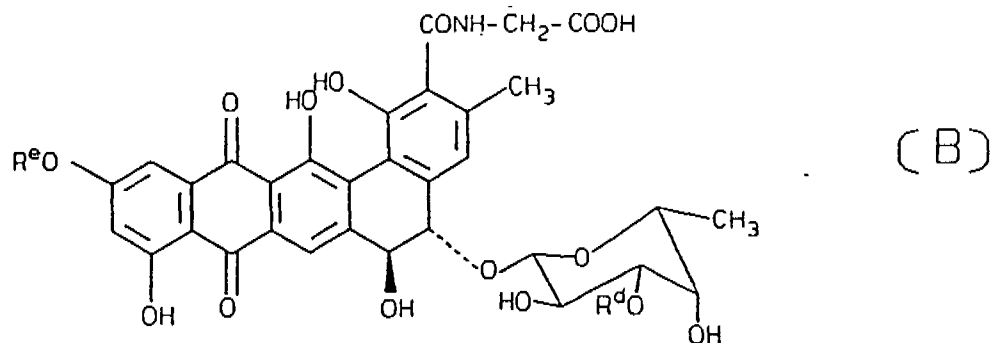
Hiljattain keksittiin uusia substituoituja, 11-O-ksylosyyli ryhmiä sisältäviä pradimisiineja, jotka tunnetaan nimillä pradimisiini T1, T2 ja 11-O-deksylosyyli-pradimisiini T1. T1 ja T2 tuotetaan fermentoimalla aktinomykeettikantaa AA3798 (jonka viljelmä on talletettu Buda-

pestin sopimuksen mukaisesti talletusnumerolla ATCC 55288). Kolmas yhdiste on johdettu T1:stä.

Nämä ksyloosyyli-substituoituneet pradimisiinit ovat kuvion B mukaisia:

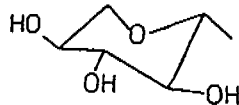
5

10



15

jossa R^d on H tai β -D-ksyloosi ja R^e on H tai



(se on: β -L-ksyloosi).

20

Pradimisiini-T1:ssä R^d on β -D-ksyloosi ja R^e on β -L-ksyloosi. Pradimisiini-T2:ssä R^d on H ja R^e on β -L-ksyloosi. 11-O-deksylosyylipradimisiini-T1:ssä R^d on β -D-ksyloosi ja R^e on H.

25

Keksintö

On havaittu, että uusia biologisesti aktiivisia pradimisiini-johdannaisia voidaan tehdä ksyloosyyli-pradimisiineista. Keksinnön mukaisilla yhdisteillä ei ole metoksi- tai ksyloosyyli-ryhmiä pradimisiinimolekyylin C-11-asemassa. Niillä ei ole 11-asemassa metoksi- ja ksyloosyyli-osa. Ne ovat kemiallisesti erilaisia kuin muut tunnetut sienten kasvua estävät antibiootit.

30

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Ellei toisin ilmaista, kaikki esitetyt prosentit ovat painoprosentteja, jotka pohjautuvat koostumuksen kokonaispainoon.

35

Keksintö koskee uusia yhdisteitä, niiden valmistusmenetelmiä ja menetelmiä ja koostumuksia, jotka käyttävät niitä.

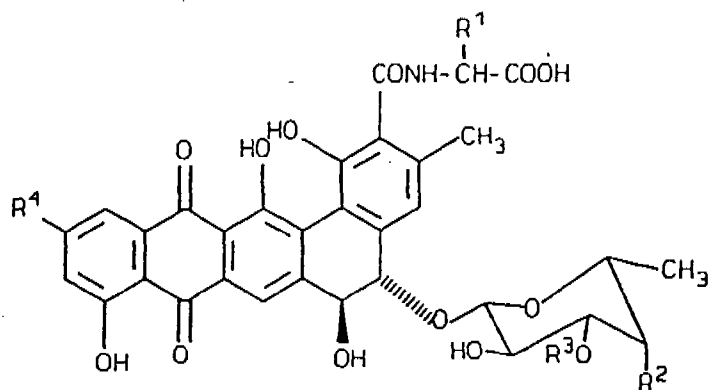
Tässä kuvatuilla pradimisiineilla on biologista aktiivisuutta, joka on samanlainen kuin tässä viitatuilla ksyloosyylipradimisiineilla.

Yhdisteet

Tämän keksinnön yhdisteillä on kaava I:

10

15



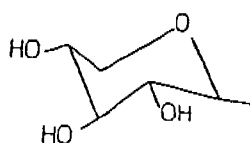
(I)

20

jossa R^1 on H, CH_3 tai CH_2OH ,
 R^2 on OH tai NR^5R^6 ,

25

R^3 on H tai



(β -D-ksyloosi),

R^5 ja R^6 ovat H tai CH_3 ,

R^4 on H, OH, OR^7 , OCH_2R^8 , OSO_2CF_3 , $N(CH_3)_2$, $CONH_2$ tai CN,

30

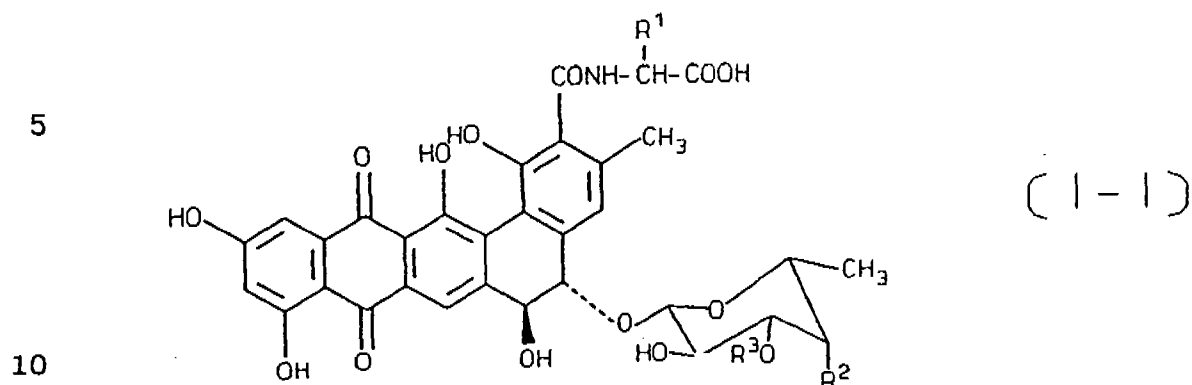
R^7 on C_{2-5} -alkyyli, C_{2-5} -alkenyylitai C_{2-5} -halogeenialkyyli (halogeeni = Cl tai F), ja

R^8 on fenyyli, $COOH$ tai $CONH_2$, sillä varauksella että kun R^4 on OH, R^1 ei ole H.

35

Yksi edullinen yhdisteryhmä luetellaan taulukossa I R^1 :n, R^2 :n ja R^3 :n soveliaiden määritysten kanssa. R^4 on aina OH yhdisteissä I_{A-F} .

Täten näillä yhdisteillä on kaava I-I:



jossa R¹:llä, R²:lla ja R³:lla on taulukossa I annetut merkitykset.

15

Taulukko I: yhdisteet I_{A-F}^*			
Yhdiste	R ¹	R ²	R ³
I _A	CH ₃	NHCH ₃	β-D-ksyloosi
I _B	CH ₃	NHCH ₃	H
20 I _C	CH ₃	NH ₂	β-D-ksyloosi
I _D	CH ₂ OH	NHCH ₃	β-D-ksyloosi
I _E	CH ₂ OH	N(CH ₃) ₂	β-D-ksyloosi
I _F	CH ₂ OH	OH	β-D-ksyloosi
25 *R ⁴ =OH			

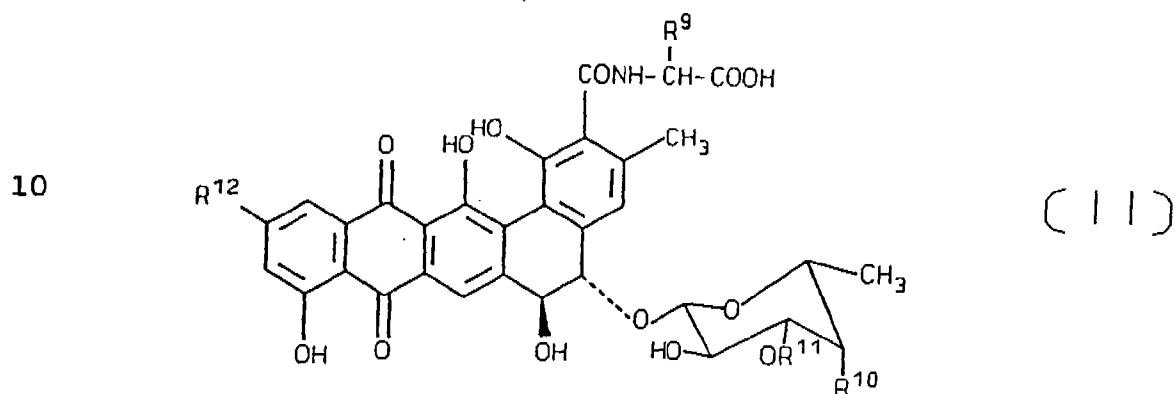
30

35

Taulukossa I olevat yhdisteet valmistettiin käsittelemällä 11-OMe-pradimisiineja (se on: 11-metoksi pradimisiineja) aryylietterin lohkaisevalla reagenssilla kuten LiI (I.T. Harrison ym., Chem. Commun., 616, 1969) soveliaassa orgaanisessa liuottimessa, kuten kollidiini, lutiidiini tai dimetyyliformamidi, kuumentaan 160 - 200 °C:n lämpötilassa, ja reaktioaika oli välillä noin 30 minuuttia (1/2 tuntia) - noin 16 tuntia, haponsitojan, kuten 4 Å:n molekyyliseulan, ollessa läsnä tai poissa. Tuotteet puh-

distettiin C_{18} -käänteisfaasipylväällä, eluoiden fosfaattipuskurilla, joka oli 10 - 30-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5).

Toinen hyödyllinen pradimisiini johdannaisten ryhmä ovat ne, joilla on kaava II:



15

jossa R^9 on H tai CH_3 ,

R^{10} on OH tai $NHCH_3$,

R^{11} on H tai β -D-ksyloosi, ja

20 R^{12} on H, OC_2H_5 , OCH_2CH_2F , $OCH_2CH=CH_2$, OCH_2 -fenyyli (OCH_2Ph), OCH_2COOH , OCH_2CONH_2 , $N(CH_3)_2$, $CONH_2$ tai CN.

Nämä johdannaiset saadaan 11-hydroksipradimisiineista alkyloimalla tai seuraavilla vaiheilla:

25 1) trifluorimetaanisulfonointi,
2) hydridin pelkistys tai nukleofiilinen substituo-
tio, ja

3) karboksi- ja/tai aminosuojaryhmien poisto.

Yksi edullinen kaavan II mukainen yhdisteryhmä ilmaistaan taulukossa II yhdessä niiden R^9 -, R^{10} -, R^{11} - ja R^{12} -ryhmien määritysten kanssa.

30

Taulukko II: yhdisteet II _{A-L}				
Yhdisteet	R^9	R^{10}	R^{11}	R^{12}
II _A	H	OH	β -D-ksyloosi	OC_2H_5
II _B	H	OH	β -D-ksyloosi	OCH_2CH_2F
II _C	H	OH	β -D-ksyloosi	$OCH_2CH=CH_2$
II _D	H	OH	β -D-ksyloosi	OCH_2Ph

35

Taulukko II: yhdisteet II _{A-L} (jatkoa)				
Yhdisteet	R ⁹	R ¹⁰	R ¹¹	R ¹²
II _E	H	OH	β-D-ksyloosi	OCH ₂ COOH
II _F	H	OH	β-D-ksyloosi	OCH ₂ CONH ₂
II _G	CH ₃	NHCH ₃	β-D-ksyloosi	H
II _H	CH ₃	NHCH ₃	H	H
II _I	H	OH	β-D-ksyloosi	H
II _J	H	OH	β-D-ksyloosi	N(CH ₃) ₂
II _K	H	OH	β-D-ksyloosi	CONH ₂
II _L	H	OH	β-D-ksyloosi	CN

Synteettiset (17-COOCH₃)-välituotteet, yhdisteet A¹ - D¹, joita käytettiin tuotettaessa yhdisteet II_A - II_L, esitetään taulukossa III:

Taulukko III: yhdisteet A ¹ - D ¹				
Yhdisteet	R ⁹	R ¹⁰	R ¹¹	R ¹²
A ¹	H	OH	β-D-ksyloosi	OH
B ¹	CH ₃	NH ₃ Cbz	β-D-ksyloosi	OH
C ¹	CH ₃	NCH ₃ Cbz	H	OH
D ¹	H	OH	β-D-ksyloosi	OTf

Cbz = bentsyylioksikarbonyyli

Tf = trifluorimetaanisulfonyyli

Taulukon II mukaiset C-11-modifioidut johdannaiset tuotetaan edellä olevista 11-hydroksijohdannaisista ja niihin sisältyvät 11-O-(substituoitu)alkyylipradimisiini T1:t, jotka valmistettiin käsittelemällä karboksisuojattu 11-hydroksidipradimisiini T1 soveliaalla (ja mahdollisesti

substituoidulla) alkyyli- tai aralkyylihalidilla kuten etyylibromidi, 2-fluorietyylibromidi, allylibromidi, bentsyylibromidi, etyylibromiasetaatti tai jodiasetamidi, orgaanisessa liuottimessa kuten dimetyylisulfoksidi, emäksisten metallisuolojen, kuten K_2CO_3 , ollessa läsnä 2 - 16 tunnin ajan, jota seuraa suojaryhmän poisto emäksisellä hydrolyysillä ja puhdistus käänteisfaasipylväskromatografialla. Vasta tuotujen alkyyliryhmien aseman todettiin olevan 11-OH-asema NOE-efektin (nuclear Overhauser effect) perusteella, joka havaittiin 11-O-alkyyliprotonien ja 10- ja 12-protonien välillä 1H -NMR:ssä.

Tähän C-11-modifioitujen johdannaisten ryhmään kuuluvat pradimisiini A:n, B:n ja T1:n 11-deoksi-, 11-dimetyyliamino-, 11-syaani- ja 11-karbamoyyli johdannaiset, jotka valmistettiin karboksi- ja aminosuojatuista 11-hydroksipradimisiineista toisiaan seuraavilla reaktioilla seuraavalla tavalla:

1) 11-hydroksiryhmän selektiivinen trifluorimetaanisulfonylointi käsittelemällä triflatoivalla reagenssilla, kuten N-fenyylitrifluorimetaanisulfonimidi tai trifluorimetaanisulfonianhydridi, emäksisessä orgaanisessa liuottimessa kuten pyridiini, sellaisen orgaanisen emäksen läsnäollessa kuten dimetyyliaminopyridiini, 0 °C:n lämpötilassa - huoneenlämpötilassa 30 minuutin - 16 tunnin ajan, jota seurasi kromatografinen puhdistus käänteisfaasipylvässä, tuotti vastaavat 11-O-trifluorimetaanisulfonyyliväli tuotteet 58 - 85-prosenttisella saannolla. Niiden rakenteet vahvistettiin 10- ja 12-protonien tyypillisten alhaisessa kentässä olevien siirtymien perusteella 1H -NMR:ssä; 2) ja 11-O-triflaattien reaktiot sellaisessa orgaanisessa liuottimessa kuten DMF, hydridi-ionin kanssa, joka saatiin aikaan lisäämällä samanaikaisesti muurahais-happo ja trietyyliamiini, nukleofiilisen emäksen kanssa kuten dimetyyliamiini, tai trialkyyli substituoidun metallireagenssin kanssa kuten tributyyli tinasyanidi, palladi-

um-(O)-katalysaattorin kuten tetrakis(trifenyylifosfiini)-palladium-(O) läsnä ollessa, tai saatiin aikaan in situ palladiumasetaatista ja trifenyylifosfiinista, reaktioaikana 30 minuuttia - 16 tuntia huoneenlämmössä tai kuumentuen 50 - 100 °C:n lämpötilassa, jota seurasi karboksi- ja aminosuojaryhmän (-suojaryhmien) poisto emäksisellä hydrolyysillä, optimaalisella hydrauksella ja puhdistuksella C₁₈-käänteisfaasipylväskromatografiassa, tuotti vastaavat 11-modifioidut johdannaiset.

10 Antiviraalinen vaikutus in vitro

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden antiviraalinen vaikutus in vitro (MIC) määritettiin hiivamorfologia-agarilla (YMA, Difco Laboratories, USA), joka oli puskuroitu 0,06-molaarisella fosfaatilla (pH 7,0). Yhdeksän osaa sulanutta agaria yhdistettiin yhteen osaan antibioottiliuosta petrimaljoilla. Agarmaljojen pinnalle 15 pantiin täplänä 5 µl suspensiota, joka sisälsi 2×10^6 solua/ml. Maljoja inkuboitiin 28 °C:n lämpötilassa ja MIC:t merkittiin muistiin 40 tunnin inkuboinnin jälkeen. Tulokset esitetään taulukossa 1. Kaikki kaavan I-I mukaiset 11-hydroksijohdannaiset ovat aktiivisia laajaa sienikirjoa vastaan. Kaavan II mukaisilla C-11-modifioiduilla johdannaisilla oli monia erilaisia sieniä tappavan aktiivisuuden alueita.

25

Taulukko IV

C-11-modifioitujen pradimisiinijohdannaisten sieniä tappava aktiivisuus in vitro

30	Yhdiste	Ca-4	MIC (µg/ml)	
			Ct-12	Cn-2
	Pradimisiini A	6,3	12,5	1,6
	I _A	6,3	25	3,1
	I _C	6,3	12,5	1,6
35	I _D	6,3	12,5	3,1
	I _E	6,3	25	6,3

Taulukko IV (jatkoa)
C-11-modifioitujen pradimisiini johdannaisten sieniä
tappava aktiivisuus in vitro

5	Yhdiste	Ca-4	MIC (µg/ml)	Cn-2
			Ct-12	
	I _F	6,3	12,5	12,5
	II _A	3,1	12,5	1,6
	II _B	3,1	6,3	1,6
10	II _C	6,3	12,5	3,1
	II _D	> 100	> 100	12,5
	II _G	6,3	12,5	1,6
	II _I	6,3	12,5	6,3
	II _J	12,5	> 100	50
15	II _K	12,5	25	6,3
	II _L	12,5	25	6,3

Ca-4: *Candida albicans* A9540

Ct-12: *Candida tropicalis* IF010241

Cn-2: *Gryptococcus neoformans* IAM4514

20

11-ksylosyyli-esiasteita

Tämä osa kuvaa sellaisten 11-ksylosyyliyhdisteiden valmistuksen, joista keksinnön mukaiset yhdisteet johdetaan. Pohditaan yhdisteitä, piirteitä ja niiden biologisia ominaisuuksia.

25

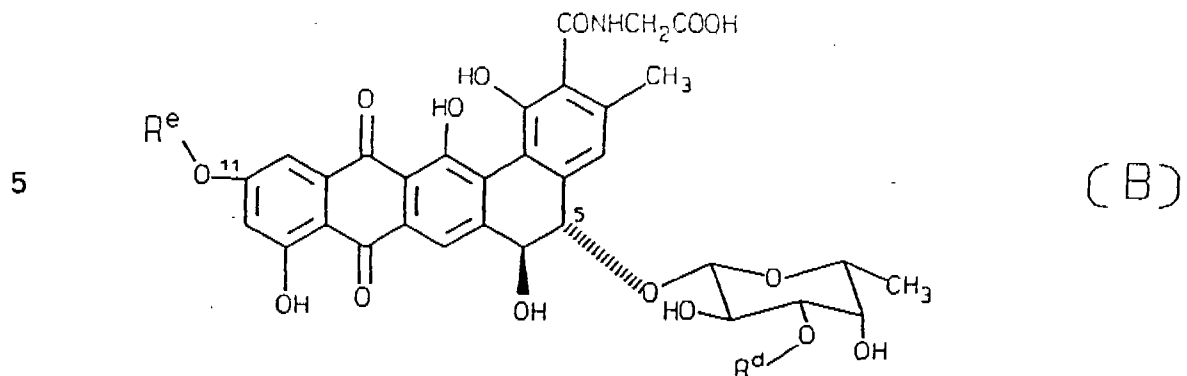
A. Yhdisteet

Antibioottiset aineet, joille oli annettu nimiksi pradimisiini T1 ja T2, 11-O-deksylosyylipradimisiini T1, valmistettiin fermentoimalla Actinomyces-kantaa AA3798 (ATCC:n talletusnumero 55288). Myöhemmin pohditaan näiden yhdisteiden käyttöä sellaisten infektiotautien hoidossa, joita aiheuttavat mikro-organismit, jotka ovat alttiita mainituille antibiooteille.

30

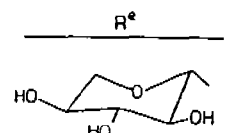
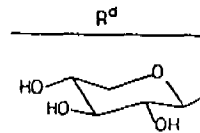
Rakenteen B piirteet ovat yhteisiä kaikille kolmelle yhdisteelle. R^d:n ja R^e:n variaatiot, jotka osoitetaan jäljempänä, tuottavat yksilöllisiä rakenteita.

35



10

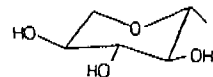
Pradimisiini T1:



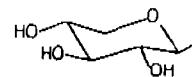
15

Pradimisiini T2:

H



11-O-deksylosyylipradimisiini T1:



H

20

Osana yritystä seuloa pradimisiinin vesiliukoisia analogeja, hakijat keksivät että harvinainen aktinomykeetti, jolle oli annettu numero AA3798, tuotti uusia jäseniä pradimisiinien antibioottiryhmässä. Kanta AA3798 eristettiin maaperänäytteestä, joka poimittiin Nerimassa Tokiossa Japanissa 29. tammikuuta 1989.

25

30

Kannan AA3798 viljelmä talletettiin American Type Culture Collection -talletuslaitokseen BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICRO-ORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE -sopimuksen mukaisesti, ja kaikki rajoitukset, jotka koskevat talletetun mikro-organismin saatavuutta yleisölle, poistetaan peruuttamattomasti kun tästä patenttihakemuksesta myönnetään patentti. Talletetulle viljelmälle on annettu talletusnumeroksi ATCC 55288.

Kannan AA 3798 taksonomia

Elatusaine, jota käytettiin tutkittaessa kannan viljelyominaispiirteitä ja fysiologisia ominaispiirteitä, valmistettiin Shirlingin ja Gottliebin suosituksen mukaisesti, teos "Methods for Characterization of *Streptomyces* Species", Intern. J. Syst. Bact., 1966, 16:313 - 340; Waksmanin suosituksen mukaisesti, teos The Actinomycetes, Vol. II, "Classification, Identification and Description of Genera and Species", s. 328 - 334, julkaisija The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961, ja Arain suosituksen mukaisesti, teos Culture Media for Actinomycetes, julkaissut The Society for Actinomycetes Japan, 1975. Viljelmiä tarkkailtiin kun oli inkuboitu 32 °C:n lämpötilassa 2 - 4 viikkoa. Värien nimet ja värisävyjen numerot (taulukko 1) annetaan teoksen Manual of Color Names mukaisesti (Japan Color Enterprise Company, Ltd., 1987).

Morfologia

Kanta AA 3798 kasvoi hyvin hiivauute-mallasuute-agarilla (ISP-2), epäorgaanisella suola-tärkkelys-agarilla (ISP-4), hiivatärkkelysagarilla ja Bennettin agarilla missä tahansa lämpötilassa välillä 19 °C - 40 °C. Viljelmät olivat paksultililmamyseelin peitossa, joka vaihteli jauhemaisesta samettimaiseen. Alustamyseeli oli hyvin kehittynyt ja epäsäännöllisesti haarautunut. Joissakin agar-alustoissa, kuten vesiagar, tämä alustamyseeli oli fragmentoitunut epäsäännöllisen sahalaitaisesti lyhyiksi sauvaelementeiksi. Ilmamyseelit olivat runsaita ja pitkiä, kohtuullisesti haarautuneita, suorita tai epäsäännöllisen käyriä. Ilmamyseelit olivat niin ohuita (halkaisija 0,3 µm), että niiden itiöintiä ei voitu havaita valomikroskoopilla, mutta pyyhkäisyelektronimikroskopia paljasti, että ne olivat täysin fragmentoituneet itiöiksi. Itiöt olivat sauvamaisia ja mitoiltaan 0,3 x 1,0 - 2,0 µm, ja sileäpintaisia. Nämä itiöt eivät olleet liikkuvia.

B. Ominaispiirteet

Kannalla AA 3798 oli valkoiset ilmamyseelit, pitkään inkuboitaessa ilmamyseelit muuttuvat joskus vaaleanpunertavan valkoiseksi. Vegetatiivisten ja diffundoituvien pigmenttien väri orgaanisilla alustoilla vaihteli pehmeän vaaleanpunaisesta tummanpunaiseen. Väri muuttui vaaleanpunertavankeltaisesta voimakkaan kellertävään oranssiin, kun lisättiin 0,1 N HCl. Kannan AA 3798 viljelyominaispiirteet eri alustoilla esitetään yhteenvetona taulukossa V.

5

10

15

20

25

30

Taulukko V kaavan AA 3798 viljelyominaispiirteitä		
Alusta		
Sakkaroosinitraatti- agar (waksman alusta nro 2)	Kasvu	Hailakka punertavankeltainen (130)
	Käänteinen	Pehmeän kellertävän vaaleanpunainen (27)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen
	Liukoinen pigmentti	Pehmeän kellertävän vaalean- punainen (28)
Glyserolinitraattiagar	Kasvu	Hailakka punertavan- keltainen (126)
	Käänteinen	Vaalean punertavankeltainen (131)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen
	Liukoinen pigmentti	Ei mitään
Glykoosiasparagiiniagar (waksmanini alusta nro 2)	Kasvu	Vaalean oranssi (64)
	Käänteinen	Vaalean oranssi (64)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen
	Liukoinen pigmentti	Ei mitään
Hiivauutemallasuute-agar (ISP-alusta nro 2)	Kasvu	Tummanpunainen (57)
	Käänteinen	Tummanpunainen (57)
	Ilmamyseeli	Vaaleanpunaiseen vivahtavan val- koinen (391) jauhemainen hyvä
	Liukoinen pigmentti	Tummanpunainen (57)
Kaurahiutale agar (ISP-alusta nro 3)	Kasvu	Väritön-huomattavan vaalean- punainen (33)
	Käänteinen	Pehmeän kellertävän vaalean- punainen (27)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen
	Liukoinen pigmentti	Pehmeä (25) vaaleanpunainen
Epäorgaanisia suoloja si- sältävä tärkkelysagar (ISP- alusta nro 4)	Kasvu	Kellanruskea (101)
	Käänteinen	Pehmeän oranssi (83)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen, hyvä
	Liukoinen pigmentti	(392)ei mitään beigenvalkoinen
Glyseroliasparagiiniagar (ISP-alusta nro 5)	Kasvu	Vaalean oranssi (64)
	Käänteinen	Vaalean oranssi (65)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen
	Liukoinen pigmentti	Ei mitään

5

10

15

20

25

Taulukko V (jatkoa) kannan AA 3798 viljelyominaispiirteitä		
Alusta		
Tyrosiiniagar (ISP-alusta nro 7)	Kasvu	Vaaleanoranssi (65)
	Käänteinen	Vaaleanoranssi (65)
	Ilmamyseeli	Peigenvalkoinen (388) jauhemainen
	Liukoinen pigmentti	Ei mitään
Ravintoagar (wakamanin alusta nro 14)	Kasvu	Hailakan punertavankeltainen (125)
	Käänteinen	Hailakan punertavankeltainen (125)
	Ilmamyseeli	Ei mitään
	Liukoinen pigmentti	Ei mitään
Hiivatärkkelysagar	Kasvu	Tummanpunainen (57)
	Käänteinen	Tummanpunainen (57)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen, hyvä
	Liukoinen pigmentti	Voimakas sinipunertavan punainen (44)
Dennettin agar (wakamanin alusta nro 30)	Kasvu	Tummanpunainen (57)
	Käänteinen	Tummanpunainen (57)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (389) jauhemainen, hyvä
	Liukoinen pigmentti	Voimakas sinipunertavan punainen (44)
Gauzen agar	Kasvu	Hailakka punertavankeltainen (125)
Peptonimaissiagar	Käänteinen	Vaalean oranssi (64)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen, hyvä
	Liukoinen pigmentti	Vaaleanpunaiseen vivahtavan valkoinen (391)
	Kasvu	Harmahtavan vaaleanpunainen (32)
	Käänteinen	Harmahtavan vaaleanpunainen (32)
	Ilmamyseeli	Valkoinen (388) jauhemainen, vähäinen
	Liukoinen pigmentti	Pehmeän vaaleanpunainen (25)

Fysiologiset ominaisuudet

30

Kannan AA 3798 fysiologiset piirteet ja hiilenlähteiden hyödyntäminen esitetään taulukoissa VI ja vastavasti VII. Mitkään vitamiinit eivät olleet kasvulle välttämättömiä.

Taulukko VI Kannan AA 3798 fysiologisia piirteitä	
Testi	Tulokset
Tärkkelyksen hydrolyysi (ISP-alustalla nro 4)	Positiivinen
Nitraatin pelkistys (Difco, nitraattiliemi)	Negatiivinen
Maito (Difco, 10-prosenttinen kuorittu maito)	
Koaguloituminen	Positiivinen
Peptoniloituminen	Positiivinen
Selluloosan hajottaminen (sakvaroosinitraattiliuos, jossa on paperiliuska ainoana hiilenlähteenä)	Negatiivinen
Liivatteen nesteytys	
Pelkällä liivatteella	Ei kasvua
Glukoosi-peptoni-liivatteella	Ei kasvua
Melaniinin muodostuminen (ISP-alustalla nro 7)	Negatiivinen
Lämpötila-alue kasvulle (°C)	19 - 40
Optimilämpötila (°C)	29 - 34
(Hiivatärkkelysagarilla)	
pH-alue kasvulle	6 - 8
Optimi-pH	7 - 8
(Trypticase-soijaliemissä, BBL)	
Kasvu seuraavissa:	
Lysotsyymi 0,01 %	Positiivinen
0,1 %	Negatiivinen
NaCl 2 %	Positiivinen
8 %	Negatiivinen

Taulukko VII Kannan AA 3798 hiilenlähteiden hyödyntäminen	
Hiilenlähde	Kasvu
Arabinoosi	++
Inositoli	++
D-mannitoli	++
Sakkaroosi	++
L-ramnoosi	++
Raffinoosi	++
D-ksyloosi	++
D-glukoosi	++
Fruktoosi	+

+: kohtalainen kasvu ++: runsas kasvu

Kannan AA 3798 antibioottiherkkyyttä tutkittiin käyttämällä antibioottikiekkoja (Tridisk, Eiken Chemical CO., Ltd). Kiekot sijoitettiin hiiva-glukoosi-mallasagarin pinnalle (0,1 % hiivauutetta, 1 % glukoosia, 0,1 % mallasuutetta, 0,05 % $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$:ta, ja 1,5 % agaria), jolle oli sijoitettu kanta AA 3798 (4-prosenttinen ympä), ja sitten maljoja inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 4 päivän ajan.

Kanta AA 3798 oli resistentti 20 µg:lle ampisilliiniä, 10 µg:lle kefaleksiiniä, 50 µg:lle fosfomysiiniä, 15 µg:lle linkomysiiniä, 5 µg:lle gentamisiiniä, 10 µg:lle tobramysiiniä, 15 µg:lle nalidiksiinihappoa, 300 yksikölle polymyksiini B:tä, 10 µg:lle erytromysiiniä ja 15 µg:lle josamysiiniä. Se oli herkkä 1 µg:lle klavulaanihappoa, 2 µg:lle tikarsilliinia, 30 µg:lle tetrasykliiniä, 10 µg:lle kloramfenikolia, 30 µg:lle kanamysiiniä, 2 µg:lle norfloxasiinia ja 50 yksikölle kolistiinia.

10 Soluseinän kemotyyppi

Analysoitiin kokosolukoostumuksia menetelmillä, jotka ovat kuvanneet Becker ja Lechevalier artikkelissa "Rapid Differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by Paper Chromatography of Whole Cell Hydrolysate", Appl. Microbiol., 1964, 12:421 - 423, ja artikkelissa "Chemical Compositions of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes", Appl. Microbiol., 1965, 13:236 - 243. Kanta AA 3798 sisälsi mesodiamiinipimeliinihappoa, glukosia, glukosamiinia, galaktoosia ja pieniä määriä riboosia, mannoosia ja ksyloosia, mutta maduroosia ja arabinoosia ei havaittu, mikä viittaa siihen että tämän kannan soluseinä on tyyppiä IIIC. Mykolihappoja ei havaittu, kun käytettiin Minnikinin ym. menetelmää, artikkeli "Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and Related Taxa by Thin-Layer Chromatographic Analysis of Whole-Organism Methanolysates", J. Gen. Microbiol., 1975, 88:200 - 204. Menakionikoostumuksen analysointi Collinsin ym. menetelmää käyttäen, artikkeli "A Note on the Separation of Natural Mixtures of Bacterial Menaquinones Using Reverse-Phase Thin-Layer Chromatography", J. Appl. Bacteriol., 1980, 48:277 - 282, paljasti koostumuksen 69 % MK-9 (H₈), 18 % MK-9 (H₆), 6 % MK-9 (H₄) ja 6 % MK-9 (H₁₀). Kokosolun rasvahapot, jotka määritettiin Suzukin ym. menetelmällä, artikkeli "Taxonomic Significance of Cellular Fatty Acid Composition in Some Coryne-

form Bacteria", Int. J. Syst. Bacteriol., 1983, 33:188 - 200, koostuivat 34-prosenttisesti 14-metyylipentadekaanihaposta, (iso16:0), 21-prosenttisesti 14-metyyliheksadekaanihaposta (anteiso-17:0), 14-prosenttisesti 15-metyyliheksadekaanihaposta (iso17:0) ja 10-prosenttisesti 10-metyylioktadekaanihaposta (10Me18:0).

Aktinomykeettien yleisen luokitteluoppaan mukaisesti, jonka on kuvannut H.A. Lechevalier (teoksessa Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, toim. S.T. Williams ym., s. 2344-2347, 1989, Williams & Wilkins), mesodiaminopimeliinihappojen läsnäolo samalla kun diagnostista sokeria ei ole ja ilmarihmoihin muodostuu pitkiä itiöketjuja, viittaa siihen että kannan AA 3798 kuulumisen *Nocardiosis*-sukuun on vain yksi yleinen mahdollisuus. Kuitenkin sen määrittelyn pohjalta, jonka ovat kuvanneet Grund ja Kroppenstedt ("Fermentation, Chemotaxonomy and Numerical Taxonomy of the Genus *Nocardiosis* Meyer", 1976, Int. J. Syst. Bacteriol. 40:5 - 11, 1990), kannasta AA 3798 peräisin olevat, sekä menakinonien että rasvahappojen pääkomponentit eroavat täysin *Nocardiosis*-suvun vastaavista pääkomponenteista. Koska aikaisemmin ei ole raportoitu aktinomykeetin kaltaisia organismeja, joiden soluseinän kemotyyppi olisi edellä kuvatus kaltainen, on tällä hetkellä mahdotonta määrittää kannan AA 3798 sukua, vaikkakin uuden suvun ehdottaminen voisi olla perusteltua. Niinpä kanta AA 3798 määritettiin tunnistamattomaksi aktinomykeetiksi.

Tämän keksinnön mukaiset uudet antibiootit tuotetaan kontrolloiduissa olosuhteissa aerobisella fermentoinnilla soveliaissa nestemäisissä ravintoalustoissa, niin että tehdään ympäristö edellä olevasta kannasta tai sen varianteista tai mutanteista. Nestemäiset ravintoalustat, kuten ne joita käytetään tavallisten antibioottien tuottamiseksi, ovat soveliaita pradimisiini T1:n ja T2:n tuottamiseksi. Suotavia hiilenlähteitä ovat glukoosi, glyseroli, fruktoosi, sakkaroosi, ksyloosi, tärkkelys ja muut hiili-

hydraatit, ja edullisia typenlähteitä ovat soi-japapujauho, puuvillasiemenjauho, peptoni, lihauute, kalajauhot, mais-sinliotusneste ja vastaavat.

Suotavia epäorgaanisia suoloja ovat kobolttiklori-
 5 di, kalsiumkarbonaatti ja kaliumfosfaatti, jotka lisätään tarvittaessa. Sovelias nestemäinen alusta on kuvattu esi-merkissä 2. Toinen mukavampi alusta on FR-22, joka koostuu soi-japapujauhosta (1 - 3 %), glukosista (1 - 3 %), D-as-paragiinihaposta (0,1 - 0,2 %) ja CaCO_3 :sta (0,05 -
 10 0,03 %). Adekanolia, silikonია ja vastaavia käytetään vaahtoamista estävinä aineina. Kuten jokainen sellainen mikrobiologi ymmärtää, jolla on kokemusta fermentoinnissa, pradimisiini T1:n ja T2:n tuotto ja suhde vaihtelevat sen mukaan, mitä fermentointiolosuhteita ja kantoja ja/tai
 15 alustoja käytetään. Edulliset fermentointiolosuhteet ovat aerobisia viljelyjä pH-alueella 5 - 8 20 - 37 °C:n lämpö-tilassa 5 - 14 päivän ajan, edullisesti pH-alueella 6 - 7 28 - 34 °C:n lämpötilassa 6 - 12 päivän ajan.

Pradimisiini T1:n ja T2:n tuotantoa voidaan tark-
 20 kailla helposti fermentoinnin aikana tavanomaisilla tek-niikoilla, kuten ohutkerroskromatografia, HPLC, näkyvä absorptio ja *Candidan* kasvua estävä vaikutus.

Eristys ja puhdistus

Pradimisiini T1:n ja T2:n fermentointiliemestä
 25 eristämiseksi voidaan käyttää asianmukaisesti erotusmene-telmiä, joita tavanomaisesti käytetään mikro-organismien tuottamien aineenvaihduntatuotteiden eristämiseksi niiden viljelyliemestä. Koska pradimisiinit T1 ja T2 ovat vesi-liukoisia happamia aineita, ja niitä tuotetaan valtaosal-
 30 taan fermentointiliemessä, ne kerätään talteen edullisesti tavanomaisilla menetelmillä hydrofiilisiä happamia aineita silmälläpitäen, kuten uutto orgaanisella liuottimella, ioninvaihtohartsit, hapan saostus, partitiokromatografia ja vastaavat; joko yksinään tai yhdistelmänä. Esimerkiksi
 35 fermentoinnin täydentämisen jälkeen koko fermentointiliemi

sentrifugoidaan tai suodatetaan. Tuloksena oleva supernatantti tai suodos adsorboidaan hyvin huokoiseen polymeerihartsiin, kuten Diaion HP-20 (Mitsubishi Kasei Co.) ja eluoidaan veteen sekoittuvalla orgaanisella liuottimella, kuten metanoliasetonitriili tai aseton. Eluaatti konsentroidaan *in vacuo*. Asetonisaostus tai lyofilisointi tuotti epäpuhtaan pradimisiini T1:n ja T2:n. Puhdistusta varten epäpuhtas materiaali pannaan käänteisfaasipiihappogeeli-pylvääseen, kuten YMC-ODS A60 (Yamamura Chemical Lab.) ja eluoidaan liuoksella asetonitriili: 0,15 % fosfaattipuskuri, pH 3,5, (14,5:85,5, V/V), jolloin saadaan puhtaat pradimisiinit T1 ja T2.

Pradimisiini T1 voidaan muuttaa sen 11-O-deksylosyylijohdannaiseksi. Pradimisiini T1:n kuumentaminen emäksisessä alustassa ajan, joka on riittävä ksylosyyli-ryhmän pilkkomiseksi 11-O-asemassa, tarjoaa vastaavan 11-O-deksylosyylijohdannaisen. Käytetty liuotin voi olla esimerkiksi dioksaani, tetrahydrofuraani, vesi, alempi alkanoli tai näiden seokset, emäksinen hydroksidi voi olla esimerkiksi natriumhydroksidi, kaliumkarbonaatti, litiumhydroksidi. Lämpötila voi olla välillä noin 60 °C - 100 °C, tai liuottimen palautusjäähdytyslämpötila. Reaktioaika voi olla noin 1 - 10 tuntia ja riippuu käytettävistä reaktio-olosuhteista.

25 Ymppiviljelmä

Aktinomykeettikantaa AA 3798 kasvatettiin YSM-vinoagarilla, joka oli 1-prosenttinen liukoisen tärkkelyksen suhteen, 0,1-prosenttinen hiivauutteen suhteen (Difco laboratories), 0,1-prosenttinen "soytone":n suhteen (Difco Laboratories), 0,05-prosenttinen $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$:n suhteen ja 1,6-prosenttinen agarin suhteen, 32 °C:n lämpötilassa 20 päivän ajan. Osa kypsästä vinoagarista ympättiin 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joka sisälsi 100 ml elatusainetta V15-1, joka oli 1,5-prosenttinen glukosin suhteen, 0,2-prosenttinen peptonin suhteen (Daigo Eiyo Co.), 0,2-prosent-

tinen "NZ-case":n suhteen (Scheffield Products), 1,0-prosentsittinen lihauutteen suhteen (Mikuni Kogyo Co.), 0,2-prosentsittinen NaNO_3 :n suhteen, 0,1-prosentsittinen K_2HPO_4 :n suhteen, 0,05-prosentsittinen $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:n suhteen ja 0,05-prosentsittinen $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:n suhteen, inkuboitiin sitten 32 °C:n lämpötilassa viiden päivän ajan pyörivällä ravistelijalla, jonka pyörintänopeus oli 200 rpm. Tuloksena olevat vegetatiiviset myseelit pestiin ja resuspendoitiin puoleen tilavuuteen glyserolin 20-prosentsittista vesiliuosta ja varastoitiin sitten -80 °C:n lämpötilaan. Ymppiviljelmä pullofermentointia varten valmistettiin ymppäämällä 1 ml pakastettua vegetatiivista myseeliä 100 ml:aan elatusainetta V15-1 500 ml:n Erlenmeyer-pullossa ja ravistellen neljä päivää 32 °C:n lämpötilassa.

15 Pullofermentointi

Kukin ymppiviljelmän 5 ml:n osa, kuten edellä mainitussa ymppiviljelmän esimerkissä esitettiin, siirrettiin 500 ml:n Erlenmeyer-pulloihin, jotka sisälsivät tuottoalustan 84B, joka oli 3-prosentsittinen soijapapujauhon suhteen (Nikko Seiyu Co.), 0,5-prosentsittinen Pharmamedian suhteen (Trader's Protein), 3-prosentsittinen glukoosin suhteen, 0,1-prosentsittinen hiivauutteen suhteen (Oriental Yeast Co.) ja 0,3-prosentsittinen CaCO_3 :n suhteen. pH säädettiin 7,0:aan ennen autoklavointia. Fermentointi suoritettiin pyörivällä ravistelijalla, joka toimi 200 rpm:n nopeudella, 12 päivän ajan 28 °C:n lämpötilassa. Antibioottien tuotantoa tarkkailtiin mittaamalla näkyvä absorptio 500 nm:n aallonpituudella liuoksessa 0,02 N NaOH:MeOH (1:1). Pradimisiini T1:n ja T2:n kvantitatiivista analyysiä varten supernatantti laimennettiin kymmenenkertaisesti dimetyylisulfoksidilla ja suodatettiin (Ekicrodisc 13CR, huokoskoko 0,45 μm , Gelman Science Japan, Ltd.), ja suodos (10 μm) analysoitiin HPLC:llä Excel pak SIL-C185R:llä (Yokogawa Electronic Co., Ltd) eluoiden liuoksella asetonitriili: 0,15-prosentsittinen fosfaattipuskuri, pH 3,5 (19:81) virtausno-

peudella 1 ml/min 460 nm:n detektiolla. Pradimisiini T1:n ja T2:n kokonaistiitteriksi tuli noin 900 µg 12 päivän fermentoinnin jälkeen (pradimisiini T1: 680 µg/ml, pradimisiini T2: 230 µg/ml).

5 Vaihtoehtoinen pullofermentointi

Kukin ymppiviljelmän 5 ml:n osa, kuten edellä mainitussa ymppiviljelmän esimerkissä esitettiin, siirrettiin 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joka sisälsi 100 ml tuotantoalustaa nimeltään FR-22, joka oli 3-prosenttinen rasvattoman soijapapujauhon suhteen, 3-prosenttinen glukosin suhteen, 0,2-prosenttinen D-asparagiinihapon suhteen ja 0,3-prosenttinen CaCO₃:n suhteen (pH säädettiin arvoon 7,0 ennen autoklavointia). Fermentointi suoritettiin pyörivällä ravistelijalla 28 °C:n lämpötilassa kahdeksan päivän ajan, jonka aikana antibiootin tuotannoksi tuli noin 1400 µg/ml (pradimisiini T1: 820 µg/ml, pradimisiini T2: 520 µg/ml).

Pradimisiinien T1 ja T2 eristys

Fermentointilientä, joka oli kohdan "Pullofermentointi" mukainen, sentrifugoitiin nopeudella 3 000 rpm 20 minuutin ajan. Supernatantti (3,5 l) adsorboitiin Diaion HP-20 -pylvääseen (2,2 l). Hartsia eluoitiin metanolin 40-prosenttisella vesiliuoksella (5,3 l), sen jälkeen kun oli pesty vedellä (7 l) ja 20-prosenttisella metanolin vesiliuoksella (5 l). Eluaatti konsentroitiin in vacuo ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin aikaan epäpuhtas kiinteä aine (5,9 g). Tämä kiinteä aine (4,9 g) liuotettiin veteen (2 l), pH säädettiin arvoon 2,0 1-normaalisisällä HCl:llä ja tuote uutettiin n-butanolilla (2 l). Orgaaninen kerros uutettiin uudelleen emäksisellä vedellä (pH 8,5, 0,6 l) ja vesikerros konsentroitiin sen jälkeen kun pH oli säädetty arvoon 7,0. Vesijäännös (0,2 l) lisättiin tipoitain asetoniin (1,8 l) ja tuloksena oleva tummanpunainen jauhe (2,5 g) kerättiin suodattamalla. Tämä jauhe (2,4 g) liuotettiin seokseen asetoni- ja fosfaattipuskuri, pH 3,5, (14,5:85,5, 240 ml) ja alistettiin sitten kromato-

5 grafiaan YMC-geelipylväässä ODS-A60 (10 l), joka oli tasapainotettu samalla liuottimella. Eluaatteja, joissa oli sama liuotin, tarkkailtiin HPLC:llä (pylväs: YMC A30, 4,5 mm ID x 100 mm, 3 µm, Yamamura Chemical Lab., liikkuva faasi: asetonitriili: 0,15 % fosfaattipuskuri, pH 3,5 (19:81). Fraktiot, jotka sisälsivät joko pradimisiini T1:n tai pradimisiini T2:n, kerättiin yhteen, konsentroitiin ja sitten suola poistettiin, jolloin saatiin puhdas pradimisiini T1 (293 mg) ja pradimisiini T2 (79 mg).

10 11-O-deksylosyylipradimisiini T1:n valmistus

Pradimisiini T1:n (500 mg) liuos 80 ml:ssa 1-normaalista natriumhydroksidia kuumennettiin 65 °C:n lämpötilaan seitsemäksi tunniksi. Reaktioseos jäähdytettiin, pH säädettiin arvoon 3,0 6-normaalisella HCl:llä ja muodostunut kiinteä aine kerättiin sentrifugoimalla (3 000 rpm). Kiinteä aine ladattiin YMC-geeli ODS-A60 -pylvääseen (1 350 ml) ja eluoitiin liuoksella CH₃CN: 0,15 % fosfaattipuskuri, pH 7,0 (7:93, 15 l). Fraktiot, jotka sisälsivät 11-O-deksylosyylipradimisiini T1:n, yhdistettiin, konsentroitiin *in vacuo* ja vietiin lyhyen Diaion HP-20 -pylvään läpi. Pylväs pestiin vedellä ja eluoitiin 60-prosenttisella asetonin vesiliuoksella (500 ml). Eluaatin konsentroidi *in vacuo* ja lyofilisointi vedestä tuotti tummanpunaisen jauheen (294 mg, 68 %).

25 Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

Pradimisiini T1:n ja T2:n ja 11-O-deksylosyylipradimisiini T1:n fysikaalis-kemialliset ominaisuudet esitetään yhteenvetona taulukossa 4.

Taulukko VIII			
Pradimisiini T1 ja T2:n 11-O-deksylosyyliipradimisiini T1:n kemialliset ominaisuudet			
	Pradimisiini T1	Pradimisiini T2	11-O-deksyloosi-paradimisiini T1
Ulkonäkö:	Tummanpunainen amorfinen	Tummanpunainen amorfinen	Tummanpunainen amorfinen
Sulamispiste (haj.)	190-195°C	185-190°C	200-210°C
$[\alpha]_D^{30}$ (c 0.05, 0.1N HCl):			
FAB-MS (m/z):	932(M + H) ⁺	800(M + H) ⁺	800(M + H) ⁺
Molekyylipaino:	C ₄₂ H ₄₅ NO ₂₃	C ₃₇ H ₃₇ NO ₁₉	C ₃₇ H ₃₇ NO ₁₉
UV $\lambda_{\max}$ nm (ε)			
0,02-normaalissa NaOH-MeOH:ssa (1:1)	243(33,600) 316(14,000) 500(14,200)	242(29,500) 316(12,200) 499(12,200)	246(32,500) 308(21,300) 505(15,300)
0,02-normaalissa HCl-MeOH:ssa (1:1)	232(33,100) 290(25,300) 457(11,000)	233(29,600) 290(22,600) 456(9,800)	232(28,500) 299(23,400) 459(8,800)
MeOH-H ₂ O:ssa (1:1)	224(30,400) 274(25,100) 493(10,100)	220(27,800) 274(23,500) 501(9,800)	230(31,800) 288(23,800) 477(9,500)
Liukoisuus liuottimessa:			
Liukoinen:	Dimetyylisulfoksidi, N,N-dimetyyliformamidi ja emäksinen vesi jne.		

Taulukko VIII (jatkoa)			
Pradimisiini T1:n ja T2:n 11-O-deksylosyyli- pradimisiini T1:n fysikaalis-kemialliset			
Hieman liukoinen:	Etanoli, metanoli ja asetoni jne.		
Liukenematon	Bentseeni, kloroformi		
TLC (SiO ₂), Rf:			
n-BuOH-AcOH-H ₂ O=2:1:1	0.48	0.50	0.70
n-BuOH-AcOH-pyridiini-H ₂ O=, 6:1:4:3	0.28	0.38	0.57
HPLC Rt (minuuttia) (COS, CH ₃ CN-0.15% KH ₂ PO ₄ , pH 7.0 = 12:88 v/v)	7.5	4.1	11.0

Biologiset ominaisuudet

Pradimisiini T1:n ja T2:n ja 11-O-deksylosyyli-
pradimisiini T1:n sieniä tappavat aktiivisuudet *in vitro* mää-
ritettiin agarlaimennosmenetelmällä hiivamorfologia-aga-
rilla, joka oli 1/15-molaarinen fosfaattipuskurin suhteen
(pH 7,0). MIC:t yksilöllisille isolaateille esitetään tau-
lukossa IX.

Taulukko IX Sieniä tappava aktiivisuus <i>in vitro</i>		
Koe organismi	MIC (µg/ml)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Pradimisiini T1	3.1
	Pradimisiini T2	0.8
	11-O-deksylosyy- li- pradimisiini T1	3.1
	A-foterisiini B	0.4
	Ketikonatsol	50
<i>Candida albicans</i> A9540	Pradimisiini T1	6.3
	Pradimisiini T2	3.1
	11-O-deksylosyy- li- pradimisiini T1	6.3
	Amfoterisiini B	0.4
	Ketokonatsol	50

Taulukko IX (jako) sieniä tappava aktiivisuus in vitro		
Koe organismi	Yhdiste	MIC(μ g/ml)
5 <i>Candida albicans</i> ATCC 38247	Pradimisiini T1	1.6
	Pradimisiini T2	1.6
	11-O-deksylosyy-lipradimisiini T1	3.1
	Amfoterisiini B	3.1
	Ketokonatsoli	25
10 <i>Candida albicans</i> ATCC 32354 (8311)	Pradimisiini T1	6.3
	Pradimisiini T2	3.1
	11-O-deksylosyy-lipradimisiini T1	3.1
	Amfoterisiini B	0.4
	Ketokonatsoli	50
15 <i>Candida albicans</i> 83-2-14 (Juntendo)	Pradimisiini T1	6.3
	Pradimisiini T2	3.1
	11-O-deksylosyy-lipradimisiini T1	3.1
	Amfoterisiini B	0.4
	Ketokonatsoli	12.5
20 <i>Candida tropicalis</i> 85-8 (Kitasato)	Pradimisiini T1	25
	Pradimisiini T2	6.3
	11-O-deksylosyy-lipradimisiini T1	12.5
	Amfoterisiini B	0.8
	Ketokonatsoli	100
25 <i>Candida tropicalis</i> IFO 10241	Pradimisiini T1	12.5
	Pradimisiini T2	6.3
	11-O-deksylosyy-lipradimisiini T1	12.5
	Amfoterisiini B	0.8
	Ketokonatsoli	50
30 <i>Cryptococcus neoformans</i> D49	Pradimisiini T1	3.1
	Pradimisiini T2	6.3
	11-O-deksylosyy-lipradimisiini T1	6.3
	Amfoterisiini B	0.4
	Ketokonatsoli	0.8
35		

Taulukko IX (jatkoa) sieniä tappava aktiivisuus in vitro		
Koe organismi	Yhdiste	MIC(μ g/ml)
<i>Cryptococcus neoformans</i> IAM 4514	Pradimisiini T1	3.1
	Pradimisiini T2	6.3
	11-O-deksylosyy- lipradimisiini T1	6.3
	Amfoterisiini B	0.4
	Ketokonatsoli	0.4
<i>Aspergillus fumigatus</i> IAM 2034	Pradimisiini T1	6.3
	Pradimisiini T2	>100
	11-O-deksylosyy- lipradimisiini T1	25
	Amfoterisiini B	0.8
	Ketokonatsoli	3.1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 4329	Pradimisiini T1	6.3
	Pradimisiini T2	50
	11-O-deksylosyy- lipradimisiini T1	12.5
	Amfoterisiini B	0.8
	Ketokonatsoli	0.8

Alusta: Hiivan morfologia-agar + 1/15M fosfaatti-
busser (pH 7,0)

Ympä: 10^6 solua/ml (paitsi T. mentagrophthtes: 10^7
solua/mg)

Inkubatio-olosuhteet: 28 °C 40 tuntia (60 tuntia T.
mentagrophthtes).

Pradimisiinit T1 ja T2 arvioitiin silmälläpitäen in
vivo -aktiivisuutta *Candida albicans* A9540:n systeemistä
infektiota vastaan urospuolisissa ICR-hiirissä (ruumiin-
paino 20 - 24 g), kuten ovat kuvanneet Oki ym. artikkelis-
sa "Water-soluble pradimicin derivatives, synthesis and
antifungal evaluation of N,N,-dimethyl pradimicins", *J.*
Antibiotics 43:1 230 - 1 235, 1990. Kullakin annostasolla
viisi hiirtä altistettiin laskimonsisäisesti suolaan sus-

pendoidulle patogeeniannokselle, joka oli kymmenkertainen 50-prosenttisesti tappavaan annokseen verraten. Antibiootit annettiin kerta-annoksena laskimonsisäisesti heti sienelle altistuksen jälkeen. Infektoidut kontrollieläimet (n=10) kuolivat 7 - 12 päivässä. 50-prosenttinen suojaava annos (PD_{50}) laskettiin selviytyneiden määrästä 20 päivää sieni-infektion jälkeen. Pradimisiini T1:n ja T2:n akuuttitoksisuus määritettiin hiirissä yksittäisen laskimonsisäisen annoksen jälkeen. Pradimisiini T1:n ja T2:n PD_{50} ja LD_{50} esitetään taulukossa X.

Taulukko X in vitro -aktiivisuus systeemistä C. Albicnas A9540- infektiota vastaan hiirissä		
Yhdiste	PD_{50} (mg/kg)	LD_{50} (mg/kg)
Pradimisiini T1	27	300
Pradimisiini T2	>50	>600
Anfoterisiini B	0.2	4.5
Ketokonatsol	>50	NT

NT: Ei testattu

Koostumukset

Koostumukset, jotka käyttävät yhtä tai useampaa keksinnön mukaista yhdistettä ja/tai niiden happo- tai emäsadditiosuoloja, voivat sisältää soveliaita määriä farmaseuttisesti soveliaita apuaineita.

"Happo- tai emäsadditiosuoloilla" hakijat tarkoittavat yhdisteitä tai komplekseja, joita muodostuu kun kyseessä olevat yhdisteet saatetaan kontaktiin sellaisten happamien tai emäksisten reagenssien kanssa, joita käytetään tavallisesti terapeuttisten aineiden biologisesti saatavilla olevien muotojen hankkimiseksi. Soveliaisiin reagensseihin kuuluvat suolahappo ja oksaalihappo, natriumhydroksidi, kaliumhydroksidi, litiumhydroksidi, natriumkarbonaatti ja vastaavat.

Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat yleensä läsnä formulaatioina, joissa on noin 0,001 - 99,99 % yhtä tai useampaa apuainetta, formulaatioina jotka on määrää antaa suun kautta, posken kautta, nenän kautta, paikallisina tai parenteraalisina annosmuotoina. Parenteraaliset annosmuodot ovat edullisia. Hyödyllisiin apuaineisiin kuuluvat kantajat, väriaineet, hajusteet, virtauksen säätöaineet, stabiloiijat ja vastaavat. Lääkkeen pitoisuus formulaatioissa, tavallisesti 50 - noin 90 painoprosenttia edullisia määriä terapeuttisia aineita, vaihtelevat välillä noin 5 mg - 100 mg potilaan tai isännän painokiloa kohti. Sovellaisiin "potilaisiin" tai "isäntiin" kuuluvat nisäkkäät, edullisesti ihmiset, ja monet muut organismit.

Esimerkkejä

Seuraavat esimerkit auttavat havainnollistamaan keksintöä.

Esimerkki 1

11-O-demetyylipradimisiini A(I_A) ja 11-O-demetyylipradimisiini B (I_B)

Pradimisiini A:n (420 mg, 0,5 mmol) ja vedettömän litiumjodidin (1,34 g, 10 mmol) seosta kollidiinissa (50 ml) palautusjäähdytettiin 2 tuntia sekoittaen ja jäähdytettiin sitten. Seos laimennettiin eetterillä (200 ml) ja suodatettiin. Kiinteä aine liuotettiin veteen (100 ml) ja liuos happamoitettiin 1 N HCl:llä ja ladattiin (1 000 ml:n) HP-20-pylvääseen, joka pestiin fosfaattipuskurilla (pH 3,5) ja eluoitiin sitten asetonitriilin 50-prosenttisella vesiliuoksella. Halutut tuotteet sisältävät fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin, jotta saatiin poistettua suurin osa asetonitriilistä. Konsentraatti ladattiin käänteisfaasipylvääseen (Prep C₁₈, 55 - 105 µm, Waters, 400 ml), joka pestiin fosfaattipuskurissa, joka oli 10-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5), ja eluoitiin sitten fosfaattipuskurissa, joka oli 25- ja 30-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5). Epäpuhtaista

fraktioista, jotka sisälsivät I_A :n ja I_B :n seoksen, poistettiin suola C_{18} -pylväskromatografialla ja kylmäkuivatettiin, jolloin saatiin 100 mg seosta, joka puhdistettiin preparatiivisella HPLC-pylväällä (Nihon seimitsu NC-20250, ODS 5 μ , 20 x 250 mm), ajoliuoksena fosfaattipuskuri, joka oli 27,5-prosenttinen asetonitriilin suhteen, pH 3,5. Ensimmäiset fraktiot, joissa näkyi retentioaika 4,1 min [25-prosenttinen asetonitriili - puskuri (pH 3,5)], yhdistettiin, konsentroidtiin, suola poistettiin ja kylmäkuivatettiin, jolloin saatiin 29 mg 11-O-demetyylipradimisiini A:ta (I_A). Toiset fraktiot antoivat 40 mg I_A :n ja I_B :n seosta. Kolmannet fraktiot (retentioaika 4,5 min) puhdistettiin samanlaisella menetelmällä, jolloin saatiin 12 mg 11-O-demetyylipradimisiinia B (I_B). Toiset fraktiot (40 mg) puhdistettiin uudestaan preparatiivisella HPLC:llä käyttäen samaa pylvästä ja liuotinta, jolloin saatiin vielä 10 mg I_A :ta ja 5 mg I_B :tä. I_A :n ja I_B :n kokonaissaanto oli 39 mg (9,4 %) ja vastaavasti 17 mg (5 %).

Yhdiste I_A : Sp > 200 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} 1720, 1610; UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 502(15500); ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,27(3H, d, J=6,8 Hz, 5'-Me), 1,34(3H, d, J=7,3 Hz, 17-Me), 2,30(3H, s, 3-Me), 2,65(3H, s, N-Me), 3,12 (1H, t, J=11,1 Hz, 5''-H_{aks}), 3,14(1H, dd, J=8,1 & 6,8 Hz, 2''-H), 3,16(1H, dd, J=9,0 & 8,1 Hz, 3''-H), 3,32(1H, m, 4''-H), 3,43-(1H, m, 4'-H), 3,75(1H, dd, J=11,1 & 5,1 Hz, 5''-H_{ekv}), 3,90-(1H, q, J=6,8 Hz, 5'-H), 3,95(1H, dd, J=9,4 & 5,1 Hz, 3'-H), 4,40(1H, q, J=7,3 Hz, 17-H), 4,46(1H, d, J=6,8 Hz, 1''-H), 4,53(2H, s, 5 & 6-H), 4,79(1H, d, J=8,1 Hz, 1'-H), 6,55(1H, lev s, 10-H), 6,95(1H, s, 4-H), 7,14(1H, lev s, 12-H), 7,79(1H, s, 7-H); FAB(+)-MS m/z 827 (M+H).

Yhdiste I_B : Sp > 200 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} 1720, 1600; UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 501(11500); ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,27(3H, d, J=6,8 Hz, 5'-Me), 1,34(3H, d, J=7,3 Hz, 17-Me), 2,32(3H, s, 3-Me), 2,70(3H, s, N-Me), 3,75(1H, m, 3'-H), 3,88(1H, q, J=6,8 Hz, 5'-H), 4,40(1H, q,

J=7,3 Hz, 17-H), 4,55(2H, m, 5 & 6-H), 4,70(1H, d, J=6,4 Hz, 1'-H), 6,69(1H, d, J=2,6 Hz, 10-H), 7,14(1H, lev s, 4-H), 7,25(1H, d, J=2,6 Hz, 12-H), 8,03(1H, lev s, 7-H), FAB(+)-MS m/z 695 (M+H), 717(M+Na).

5

Esimerkki 2

11-O-demetyylipradimisiini C (I_c)

Pradimisiini C:n (168 mg, 0,2 mmol), vedettömän litiumjodidin (1,34 g, 10 mmol) ja 4 Å:n molekyyliseulojen (168 mg) seosta kollidiinissa (20 ml) palautusjäähdytettiin 4 tunnin ajan sekoittaen ja jäähdytettiin. Seos laimennettiin eetterillä (50 ml) ja suodatettiin. Kiinteä aine liuotettiin veteen (50 ml) ja liuos happamoitettiin N HCl:llä ja ladattiin (200 ml:n) HP-20-pylvääseen, joka pestiin fosfaattipuskurilla (pH 3,5) ja eluoitiin sitten 50-prosenttisella asetonitriilin vesiliuoksella. Fraktiot, jotka sisälsivät halutun tuotteen, yhdistettiin ja konsentroitiin, jotta saatiin poistettua suurin osa asetonitriilistä. Konsentraatti ladattiin käänteisfaasipylvääseen (Prep C_{18} , 55 - 105 μ m, Waters, 80 ml), joka pestiin fosfaattipuskurissa, joka oli 10-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5) ja eluoitiin sitten fosfaattipuskurissa, joka oli 25-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5). Halutuista fraktioista poistettiin suola C_{18} -pylväskromatografiassa ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 50 mg epäpuhdasta tuotetta, joka puhdistettiin preparatiivisella HPLC-pylväällä (Nihon seimitsu NC-20250, ODS 5 μ , 20 x 250 mm), eluoiden fosfaattipuskurilla, joka oli 25-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5). Haluttujen fraktioiden retentioajaksi osoittautui 3,8 min. [25-prosenttinen asetonitriili - puskuri (pH 3,5)] yhdistettiin, konsentroitiin, suola poistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste (I_c): 7 mg (4,3 %); Sp > 200 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} 1620; UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 504 (12000); ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,17(3H,d,J=6,4 Hz, 5'-Me), 1,34(3H,d, J=7,3 Hz, 17-Me), 2,32(3H,s, 3-Me),

4,40 (1H, q, J=7,3 Hz, 17-H), 4,49(1H, d, J=6,8 Hz, 1"-H),
 4,58 (2H, s, 5 & 6-H), 4,76(1H, d, J=8,1 Hz, 1'-H), 6,69
 (1H, d, J=2,1 Hz, 10-H), 7,20 (1H, lev s, 4-H), 7,26(1H,
 d, J=2,1 Hz, 12-H), 8,06(1H, lev s, 7-H); FAB(+)-MS m/z
 5 813 (M+H).

Esimerkki 3

Käyttäen samanlaisia menetelmiä kuin esimerkissä 2
 kuvatut, valmistettiin 11-O-demetyylijohtannaiset I_D - I_F
 pradiimisiini FA-1:stä, BMS-181182:sta ja vastaavasti BMS-
 10 181184:stä, ja niiden fysikaalis-kemialliset mittausravot
 esitetään jäljempänä.

11-O-demetyylipradiimisiini FA-1(I_D):

2,6 mg (7,2 %); Sp > 200 °C; IR v_{max} (KBr) cm⁻¹
 1610; UV λ_{max} (0,01 N-NaOH) nm(ε) 502 (13700); ¹H NMR(400
 15 MHz, DMSO-d₆) δ 2,25(3H,s, 3-Me), 2,42(3H,s, N-Me), 4,09-
 (1H,q, J=7,3 Hz, 17-H), 4,38(1H, d, J=7,3 Hz, 1"-H), 4,39
 (2H, s, 5 & 6H), 4,60 (1H, d, J=7,3 Hz, 1'-H), 6,41 (1H,
 lev s, 10-H), 6,91 (1H, s, 4-H), 7,08 (1H, lev s, 12-H),
 7,66(1H, s, 7-H); FAB(+)-MS m/z 843 (M+H), 865(M+Na).

11-O-demetyyli-BMS-181182 (I_E):

9 mg (5,0 %); Sp > 200 °C; IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ 1610;
 UV λ_{max} (0,01 N-NaOH) nm(ε) 504(13700); ¹H NMR(400 MHz,
 DMSO-d₆) δ 1,12(3H,d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 2,24(3H,s, 3-Me),
 2,58(6H,s, N-Me), 2,79(1H, m, 4'-H), 3,03(1H, dd, J=8,6 &
 25 7,3 Hz, 2"-H), 3,06(1H, t, J=10,7 Hz, 5"-H_{aks}), 3,14(1H, dd,
 J=9,0 & 8,6 Hz, 3"-H), 3,28(1H, m, 4"-H), 3,70 & 3,75 (1H
 kumpikin, dd, J=10,7 & 5,1 Hz, 17-CH₂), 3,97(1H, m, 17-H);
 4,35(1H, d, J=11,1 Hz, 5-H), 4,40(1H, d, J=7,3 Hz, 1"-H),
 4,41(1H, d, J=11,1 Hz, 6-H), 4,60(1H, d, J=7,7 Hz, 1'-H),
 30 6,49(1H, d, J=2,1 Hz, 10-H), 6,90(1H, s, 4-H), 7,08(1H, d,
 J=2,1 Hz, 12-H), 7,73(1H, s, 7-H); FAB(+)-MS m/z 857
 (M+H).

11-O-demetyyli-BMS-181184 (I_F):

2,9 mg (3,0 %); Sp > 200 °C; IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ 1610;
 35 UV λ_{max} (0,01 N-NaOH) mn(ε) 504 (14200); ¹H NMR (400 MHz,

DMSO- d_6) δ 1,11(3H, d, $J=6,4$ Hz, 5'-Me), 2,31 (3H, s, 3-Me), 3,07(1H, t, $J=11,1$ Hz, 5"-H_{aks}), 3,12(1H, t, $J=8,6$ Hz, 2"-H), 3,14(1H, t, $J=8,6$ Hz, 3"-H), 3,29(1H, m, 4"-H), 3,54(1H, dd, $J=9,8$ & $2,6$ Hz, 3'-H), n. 3,6 (2H, m, 4' & 5'-H), 3,70 (1H, dd, $J=11,1$ & $5,1$ Hz, 5"-H_{ekv}, 3,71 & 3,76 (1H kumpi-kin, dd, $J=11,1$ & $5,1$ Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, $J=7,3$ Hz, 1"-H), 4,45 (1H, t, $J=5,1$ Hz, 17-H), 4,44(1H, d, $J=10,3$ Hz, 5-H), 4,49 (1H, $J=10,3$ Hz, 6-H), 4,63 (1H, d, $J=7,7$ Hz, 1'-H), 6,55(1H, lev s, 10-H), 7,03(1H, s, 4-H), 7,13 (1H, lev s, 12-H), 7,86(1H, s, 7-H); FAB(+)-MS m/z 837 (M+H), 852 (M+Na).

Esimerkki 4

11-O-deksylosyyliipradimisiini T1:n metyyliesteri- (A¹)

11-O-deksylosyyliipradimisiini T1:n (300 mg, 0,375 mmol) suspensioon MeOH:ssa (30 ml) lisättiin tionyylikloridia (96 μ l, 1,32 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yli yön. Liuottimen haihdutuksen jälkeen jäännös saostettiin MeOH-eetteristä, jolloin saatiin otsikon yhdiste A¹ (316 mg, kvantitatiivinen saanto): ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,10(3H, d, $J=6,4$ Hz, 5'-Me), 2,34 (3H, s, 3-Me), 3,06(1H, t, $J=11,5$ Hz, 5"-H_{aks}), 3,11(1H, t, $J=8,6$ Hz, 2"-H), 3,13 (1H, t, $J=8,6$ Hz, 3"-H), 3,28 (1H, m, 4"-H), 3,45 (1H, m, 4'-H), 3,53 (1H, m, 3'-H), 3,59(2H, m, 2'- & 5'-H), 3,68 (3H, s, COOMe), 3,69 (1H, dd, $J=11,5$ & $5,1$ Hz, 5"-H_{ekv}, 3,99(2H, d, $J=6,4$ Hz, 17-CH₂), 4,40(1H, d, $J=6,8$ Hz, 1"-H), 4,48(1H, d, $J=10,2$ Hz, 5-H), 4,56(1H, d, 6-H), 4,63 (1H, d, $J=7,3$ Hz, 1'-H), 6,65 (1H, d, $J=2,1$ Hz, 10-H), 7,15 (1H, s, 4-H), 7,22 (1H, d, 12-H), 8,01 (1H, s, 7-H); FAB(+)-MS m/z 814(M+H).

Esimerkki 5

11-O-deksylosyyli-11-O-etyyliipradimisiini T1 (II_A)

Etyylibromidi (10 μ l, 0,14 mmol) lisättiin 11-O-deksylosyyliipradimisiini T1:n metyyliesteri A¹:n (25 mg, 0,030 mmol, katso esimerkki 4 edellä) ja K₂CO₃:n (8 mg,

0,058 mmol) seokseen DMSO:ssa (0,3 ml), ja seosta sekoi-
tettiin yli yön huoneenlämpötilassa. Seokseen lisättiin 1-
normaalinen NaOH (3 ml) ja seosta sekoitettiin yli yön
huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen kun oli tehty happamointi
5 laimealla HCl:llä, seos pantiin kromatografiaan käänteis-
faasipylväässä, joka pestiin vedellä ja eluoitiin sitten
10 - 15-prosenttisella asetonitriilin vesiliuoksella. Ha-
lutun tuotteen sisältävät fraktiot yhdistettiin, konsen-
troitiin *in vacuo* ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 13
10 mg (52 %) tuotetta II_A: Sp 200 - 210 °C (haj.); UV $\lambda_{\max}$
(0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 497 (14500); ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,12 (3H, d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 1,38(3H, t, J=7,3 Hz,
CH₂CH₃), 2,31 (3H, s, 3-Me), 3,85 (2H, d, J=6,4 Hz, 17-CH₂),
4,22 (2H, q, J=7,3 Hz, 11-O-CH₂), 4,40 (1H, d, J=6,8 Hz,
15 1"-H), 4,42 (1H, d, J=11,7 Hz, 5-H), 4,49 (1H, lev d,
J=11,7 Hz, 6-H), 4,63 (1H, d, J=7,7 Hz, 1'-H), 6,75 (1H,
d, J=2,6 Hz, 10-H), 7,00 (1H, s, 4-H), 7,16 (1H, d, J=2,6
Hz, 12-H), 7,82 (1H, s, 7-H); FAB(-)-MS m/z 827 (M).

Esimerkki 6

20 Esimerkin 4 mukaisen esterin (A¹) käsittely 1-bromi-
2-fluorietaanilla, allyylibromidilla, bentsyylibromidilla,
etyylibromiasetaatilla tai jodiasetamidilla, jota seurasi
suojan poisto ja puhdistus, kuten esimerkissä 5 kuvataan,
tuotti vastaavasti yhdisteet II_B - II_F.

25 II-O-deksylosyyli-11-O-(2-fluorietyyli)-pradimisii-
ni T1 (II_B):

10 mg (39 %); Sp 200 - 210 °C (haj.); UV $\lambda_{\max}$ (0,01
N-NaOH) nm(ϵ) 497 (14700); ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,11-
(3H, d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 2,31 (3H, s, 3-Me), 3,90 (2H, d,
30 J=6,0 Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, J=7,7 Hz, 1"-H), 4,64 (1H,
d, J=7,3 Hz, 1'-H), 4,79 (2H, dt, J=47,4 & 3,4 Hz, CH₂F),
6,76 (1H, d, J=2,6 Hz, 10-H), 6,95 (1H, s, 4-H), 7,16 (1H,
d, J=2,6 Hz, 12-H), 7,74 (1H, s, 7-H); FAB(-)-MS m/z 845
(M).

II-O-allyyli-11-O-deksylosyylipradimisiini T1 (II_c):

7 mg (28 %); Sp 220 - 230 °C (haj.); UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 497 (15200); ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,11 (3H, d, $J=6,4$ Hz, 5'-Me), 2,33 (3H, s, 3-Me), 3,91 (2H, d, $J=6,0$ Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, $J=6,8$ Hz, 1''-H), 4,45 (1H, d, $J=10,7$ Hz, 5-H), 4,54 (1H, d, $J=10,7$, 6-H), 4,63 (1H, d, $J=7,3$ Hz, 1'-H), 4,79 (2H, d, $J=5,1$ Hz, 11-OCH₂), 5,33 (1H, dd, $J=10,7$ & 1,7 Hz, vinyyliprotoni), 5,45 (1H, dd, $J=16,1$ & 1,7 Hz, vinyyliprotoni), 6,08 (1H, m, vinyyliprotoni), 6,83 (1H, lev d, 10-H), 7,03 (1H, s, 4-H), 7,24 (1H, lev d, 12-H), 7.87 (1H, s, 7-H); FAB(-)-MS m/z 839 (M).

II-O-bentsyyli-11-O-deksylosyylipradimisiini T1 (II_d):

10 mg (37 %); Sp 200 - 210 °C (haj.); UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 497 (15100); ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,11 (3H, d, $J=6,2$ Hz, 5'-Me), 2,30 (3H, s, 3-Me), 3,90 (2H, d, $J=6,4$ Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, $J=6,8$ Hz, 1''-H), 4,42 (1H, d, $J=10,3$ Hz, 5-H), 4,47 (1H, d, $J=10,3$ Hz, 6-H), 4,63 (1H, d, $J=7,3$ Hz, 1'-H), 5,25 (2H, s, 11-OCH₂), 6,82 (1H, d, $J=2,6$ Hz, 10-H), 6,97 (1H, s, 4-H), 7,23 (1H, d, $J=2,6$ Hz, 12-H), 7,3 - 7,5 (5H, m, Ph), 7,77 (1H, s, 7-H), FAB (-)-MS m/z 889 (M).

II-O-karboksimetyyli-11-O-deksylosyylipradimisiini T1 (II_e):

17 mg (66 %); Sp 210 - 220 °C (haj.); UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 497 (14800); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,11 (3H, d, $J=6,4$ Hz, 5'-Me), 2,32 (3H, s, 3-Me), 3,90 (2H, d, $J=6,0$ Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, $J=6,8$ Hz, 1''-H), 4,44 (1H, d, $J=11,1$ Hz, 5-H), 4,51 (1H, lev d, $J=11,1$ Hz, 6-H), 4,64 (1H, d, $J=8,1$ Hz, 1'-H), 4,93 (2H, s, 11-OCH₂), 6,99 (1H, d, $J=2,6$ Hz, 10-H), 7,04 (1H, s, 4-H), 7,19 (1H, d, $J=2,6$ Hz, 12-H), 7,88 (1H, s, 7-H), FAB(+)-MS m/z 858 (M).

II-O-karbamoyylimetyyli-11-O-deksylosyyli-
siini T1 (II_F):

11 mg (43 %); Sp > 230 °C (haj.); UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 496 (15100); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,11 (3H, d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 2,33 (3H, s, 3-Me), 3,90 (2H, d, J=6,0 Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, J=7,3 Hz, 1''-H), 4,46 (1H, d, J=10,3 Hz, 5-H), 4,55 (1H, lev d, J=10,3 Hz, 6-H), 4,64 (1H, d, J=7,7 Hz, 1'-H), 4,96 (2H, s, 11-OCH₂), 6,87 (1H, d, J=2,6 Hz, 10-H), 7,11 (1H, s, 4-H), 7,25 (1H, d, J=2,6 Hz, 12-H), 7,97 (1H, s, 7-H), FAB(-)-MS m/z 856 (M).

Esimerkki 7

4'-N-Cbz-11-O-demetyyli-*pradimisiini* A:n metyyliesteri (B¹) ja 4'-N-Cbz-11-O-demetyyli-*pradimisiini* B:n metyyliesteri (C¹)

I_A:n ja I_B:n seoksen (1:1, 60 mg) suspensioon kuivassa dikloorimetaanissa lisättiin trimetyylisilyylikloridia (0,1 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 10 minuutin ajan. Sitten N,O-bis(trimetyylisilyyli)asetamidi (0,4 ml) lisättiin ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 tunnin ajan. Kirkkaaseen liuokseen lisättiin karbobentsoksikloridi (0,1 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 20 tunnin ajan. Kuiviin haihduttamisen jälkeen jäännös liuotettiin MeOH:hon (6 ml). Liuokseen lisättiin 1 N HCl (3 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan ja puhdistettiin sitten käänteisfaasipylväässä eluoimalla fosfaattipuskurissa, joka oli 15 - 20 % asetonitriilin suhteen (pH 7,0). Halutut tuotteet sisältävät fraktiot kerättiin, konsentroidtiin, suola poistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 50 mg I_A:n ja I_B:n 4'-N-Cbz-johdannaisen seosta. Edellä hankittu näyte käsiteltiin tionyylikloridilla (50 μ l) MeOH:ssa (6 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 16 tunnin ajan. Kuiviin haihdutuksen jälkeen öljymäinen jäännös ajettiin kromatografiassa piihappogeelipylväässä (Wakogel C-200, 15 g), ajoliuoksena kloroformi-metanoli

(10:1 - 4:1). Kloroformi-metanolilla (10:1) eluoidut fraktiot haihdutettiin kuivaksi, jolloin saatiin 21 mg yhdistettä C¹: FAB(-)-MS m/z 842 (M). Kloroformi-metanolilla (4:1) eluoidut fraktiot yhdistettiin, haihdutettiin ja puhdistettiin käänteisfaasipylväässä eluoimalla fosfaattipuskurilla, joka oli 50 % asetonitriilin suhteen (pH 3,5). Halutut fraktiot kerättiin, konsentroitiin, suola poistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 19 mg yhdistettä B¹. FAB(-)-MS m/z 974 (M).

10 Esimerkki 8

11-demetoksisipradimisiini A (II_c)

Yhdisteen B¹ (17 mg, 0,018 mmol), N-fenyyli-trifluorimetetaanisulfonimidin (9,4 mg, 0,026 mmol) ja N,N-dimetyyliaminopyridiinin (3,2 mg, 0,026 mmol) seosta kuivassa pyridiinissä (1,7 ml) sekoitettiin huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan. Seos laimennettiin 20 ml:lla fosfaattipuskuria (pH 3,5) ja puhdistettiin käänteisfaasipylväässä eluoimalla fosfaattipuskurilla, joka oli 50- ja 60-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5). Halutut fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin, suola poistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 16 mg (82,5 %) yhdisteen B¹ 11-O-triflaattijohdannaista: FAB (+)-MS m/z 1107 (M+H), 1129 (M+Na).

Triflaatin (23 mg, 0,02 mmol) liuokseen kuivassa DMF:ssä (2 ml) lisättiin perätysten palladiumasetatti (9 mg, 0,04 mmol), trifenyylifosfiini (21 mg, 0,08 mmol), trietyyliamiini (28 µl, 0,2 mmol) ja 98-prosenttinen muuraishappo (8 µl, 0,21 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 4 tunnin ajan. Seos laimennettiin fosfaattipuskurilla (pH 3,5) ja ladattiin käänteisfaasipylvääseen, joka pestiin fosfaattipuskurilla (pH 3,5) joka oli 20- ja 30-prosenttinen asetonitriilin suhteen, ja eluointiin sitten fosfaattipuskurilla (pH 3,5) joka oli 40- ja 50-prosenttinen asetonitriilin suhteen. HPLC:llä monitoroitaessa halutut fraktiot, jotka eluoituivat fosfaatti-

puskurilla (pH 3,5), joka oli 50-prosenttinen asetonitriilin suhteen, yhdistettiin, konsentroitiin, suola poistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 14 mg (73 %) yhdisteen B¹ 11-deoksijohdannaisista: Sp > 200 °C; FAB(+)-MS m/z 959 (M+H), 981 (M+Na).

Yhdisteen B¹ 11-deoksijohdannaisen (14 mg, 0,015 mmol) ja 10-prosenttisen palladoidun hiilen (10 mg) seos MeOH:n (3 ml), veden (1 ml) ja etikkahapon (1 ml) seoksessa hydrattiin huoneenlämpötilassa 3 tunnin ajan vetyilma-kehässä. Katalysaattori poistettiin suodattamalla ja suodos ladattiin käänteisfaasipylvääseen, joka pestiin vedellä ja eluoitiin 75-prosenttisella dioksaanin vesiliuoksella. Halutut fraktiot konsentroitiin, laimennettiin MeOH:lla (5 ml) ja käsiteltiin sitten 1-normaalisella NaOH:lla (1 ml). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan, pH säädettiin arvoon 6 1 N HCl:llä ja puhdistettiin käänteisfaasipylväässä eluoimalla fosfaattipuskurilla (pH 3,5), joka oli 30-prosenttinen asetonitriilin suhteen. Halutut fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin, suola poistettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 4 mg (34 %) yhdistettä II₆: Sp > 200 °C; UV λ_{max} (0,01 N-NaOH) nm(ε) 500 (11800); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,25 (3H, d, J=6,8 Hz, 5'-Me), 1,35 (3H, d, J=7,3 Hz, 17-Me), 2,30 (3H, s, 3-Me), 2,60 (3H, s, 4'-NMe), 3,11 (1H, t, J=11,1 Hz, 5''-H_{aks}), 3,12 (1H, m, 2''-H), 3,16 (1H, t, J=9,0 Hz, 3''-H), 3,3 (1H, m, 4''-H), 3,49 (1H, m, 4'-H), 3,51 (1H, t, J=8,1 Hz, 2'-H), 3,74 (1H, dd, J=11,1 & 5,1 Hz, 5''-H_{ekv}), 3,85 (1H, m, 5'-H), 3,89 (1H, dd, J=9,8 & 4,7 Hz, 3'-H), 4,38 (1H, q, J=7,3 Hz, 17-H), 4,43 (1H, d, J=7,3 Hz, 1''-H), 4,49 (2H, s, 5 & 6-H), 4,75 (1H, d, J=8,1 Hz, 1'-H), 6,85 (1H, s, 4-H), 7,21 (1H, dd, J=8,1 & 0,9 Hz, 10-H), 7,62 (1H, dd, J=7,7 & 0,9 Hz, 12-H), 7,71 (1H, s, 7-H), 7,73 (1H, t, J=7,7 Hz, 11-H). FAB(+)-MS m/z 811 (M).

Esimerkki 9**11-demetoksiipradimisiini B (II_B)**

Samanlaisilla menetelmillä yhdisteen II_C valmistusta varten, yhdiste C¹ (17 mg) muutettiin otsikon mukaiseksi yhdisteeksi II_B: 1,5 mg (26 %); Sp >200 °C; UV λ_{max} (0,01 N-NaOH) nm(ε) 502 (10400); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,24 (3H, d, J=6,8 Hz, 5'-Me), 1,34 (3H, d, J=7,3 Hz, 17-Me), 2,27 (3H, s, 3-Me), 2,59 (3H, s, 4'-NMe), 3,68 (1H, m, 3'-H), 3,79 (1H, m, 5'-H), 4,36 (1H, q, J=7,3 Hz, 17-H), 4,43 (1H, d, J=10,3 Hz, 5-H), 4,47 (1H, d, J=10,3 Hz, 6-H), 4,64 (1H, d, J=8,1 Hz, 1'-H), 6,88 (1H, s, 4-H), 7,20 (1H, dd, J=8,1 & 0,9 Hz, 10-H), 7,62 (1H, dd, J=7,7 & 0,9 Hz, 12-H), 7,71 (1H, s, 7-H), 7,72 (1H, dd, J=8,1 & 7,7 Hz, 11-H). FAB(+)-MS m/z 679 (M+H), 701 (M+Na).

Esimerkki 10**11-O-deksylosyyli-11-O-trifluorimetaanisulfonyyli-pradimisiini T1:n metyyliesteri (D¹)**

11-O-deksylosyyliipradimisiini T1:n metyyliesterin (A¹, 157 mg, 0,193 mmol) liuokseen kuivassa pyridiinissä (8 ml) lisättiin dimetyyliaminopyridiiniä (35 mg, 0,290 mmol) ja N-fenyylitrifluorimetaanisulfonimidiä (103 mg, 0,290 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Sen jälkeen kun se oli laimennettu puskurilla (pH 3,5), seos ladattiin C₁₈-pylvääseen, joka pestiin vedellä ja eluoitiin sitten puskurilla, joka oli 40- ja 45-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5). Fraktiot, jotka sisälsivät halutun tuotteen, haihdutettiin, suola poistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin yhdiste D¹ (155 mg, 85 %): ¹H NMR (400 MHz, (DMSO-D₆) δ 1,10 (3H, d, J=6,0 Hz, 5'-Me), 2,34 (3H, s, 3-Me), 3,06 (1H, t, J=10,7 Hz, 5''-H_{aks}), 3,11 (1H, t, J=8,1 Hz, 2''-H), 3,13 (1H, t, J=8,1 Hz, 3''-H), 3,28 (1H, m, 4''-H), 3,46 (1H, m, 4'-H), 3,52 (1H, m, 3'-H), 3,60 (2H, m, 2' - & 5'-H), 3,68 (3H, s, COOMe), 3,70 (1H, dd, J=11,5 & 5,6 Hz, 5''-H_{kv}), 3,99 (2H, d, J=6,0 Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, J=6,8 Hz, 1''-H),

4,49 (1H, d, J=9,8 Hz, 5-H), 4,58 (1H, d, 6-H), 4,64 (1H, d, J=7,3 Hz, 1'-H), 7,16 (1H, s, 4-H), 7,66 (1H, d, J=2,6 Hz, 10-H), 7,73 (1H, d, 12-H), 8,03 (1H, s, 7-H); FAB (+)-MS m/z 946 (M+H).

5

Esimerkki 11

11-deksylosyylipradimisiini T1 (II₁)

Yhdisteen D¹ (43 mg, 0,046 mmol) liuokseen DMF:ssä (2 ml) lisättiin perätysten Pd (OAc)₂ (10,2 mg, 0,046 mmol), PPh₃ (24 mg, 0,091 mmol), trietyyliamiini (63,4 µl, 0,455 mmol) ja 98-prosenttinen muurahaishappo (10,3 µl, 0,273 mmol) ja koko seosta sekoitettiin huoneenlämmössä 2 tunnin ajan. Sen jälkeen kun oli laimennettu vedellä, seos ladattiin C₁₈-pylvääseen (50 ml), joka pestiin vedellä ja eluoitiin sitten puskurilla, joka oli 30-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5). Halutun tuotteen sisältävät fraktiot haihdutettiin, suola poistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukaisen yhdisteen metyyli-esteri (36 mg, kvantitatiivinen): ¹H NMR (400 MHz, (DMSO-D₆) δ 1,10 (3H, d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 2,33 (3H, s, 3-Me), 3,09 (1H, t, J=11,1 Hz, 5"-H_{aks}), 3,11 (1H, t, J=8,6 Hz, 2"-H), 3,13 (1H, t, J=8,6 Hz, 3"-H), 3,28 (1H, m, 4"-H), 3,43 (1H, m, 4'-H), 3,53 (1H, m, 3'-H), 3,68 (3H, s, COOMe), 3,70 (1H, dd, J=11,1 & 5,1 Hz, 5"-H_{ekv}), 3,99 (2H, ABq, J=16,0 Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, J=7,3 Hz, 1"-H), 4,47 (1H, d, J=11,1 Hz, 5-H), 4,55 (1H, d, 6-H), 4,64 (1H, d, J=7,3 Hz, 1'-H), 7,10 (1H, s, 4-H), 7,37 (1H, lev d, J=7,7 Hz, 10-H), 7,50 (1H, d, 7,7 Hz, 12-H), 7,81 (1H, t, 7,7 Hz, 11-H), 7,95 (1H, s, 7-H); FAB(+)-MS m/z 798 (M+H).

Edellä mainitun metyyliesterin (36 mg, 0,045 mmol) liuosta MeOH:ssa (1 ml) käsiteltiin 1 N NaOH:lla (0,1 ml) huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Liuottimen haihdutuksen jälkeen jäännös ladattiin C₁₈-pylvääseen (50 ml), joka pestiin vedellä ja eluoitiin sitten puskurilla, joka oli 13-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 7,0). Halutun tuotteen sisältävät fraktiot haihdutettiin, suola poistet-

tiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste II₁ (5 mg, 14 % D¹:stä): Sp > 230 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} 3400, 1720, 1620; UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 499 (13000); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ 1,12(3H, d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 2,28 (3H, s, 3-Me), 3,08 (1H, t, J=11,1 Hz, 5"-H_{aks}), 3,10 (1H, t, J=9,0 Hz, 2"-H), 3,15 (1H, t, J=9,0 Hz, 3"-H), 3,29 (1H, m, 4"-H), 3,55 (1H, m, 3'-H), 3,61 (1H, q, J=6,4 Hz, 5'-H), 3,70 (1H, dd, J=11,1 & 5,5 Hz, 5"-H_{ekv}), 3,71 (1H, t, J=7,7 Hz, 2'-H), 3,86 & 3,91 (2H, ABq, J=17,1 Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, J=10,7 Hz, 5-H), 4,41 (1H, d, J=8,1 Hz, 1"-H), 4,45 (1H, d, 6-H), 4,64 (1H, d, J=7,7 Hz, 1'-H), 6,96 (1H, s, 4-H), 7,21 (1H, d, J=8,1 Hz, 10-H), 7,61 (1H, d, J=7,7 Hz, 12-H), 7,71 (1H, dd, 7,7 & 8,1 Hz, 11-H), 7,76 (1H, s, 7-H); FAB(+)-MS m/z 806 (M+Na).

15 Esimerkki 12

11-deksylosyylioksi-11-dimetyyliaminopradimisiini T1 (II₂)

Yhdisteen D¹ (19 mg, 0,020 mmol) liuokseen DMF:ssä (1,0 ml) lisättiin 2-molaarinen dimetyyliamiinin liuos EtOAc:ssä [0,4 ml; valmistettu Me₂NH-HCl:stä (164 mg, 2,0 mmol) käsittelemällä ylimäärin NaOH:n vesiliuoksella (1 ml), jota seurasi kaasumaisen Me₂NH:n pyydystäminen ylemmään EtOAc-kerrokseen] ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yli yön. Sen jälkeen kun se oli kaadettu puskuuriin (pH 3,5), seos ladattiin C₁₈-pylvääseen, joka pestiin vedellä ja eluoiitiin sitten puskurilla, joka oli 40-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5). Soveliaat fraktiot haihdutettiin, suola poistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin otsikon mukaisen yhdisteen metyyliesteri (10 mg). Näyte MeOH:ssa (2 ml) käsiteltiin 1 N NaOH:lla (0,5 ml) huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Liuottimen haihdutuksen jälkeen jäännös ladattiin C₁₈-pylvääseen, joka pestiin vedellä ja eluoiitiin sitten puskurilla, joka oli 15-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 7,0). Halutut fraktiot haihdutettiin, suola poistettiin ja lyofilisoi-

tiin, jolloin saatiin otsikon mukainen yhdiste II_j (6 mg, 34 % D¹:stä): Sp > 230 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm⁻¹ 3400, 1730, 1600; UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 522 (12600); ¹H NMR (400 MHz, (DMSO-D₆) δ 1,12(3H, d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 2,30 (3H, s, 3-Me), 3,07 (1H, t, J=11,5 Hz, 5''-H_{aks}), 3,11(6H, s, NMe₂), 3,12(1H, t, J=9,0 Hz, 2''-H), 3,14 (1H, t, J=9,0 Hz, 3''-H), 3,70(1H, dd, J=11,5 & 5,1 Hz, 5''-H_{ekv}), 3,71 (1H, q, J=6,4 Hz, 5'-H), 3,90(2H, d, J=6,0 Hz, 17-CH₂), 4,38 (1H, d, J=10,7 Hz, 5-H), 4,41 (1H, d, J=6,8 Hz, 1''-H), 4,45 (1H, d, 6-H), 4,63 (1H, d, J=7,7 Hz, 1'-H), 6,27 (1H, lev, 10-H), 6,97 (1H, s, 4-H), 7,02 (1H, lev, 12-H), 7,76 (1H, s, 7-H); FAB(+)-MS m/z 827 (M+H).

Esimerkki 13

11-karbamoyyli (II_k ja 11-syaani(II_L)-11-deksylosyylioksi-
lioksi-
pradimisiini T1

Yhdisteen D¹ (60 mg, 0,063 mmol) liuokseen DMF:ssä (4 ml) lisättiin perätysten Pd(OAc₂) (28 mg, 0,126 mmol), PPh₃ (66 mg, 0,254 mmol) ja tributyyliitinasyanidi (200 mg, 0,64 mmol) ja koko seosta kuumennettiin 70 °C:n lämpötilassa 3 päivän ajan. Liuos laimennettiin MeOH:lla (20 ml) ja käsiteltiin 1 N NaOH:lla (5 ml) huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Liuottimen haihduttamisen jälkeen jäännös ladattiin C₁₈-pylvääseen (50 ml), joka pestiin vedellä ja eluoitiin sitten asetonitriilin 5-, 10- ja 15-prosenttisellä vesiliuoksella, jolloin saatiin haihdutuksen ja lyofilisoinnin jälkeen seuraavat kaksi fraktiota.

Fraktio 1; 5 mg (9,5 % D¹:stä) II_k:ta: Retentioaika 1,9 min [puskuri, joka on 30-prosenttinen asetonitriilin suhteen (pH 3,5)]; Sp > 230 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm⁻¹ 3400, 1720, 1620; UV $\lambda_{\max}$ (0,01 N-NaOH) nm(ϵ) 508 (11800); ¹H NMR (400 MHz, (DMSO-D₆) δ 1,11 (3H, d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 2,29 (3H, s, 3-Me), 3,07 (1H, t, J=10,7 Hz, 5''-H_{aks}), 3,10 (1H, t, J=7,3 Hz, 2''-H), 3,14 (1H, dd, J=7,3 & 9,0 Hz, 3''-H), 3,29 (1H, m, 4''-H), 3,54 (1H, dd, J=2,6 & 9,8 Hz, 3'-H), 3,59 (1H, d, J=2,6 Hz, 4'-H), 3,70 (1H, dd, J=10,7 & 5,1

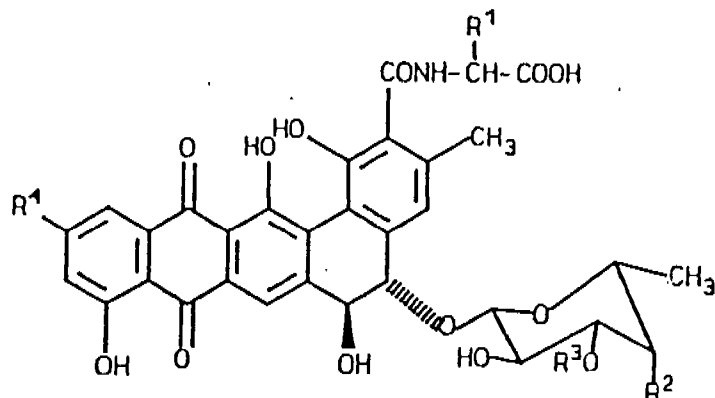
Hz, 5"-H_{ekv}, 3,71 (1H, t, J=7,7 Hz, 2'-H), 3,89 (2H, d, J=6,0 Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, J=10,3 Hz, 5-H), 4,40 (1H, d, J=7,3 Hz, 1"-H), 4,46 (1H, d, 6-H), 4,64 (1H, d, J=7,7 Hz, 1'-H), 6,95 (1H, s, 4-H), 7,20 (2H, lev s, CONH₂), 7,62 (1H, d, J=1,3 Hz, 10-H), 7,76 (1H, s, 7-H), 8,09 (1H, d, J=1,3 Hz, 12-H); FAB(+)-MS m/z 826(M).

Fraktio 2; 3 mg (5,8 % D¹:stä) II_L:ää: retentioaika 5,9 min [sama kuin edellä]; Sp > 230 °C; IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ 3400, 1720, 1620; UV λ_{max} (0,01 N-NaOH) nm(ε) 506 (13200); ¹H NMR (400 MHz, (DMSO-D₆) δ 1,11(3H, d, J=6,4 Hz, 5'-Me), 2,30(3H, s, 3-Me), 3,07 (1H, t, J=10,7 Hz, 5"-H_{aks}), 3,10 (1H, t, J=7,3 Hz, 2"-H), 3,14 (1H, dd, J=7,3 & 8,6 Hz, 3"-H), 3,29 (1H, m, 4"-H), 3,54 (1H, dd, J=3,4 & 9,8 Hz, 3'-H), 3,59 (1H, d, J=3,4 Hz, 4'-H), 3,70 (1H, dd, J=11,1 & 5,1 Hz, 5"-H_{ekv}), 3,70 (1H, t, J=7,7 Hz, 2'-H), 3,90 (2H, d, J=5,6 Hz, 17-CH₂), 4,40 (1H, d, J=7,3 Hz, 1"-H), 4,41 (1H, d, J=11,5 Hz, 5-H), 4,47 (1H, d, 6-H), 4,63 (1H, d, J=7,7 Hz, 1'-H), 6,95 (1H, s, 4-H), 7,72 (1H, d, J=1,7 Hz, 10-H), 7,74 (1H, s, 7-H), 7,87 (1H, d, J=1,7 Hz, 12-H); FAB(+)-MS m/z 809(M+H).

Järkeviä muutoksia, kuten sellaisia joita voisi tulla ammattimiehen mieleen, voidaan tässä tehdä poikkeamatta keksinnön suojapiiristä.

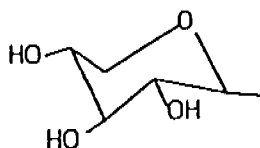
Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jolla on
kaava I:



jossa R^1 on H, CH_3 tai CH_2OH ,
 R^2 on OH tai NR^5R^6 ,

R^3 on H tai



(β -D-ksyloosi),

R^5 ja R^6 ovat H tai CH_3 ,

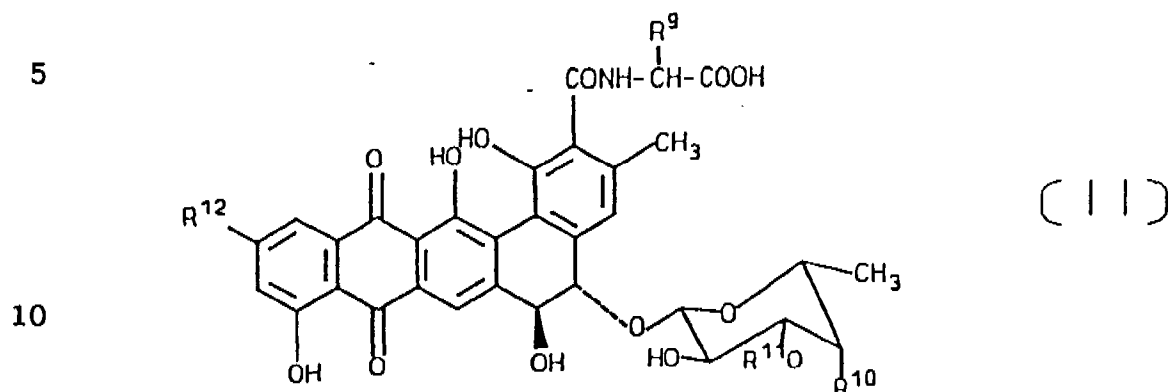
R^4 on H, OH, OR^7 , OCH_2R^8 , OSO_2CF_3 , $N(CH_3)_2$, CN, $OCONH_2$
tai CN,

R^7 on C_{2-5} -alkyyli, C_{2-5} -alkenyylit tai C_{2-5} -halogeeni-
alkyyli (halogeeni = Cl tai F), ja

R^8 on fenyyli, $COOH$ tai $CONH_2$, sillä varauksella
että kun R^4 on OH, R^1 ei ole H, tunnetaan siitä,
että 11-hydroksipradimisiini johdannaisten valmistamiseksi

(1) saatetaan 11-metoksipradisiini kosketuksiin
aryylieetterin lohkaisevan reagenssin kanssa samalla kuu-
mentaen, ja

(2) eristetään 11-hydroksituote, tai yhdisteen valmistamiseksi, jolla on rakenne II:



jossa R^9 on H tai CH_3 ,

R^{10} on OH tai $NHCH_3$,

15 R^{11} on H tai β -D-ksyloosi, ja

R^{12} on H, OC_2H_5 , OCH_2CH_2F , $OCH_2CH=CH_2$, OCH_2 fenyyli, (OCH_2Ph) , OCH_2COOH , OCH_2CONH_2 , $N(CH)_2$, $CONH_2$ tai CN ,

20 (i) saatetaan sovelias 11-hydroksipradimisiini kosketuksiin trifluorimetäänisulfonointireagenssin kanssa emäksisissä olosuhteissa,

(ii) vaiheen (i) tuote saatetaan kosketuksiin hydridi-ionin ja katalyytin kanssa,

(iii) vaiheen (ii) tuotteesta poistetaan karboksi- ja aminosuojaryhmät emäksistä hydrolyysiä käyttämällä, ja

25 (iv) eristetään kaavan II mukaiset yhdisteet.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^4 on OH.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että

30 R^1 on CH_3 , R^2 on $NHCH_3$ ja R^3 on β -D-ksyloosi; tai

R^1 on CH_3 , R^2 on $NHCH_3$ ja R^3 on H; tai

R^1 on CH_3 , R^2 on NH_2 ja R^3 on β -D-ksyloosi; tai

R^1 on CH_2OH , R^2 on $NHCH_3$ ja R^3 on β -D-ksyloosi; tai

R^1 on CH_2OH , R^2 on $N(CH_3)_2$ ja R^3 on β -D-ksyloosi; tai

35 R^1 on CH_2OH , R^2 on OH ja R^3 on β -D-ksyloosi.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheet (1) ja (2) tapahtuvat liuottimen läsnä ollessa, joka on joko kollidiini, lutidiini, dimetyyliformamidi tai näiden seokset.

5 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaihe (2) suoritetaan eluoimalla puskurilla käänteisfaasipylväässä.

10 6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^9 on H, R^{10} on OH ja R^{11} on β -D-ksyloosi.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^{12} on OCH_2H_5 , OCH_2CH_2F , $OCH_2CH=CH_2$, OCH_2 -fenyyli, OCH_2COOH , OCH_2CONH_2 , H, $N(CH_3)_2$, $CONH_2$ tai CN.

15 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^9 on CH_3 , R^{10} on $NHCH_3$ ja R^{12} on H.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^{11} on β -D-ksyloosi tai H.

20 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaihe (i) tapahtuu emäksisen orgaanisen liuottimen läsnä ollessa ja niin, että läsnä on triflatoiva määrä N-fenyyli-trifluorimetaanisulfonimidiä tai trifluorimetaanisulfonianhydridiä.

25 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen (i) mukainen tuote puhdistetaan käänteisfaasikromatografialla ennen vaihetta (ii).

30 12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa (ii) käytetty nukleofiilinen reagenssi on nukleofiilinen emäs tai trialkyyli-substituoitu metallireagenssi.

13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hydridipelkistys tapahtuu vaiheen (iii) aikana.