(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 932944 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 932944

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 7/56

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **02.01.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **24.06.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.06.1993**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **02.01.1992 PCT/EP1992/000002**

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

03.01.1991 EP 91100123

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Gruppo Lepetit S.p.A,** Via Roberto Lepetit, 8 20020 Lainate (MI), Italy, ITALIA, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Tavecchia, Paolo,** Italia, ITALIA, (IT)
2 • **Lociuro, Sergio,** Italia, ITALIA, (IT)
3 • **Ciabatti, Romeo,** Novate Milanese (Milano), ITALIA, (IT)
4 • **Selva, Enrico,** Italy, ITALIA, (IT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

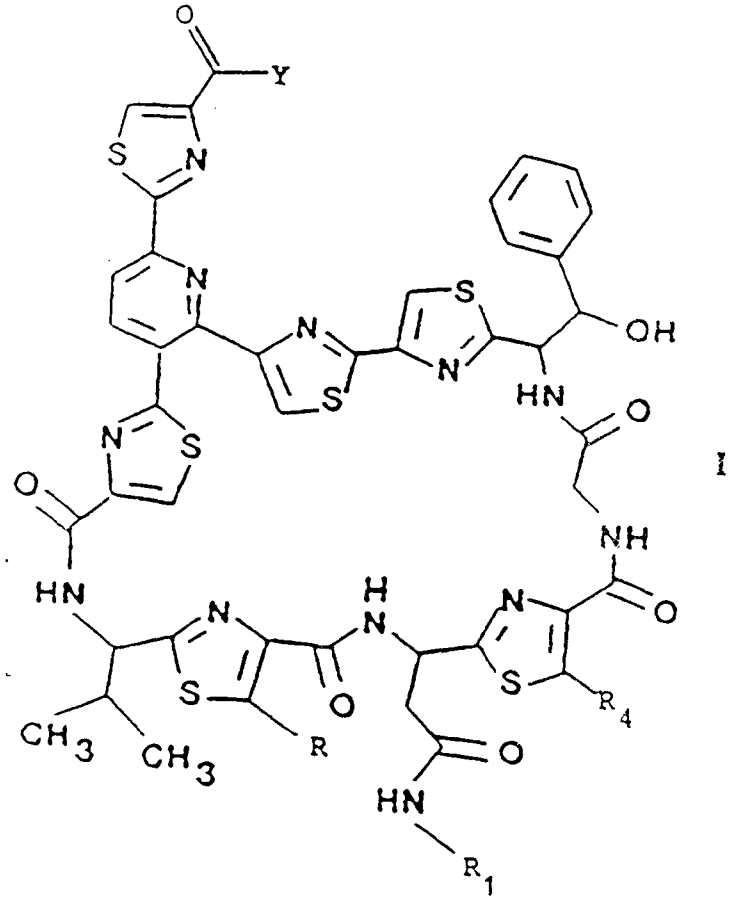
Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Antibiootin GE 2270 tekijöiden amidit

Amider av antibiot GE 2270 faktorer

Antibiootin GE 2270 tekijöiden amidit -
Amider av antibiot GE 2270 faktorer

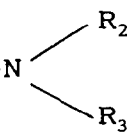
Keksintö koskee antibiootin GE 2270 uusia amidijohdannaisia, ja niiden farmaseuttisia additiosuoloja, joilla yhdisteillä on seuraava kaava I



I

jossa R tarkoittaa vetyä, hydroksimetyyliä tai metoksimetyyliä,

R_1 tarkoittaa vetyä tai metyyliä,

Y tarkoittaa kaavan  mukaista ryhmää,

jossa R_2 tarkoittaa vetyä, $(C_1\text{-}C_4)$alkyyliä, amino$(C_2\text{-}C_4)$alkyyliä, $(C_1\text{-}C_4)$alkyyliamino-$(C_1\text{-}C_4)$alkyyliä tai di$(C_1\text{-}C_4)$-

alkyyliamino-(C_1-C_4)alkyyliä,

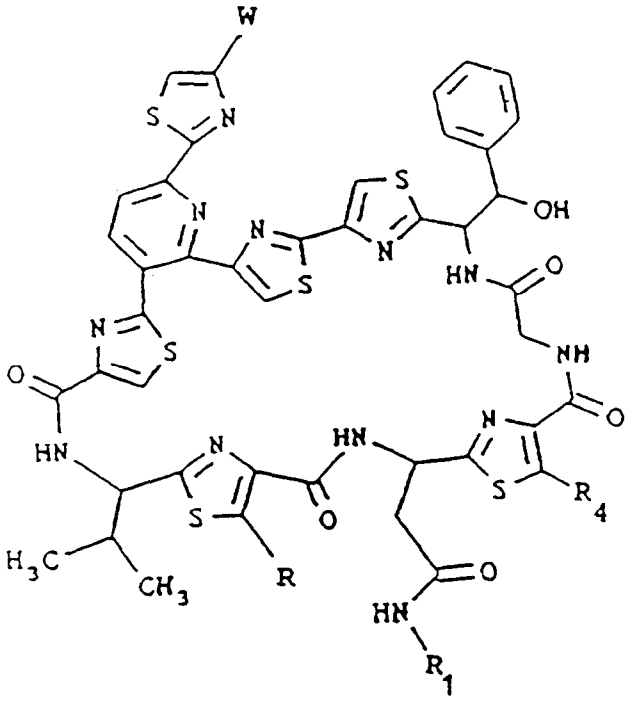
R_3 tarkoittaa vetyä, suoraa tai haarautunutta (C_1-C_{14})-alkyyliryhmää, jossa on 1-3 substituenttia, joita ovat karboksi, sulfo, fosfono, amino, joka voi mahdollisesti olla suojattu alempialkoksikarbonyyli- tai bentsyylioksikarbonyyliryhmällä, (C_1-C_4)alkyyliamino, jossa alkyyliosa voi mahdollisesti olla substituoitu karboksiryhmällä, di-(C_1-C_4)alkyyliamino, hydroksi, halo, (C_1-C_4)alkoksi, jossa alkyyliosa voi mahdollisesti olla substituoitu karboksiryhmällä, (C_1-C_4)alkoksikarbonyyli, merkapto, (C_1-C_4)alkyylitio, jossa alkyyliosa voi mahdollisesti olla substituoitu karboksiryhmällä, fenyyli, joka voi mahdollisesti olla substituoitu 1-3 substituentilla, jotka ovat karboksi, sulfo, hydroksi, halo tai merkapto, karbamyyli, (C_1-C_6)alkyylikarbamyyli, jossa alkyyliosa voi mahdollisesti olla substituoitu 1 tai 2 substituentilla, jotka ovat karboksi, amino, (C_1-C_4)alkyyliamino tai di(C_1-C_4)alkyyliamino, di(C_1-C_4)alkyylikarbamyyli, jossa alkyyliosat yhdessä viereisen typpiatomin kanssa voivat myös tarkoittaa tyydyttynyttä, 5-7-jäsenistä heterosyklistä rengasta, jonka yksi rengashiili voi mahdollisesti olla substituoitu karboksi- tai karbamyyliryhmällä ja joka voi mahdollisesti sisältää toisen heteroryhmän, joka on O, S tai N, bentsoyyliamino, jossa fenyyliryhmä voi olla substituoitu 1-3 hydroksiryhmällä, typpeä sisältävä, 5-6-jäseninen, heterosyklinen rengas, joka voi olla tyydyttymätön, osittain tyydyttynyt tai kokonaan tyydyttynyt ja joka voi sisältää 1-3 muuta heteroatomia, jotka ovat N, S tai O, jolloin yksi renkaan hiiliatomeista voi mahdollisesti sisältää karboksi-, sulfo-, karboksi(C_1-C_4)alkyyli- tai sulfo(C_1-C_4)alkyyliryhmän ja rengastyppiatomi voi mahdollisesti olla substituoitu (C_1-C_4)alkyylillä, karboksi(C_1-C_4)alkyyli, sulfo(C_1-C_4)alkyyli tai bentsyyli, (C_3-C_6)alkenyyliä, joka on mahdollisesti substituoitu karboksilla tai sulfolla, 1-deoksi-1-glusityyliä, 2-deoksi-2-glukosyyliä, täysin tyydyttynyttä, 5-7-jäsenistä, typpeä si-

sältävää heterosyklistä rengasta, jossa typpiatomi voi mahdollisesti olla substitoitu (C_1-C_4)alkyylillä tai bentsyylillä ja yksi tai kaksi rengasrakenteen hiiliatomia voi sisältää substituentin, joka on (C_1-C_4)alkyyli, karboksi tai sulfo,

tai R_2 ja R_3 yhdessä viereisen typpiatomin kanssa tarkoittavat täysin tyydyttynyttä, 5-7-jäsenistä, heterosyklistä rengasta, joka voi mahdollisesti sisältää toisen heteroatomin, joka on O, S tai N, ja jossa rengashiiliatomeissa voi mahdollisesti olla yksi tai kaksi substituenttia, jotka ovat (C_1-C_4)alkyyli, bentsyyli, karboksi, sulfo, karboksi(C_1-C_4)alkyyli tai sulfo(C_1-C_4)alkyyli,

R_4 tarkoittaa vetyä, metyyliä tai hydroksimetyyliä, sillä edellytyksellä, että kun R_4 on vety tai hydroksimetyyli, R on samanaikaisesti metoksimetyyli ja R_1 on metyyli.

Keksintö koskee myös menetelmää keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi vastaavista, kaavan II mukaisista yhdisteitä



II

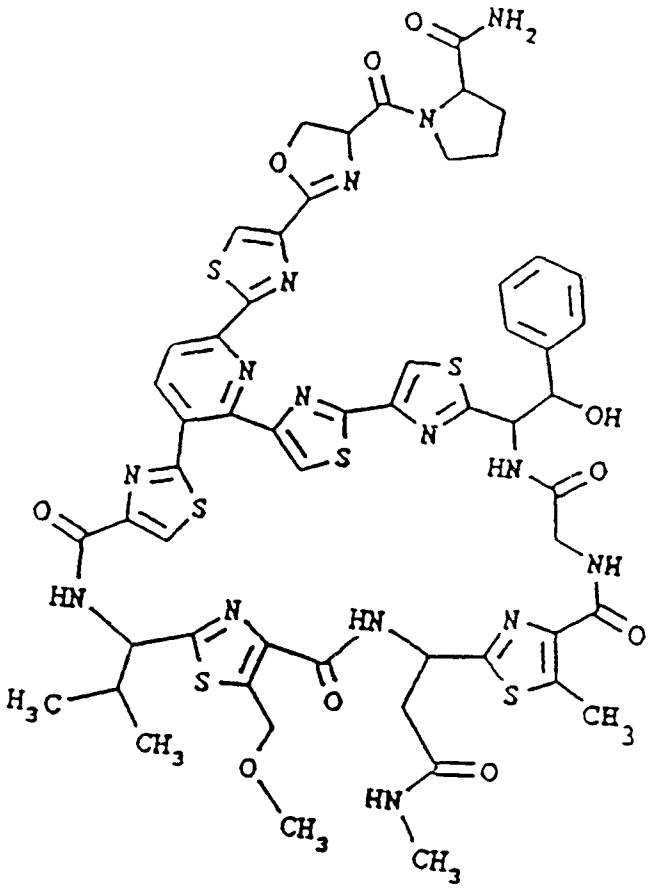
jossa kaavassa W on karboksyyliryhmä tai sen aktivoitu esteri.

Antibiootti GE 2270 valmistetaan viljelemällä *Planobispora rosea* ATCC 53773:n näytettä tai sen antibioottia tuottavaa muunnosta tai mutanttia ja haluttu antibioottinen aine eristetään myseelistä ja/tai käymisliemestä. *Planobispora rosea* ATCC 53773 eristettiin maanäytteestä ja talletettiin Budapestin sopimuksen mukaisesti 14. kesäkuuta 1988 American Type Culture Collection'iin (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 Maryland, USA. Kannalle annettiin talletusnumero ATCC 53773.

Antibioottisen GE 2270 kompleksin pääkomponentti on antibootin GE 2270 tekijä A.

Eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 359062 kuvataan antibiootin GE 2270 tekijä A ja *Planobispora rosea* ATCC 53773.

Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että antibiootin GE 2270 tekijä A voidaan esittää seuraavalla yleisellä kaavalla III



III

Kun antibiootin GE 2270 tekijä A käsitellään selektiivisissä hydrolyysiolosuhteissa, saadaan eräät johdannaiset, jotka on nimetty antibiootin GE 2270 tekijä A_1, A_2 ja A_3. Mainitut tekijät A_1, A_2 ja A_3 ja hydrolyysimenetelmä niiden valmistamiseksi on esitetty eurooppalaisessa patenttijulkaisussa nro 406745 ja US-patenttihakemuksessa nro 547,647.

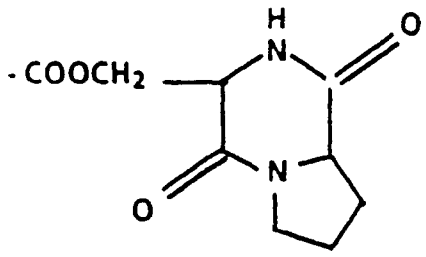
Yleisesti edellä mainituissa hydrolyyttisissä olosuhteissa käytetään puskuroitujen tai puskuroimattomien vesipitoisten happamien liuosten ja polaaristen orgaanisten liuottimien seoksia. Reaktiolämpötila vaihtelee tekijöistä, kuten käytetyn hapon voimakkuudesta ja konsentraatiosta, riippuen ja yleensä lämpötila on välillä -10 °C - 90 °C. Myös reaktioaika vaihtelee huomattavasti parametreistä, kuten lämpötilasta, hapon voimakkuudesta ja sen

konsentraatiosta, riippuen, yleensä reaktioaika voi vaihdella muutamasta minuutista useaan tuntiin.

Yleensä kun käytetään lievempiä hydrolyysiolosuhteita, esim. lyhyempää reaktioaikaa ja alhaisempaa lämpötilaa tai alhaisempaa happovoimakkuutta tai konsentraatiota, saadaan tavallisesti antibiootin GE 2270 tekijä A_1, kun taas voimakkaammat hydrolyysiolosuhteet tuottavat antibiootin GE 2270 tekijän A_2. Antibiootin GE 2270 tekijän A_3 saamiseksi tarvitaan vielä voimakkaammat hydrolyysiolosuhteet.

Kun antibiootin GE 2270 tekijöitä A_2 ja A_3 voidaan suoraan käyttää lähtöaineina tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, niin antibiootin GE 2270 tekijä A_1 ei ole sopiva lähtöaineeksi keksinnön mukaisten yhdisteiden suoraan valmistukseen, sitä voidaan kuitenkin käyttää mainittujen lähtöaineiden prekursorina, kuten jäljempänä esitetään.

Antibiootin GE 2270 tekijöille A_2 ja A_3 on tunnusomaista se, että niillä on esteri- ja vastaavasti karboksiryhmä molekyylin ylemmässä osassa. Erityisesti on havaittu, että antibiootin GE 2270 tekijä A_2 ja tekijä A_3 voidaan esittää edellä määritellyllä kaavalla II, jossa W tarkoittaa COOH- (antibiootin GE 2270 tekijä A_3) tai esteriryhmää (antibiootin GE 2270 tekijä A_2)



R on metoksimetyyli, R_1 on metyyli ja R_4 on metyyli.

Sekä antibiootin GE 2270 tekijää A_2 että tekijää A_3 (ja niiden seosta) voidaan käyttää sopivina lähtöaineina keksinnön mukaisten yhdisteiden tuottamiseksi, vaikkakin tekijä A_3 on edullisempi.

Tekijää A_2 voidaan käyttää suoraan aktivoituna esterinä tai se voidaan muuttaa tekijäksi A_3 voimakkaalla happohydrolyysillä, kuten edellä mainittiin, tai emäksisellä hydrolyysillä laimennetulla alkalilla (kuten kuvataan eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 406745 ja US-patenttihakemuksessa nro 547,647).

Äskeittäin todettiin (eurooppalainen patenttihakemusjulkaisu nro 451486 ja US-patenttihakemus nro 665,612), että *Planobispora rosea* ATCC 53773:n tai sen antibioottia GE 2270 tuottavan muunnoksen tai mutantin viljelmistä voidaan eristää muita, pienempiä komponentteja. Erityisesti näitä on löydetty myseelistä ja myös viljeltyjen mikroorganismien käymisliemistä.

Edullisessa menetelmässä, jota käytetään antibiootin GE 2270 mainittujen pienempien komponenttien talteenottamiseksi myseelistä, suodatettu tai sentrifugoitu myseeli uutetaan veteen sekoittuvalla, orgaanisella liuottimella, uutteet konsentroidaan ja raaka antibioottinen aine otetaan talteen saostamalla, mahdollisesti lisätään saostavaa ainetta, vesipitoinen jäännös uutetaan veteen sekoittumattomalla, orgaanisella liuottimella tai käytetään ad-

sorptiokromatografiaa, jolloin haluttu tuote eluoidaan absorptiomatriisista.

Aivan äskettäin havaittiin (eurooppalainen patenttihakemus nro 91114667.8), että edellä kuvatun *Planobispora rosea* ATCC 53773:n samasta viljelmästä voidaan eristää vielä pienempi komponentti (tekijä C_{2a}).

Antibiootin GE 2270 C_{2a} fysiko-kemialliset tunnusmerkit ovat seuraavat:

A) Ultraviolettiabsorptiospektrissä, joka rekisteröitiin spektrometrillä Perkin Elmer Model 320, on seuraavat absorptiomaksimit:

Liuotin	$UV_{maks.}$ (nm)
0,1 M HCl	245-250 (olka) 300-315
0,1 M KOH	245-250 (olka) 300-315
Fosfaattipuskuri, pH 7,38	245-250 (olka) 300-315
Metanoli	245-250 (olka) 300-315

B) Antibiootin GE 2270 tekijän C_{2a} ^{1}H-NMR-spektri rekisteröitiin 250 MHz:llä Bruker-spektrometrillä. Antibiootin spektrissä DMSO-d_6:ssa (heksadeuterodimetyylisulfoksidi), jossa sisäisenä standardina käytettiin TMS:ää (0,00 ppm), oli seuraavat signaaliryhmät [δ, ppm, m] (s=singletti, d=dubletti, t=tripletti, m= multipletti, Py=pyridiini, Tz=tiatsoli):

9,03,d,(NH); 8,70,d,(2NH:t); 8,60,s; 8,54,s; 8,29,s ja 7,38,s,(Tz CH:t); 8,48,m, (glysiini NH); 8,43,d ja 8,27,d,(Py CH:t); 7,35-7,20,m,(aromaaattiset CH:t ja primaarinen amidi NH); 6,98,s,(primaarinen amidi NH); 6,04,d,(OH); 5,80,t,(OH); 5,35-5,15,m,(αCH:t); 5,04,m,(fenyyliseriini βCH); 4,98,s,[$CH_2(OCH_3)$]; 4,87,d,[$CH_2(OH)$]; 4,81,m ja 4,56,m,(oksatsoliini CH_2); 4,35-3,75,m,(glysiinin CH_2 ja proliiniamidi CH:t); 3,39,s,(OCH_3); 2,71,m ja 1,30,m,(asparagiinin CH_2); 2,48,d,(N-metyyliasparagiinin NCH_3); 2,22-1,80, m,(isopropyyli CH ja proliiniamidi CH:t); 0,88 ja 0,84,d,(valiini CH_3:t).

C) Antibiootin GE 2270 tekijällä C_{2a} on retentioaika (R_t) 12,6 min ja retentioaika suhteessa antibiootin GE 2270 tekijään A (R_t 16,6 min) on 0,76, kun analysoidaan seuraavalla käänteisfaasi-HPLC-systeemillä: Kolonni: Bakerbond® C8 (5µm) 4,6x250 mm (Bakerbond® on rekisteröity nimi käänteisfaasisille oktyylisilyyli-piihappogeeli-HPLC-kolonneille, joita toimittaa J.T.Baker Research Product, Phillisburg, New Jersey 08865 USA).

Virtausnopeus: 1,8 ml/min.

Faasi A: CH_3CN:tetrahydrofuraani:40 mM $HCOONH_4$ 40:40:20.

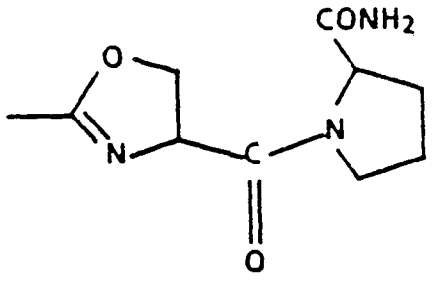
Faasi B: CH_3CN:tetrahydrofuraani:40 mM $HCOONH_4$ 10:10:80.

Eluutio: lineaarinen gradientti, jossa faasia A 20 %:sta 30 %:iin 20 minuutissa.

Detektio: UV 254 nm.

D) Antibiootin GE 2270 tekijän C_{2a} FAB-MS-pääpiikki on 1306 daltonia. Tämä vastaa todennäköisimmin protonoidun molekyyli-ionin alhaisinta isotooppia. Analyysi suoritettiin kaksoisfokusoivalla massaspektometrillä Kratos MS-50, jossa käytettiin 8 kV:n kiihdytysjännitettä ja putkikenttäatomipyssyä Xe-kaasulla ($2x10^{-5}$ torrin paine lähdeionien mukaisesti) 6 kV:n jännitteellä ja 1 mA:n virralla). FAB-MS-analyysiin käytetty antibiootti sekoitettiin tioglyserolimatriisin kanssa, joka sisälsi 0,1 M etikkahappoa.

Antibiootin GE 2270 eräitä mainittuja pienempiä komponentteja (t.s. tekijät B_1, B_2, C_1, C_2, C_{2a}, D_1, D_2 ja E) voidaan esittää edellä mainitulla yleisellä kaavalla II, jossa W tarkoittaa ryhmää



R tarkoittaa vetyä GE 2270:n tekijöissä C_1 ja D_1, metyyliä tekijässä B_2, hydroksimetyyliä tekijöissä D_2 ja E ja vastaavasti metoksimetyyliä tekijöissä B_1, C_2 ja C_{2a};

R_1 tarkoittaa vetyä GE 2270:n tekijöissä B_1, D_1 ja E ja metyyliä GE 2270:n tekijöissä B_2, C_1, C_2, C_{2a} ja D_2 ja

R_4 tarkoittaa vetyä GE 2270:n tekijässä C_2, metyyliä GE 2270:n tekijöissä B_1, B_2, C_1, D_1, D_2 ja E ja hydroksimetyyliä tekijässä C_{2a}.

Kun antibiootin GE 2270 tekijät D_1, D_2 ja E tai näiden seos käsitellään samalla hydrolyyttisellä menetelmällä, johon edellä on viitattu (ja joka on kuvattu eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 406745 ja US-patenttihakemuksessa nro 547,647) antibiootin GE 2270 tekijöiden A_2 ja A_3 valmistuksessa antibiootin GE 2270 tekijästä A, edellä esitetty yleinen ryhmä W hydrolysoidaan karboksiryhmäksi, jolloin substituentit R, R_1 ja R_4 jäävät muuttumatta.

Tästä syystä kaavan II mukaisia johdannaisia, joissa W on karboksi- tai aktivoitu esteriryhmä, R on vety, hydroksimetyyli tai metoksimetyyli, R_1 on vety tai metyyli ja R_4 on vety, metyyli tai hydroksimetyyli, sillä edellytyksellä, että kun R_4 on vety tai hydroksimetyyli, R on metoksimetyyli ja R_1 on metyyli, voidaan käyttää keksinnön mukaisena lähtöaineena. On selvää, että kuten on asianlaita muillakin mikro-organismeilla, antibioottia GE 2270 tuottavien kantojen ominaisuudet ovat alttiit muunnoksille. Esimerkiksi kannan keinotekoisia muunnoksia ja mutantteja voidaan saada käsittelemällä erilaisilla tunnetuilla mutageeneilla, joita ovat UV-säteet, röntgensäteet, suurtaajuuksiset aallot, radioaktiiviset säteet ja kemikaalit, kuten typpihapoke, N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiini ja monet muut. Kaikkia luonnollisia ja keinotekoisia muunnoksia ja mutantteja, jotka kuuluvat *Planobispora*-suvun lajeihin ja tuottavat antibioottia 2270, pidetään ekvivalentteina *Planobispora rosea* ATCC 53773-kannan kanssa tämän keksinnön tarkoituksiin.

Kun tässä selityksessä käytetään termiä "alkyyli" joko pelkästään tai yhdessä muiden substituenttien kanssa, tarkoitetaan sekä suoria että haarautuneita hiilivetyryhmiä, erityisesti "(C_1-C_{14})alkyyli" tarkoittaa suoraa tai haarautunutta, alifaattista, 1-14 hiiliatomia sisältävää hiilivetyketjua, kuten metyyliä, etyyliä, propyyliä, 1-metyylietyyliä, butyyliä, 1-metyylipropyyliä, 1,1-dime-

tyylietyyliä, pentyyliä, 1-metyylibutyyliä, 2-metyylibutyyliä, 1-heksyyliä, 2-heksyyliä, 3-heksyyliä, 3,3-dimetyyli-1-butyyliä, 4-metyyli-1-pentyyliä ja 3-metyyli-1-pentyyliä, heptyyliä, oktyyliä, nonyyliä, dekyyliä, undekyyliä, dodekyyliä, tridekyyliä ja tetradekyyliä, samalla tavoin "(C_1-C_4)alkyyli" tarkoittaa suoraa tai haarautunutta, 1 - 4 hiiliatomia sisältävää hiilivetyketjua, kuten sellaisia edellä mainittuja alkyylejä, joissa on 1 - 4 hiiliatomia.

Kuten edellä kuvattiin "(C_1-C_4)alkyyli"-osa voi sisältää 1-3 substituenttia.

Käsite "halo" tarkoittaa halogeeniatomiryhmää, joka on fluori, kloori, bromi tai jodi.

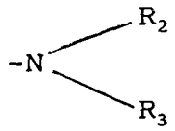
Kun tässä käytetään termiä "(C_3-C_6)alkenyyli" tarkoitetaan alkyleenitähdettä, jossa on kolmesta kuuteen hiiliatomia ja kaksoissidos, se on esimerkiksi propenyyli, 3-butenyyli, 2-butenyyli, 2-metyylipropenyyli, 2-pentenyyli, 3-heksenyyli ja jne., joka voi mahdollisesti olla substituoitu karboksi- tai sulforyhmällä.

Sanonta "typpeä sisältävä, 5-6-jäseninen heterosyklinen rengas, joka voi sisältää 1-3 muuta heteroatomia, jotka ovat N, S tai O" tarkoittaa tämän keksinnön mukaisesti tyydyttymättömiä, osittain tyydyttyneitä tai kokonaan tyydyttyneitä rengassysteemejä, kuten pyridiiniä, pyrimidiiniä, pyratsiinia, pyrrolidiinia, piperidiiniä, piperatsiinia, oksatsolia, oksatsoliinia, oksatsolidiinia, pyratsoliinia, pyratsolidiinia, tiatsolidiinia, morfoliinia, tiomorfoliinia, pyrrolia, pyrroliinia, imidatsolia, imidatsolidiinia, tiadiatsolia, oksadiatsolia ja tetratsolia.

Mainitussa "typpeä sisältävässä, 5-6-jäsenisessä heterosyklisessä renkaassa" 1-3 rengashiiliatomia voi mahdolli-

sesti sisältää ryhmän, joka on karboksi, sulfo, karboksi-(C_1-C_4)alkyyli tai sulfo(C_1-C_4)alkyyli, ja rengastyppiatomi voi mahdollisesti olla substituoitu (C_1-C_4)alkyylillä, karboksi(C_1-C_4)alkyylillä, sulfo(C_1-C_4)alkyylillä ja bentsyylillä.

Sanonta "täysin tyydyttynyt, 5-7-jäseninen, typpeä sisältävä heterosyklinen rengas, jossa typpiatomi voi mahdollisesti olla substituoitu (C_1-C_4)alkyylillä tai bentsyylillä" tarkoittaa täysin tyydyttynyttä, 5-7-jäsenistä heterosykliä, joka sisältää typpiatomin, joka voi mahdollisesti olla substituoitu (C_1-C_4)alkyylillä tai bentsyylillä, jossa hiilirunko voi mahdollisesti sisältää yhden tai kaksi substituenttia, jotka ovat (C_1-C_4)alkyyli, karboksi tai sulfo. Mainitut heterosykliset renkaat liittyvät tähteen



typpiosaan sidoksella, joka on saman typpiosan ja heterosyklisen tähteen hiiliatomin välillä. Esimerkkejä mainituista tähteistä ovat 1-metyyli-4-pyrrolidinyyli, 3-piperidinyyli, 1-etyyli-4-piperidinyyli, 1-bentsyyli-2,6-dimetyyli-4-piperidinyyli ja 4-karboksi-1-metyyli-2-piperidinyyli.

Kun R_2 ja R_3 yhdessä viereisen typpiatomin kanssa tarkoittavat "täysin tyydyttynyttä, 5-7-jäsenistä heterosyklistä rengas, joka voi mahdollisesti sisältää jonkin toisen heteroatomin, joka on O, S tai N", tämä ilmaisu tarkoittaa esimerkiksi seuraavia heterosyklisiä ryhmiä: pyrrolidino, morfolino, piperidino, piperatsino, tiomorfolino, pyratsolidino, 1,3-oksatsolidino, 1,3-tiatsolidino ja heksahydroatsepino. Kun toinen heteroatomi on N, se voi mahdollisesti sisältää substituentin, joka on (C_1-C_4)alkyyli, bentsyyli, karboksi, karboksi(C_1-C_4)alkyyli, sulfo tai sulfo(C_1-C_4)alkyyli.

Termi "1-deoksi-1-glusityyli" tarkoittaa kaavan I mukaista yhdistettä, jossa Y on glukamiinista, t.s. 1-amino-1-deoksi-glusitolista, johdettu tähde. Käsite "2-deoksi-2-glukosyyli" tarkoittaa kaavan I mukaista tähdettä, jossa Y on glukoosiamiinista, t.s. 2-amino-2-deoksiglukoosista, johdettu tähde.

Keksinnön mukaisten yhdisteiden edullisen ryhmän muodostavat kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R tarkoittaa metoksimetyyliä, R_1 ja R_4 tarkoittavat metyyliryhmää ja muut substituentit tarkoittavat samaa kuin edellä.

Edelleen edullisen ryhmän keksinnön mukaisia yhdisteitä muodostavat sellaiset kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R tarkoittaa metoksimetyyliä, R_1 ja R_4 tarkoittavat metyyliryhmää ja Y tarkoittaa kaavan  mukaista ryhmää, jossa R_2 on vety ja R_3 tarkoittaa samaa kuin edellä.

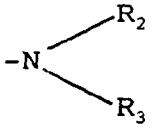
Edelleen edullisen ryhmän keksinnön mukaisia yhdisteitä muodostavat sellaiset kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R on metoksimetyyli, R_1 ja R_4 tarkoittavat metyyliryhmää ja Y on amino-osa, joka on johdettu luonnollisesta aminohaposta, kuten esimerkiksi glysiinistä, ornitiinistä, seriinistä, asparagiinihaposta, tyrosiinista, leusiinista, fenyylialaniinista, metioniinista, proliinista, treoniinista, lysiinistä, tai synteettisestä dipeptidistä, kuten glysyylilysiinistä, seryyliproliinista, glysyyliprolinamidista, tyrosyyliprolinamidista, treonyyliprolinamidista, leusyyliprolinamidista.

Edelleen edullisen ryhmän yhdisteitä muodostavat sellaiset kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R on metoksimetyyli, R_1 ja R_4 ovat metyyli, Y on ryhmä NR_2R_3, jossa R_2 on vety ja R_3 on lineaarinen alkyyliketju, jossa on mieluim-

min 3-12 hiiliatomia, vielä mieluummin 3-7 hiiliatomia, ja joka on substituoitu ryhmällä, joka on COOH, SO_3H tai PO_3H.

Kaikkein edullisin yhdiste on kaavan I mukainen yhdiste, jossa R on metoksimetyyli, R_1 ja R_4 ovat metyyli ja Y on ryhmä NR_2R_3, jossa R_2 on vety ja R_3 on $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-COOH.

Edelleen edullisen ryhmän keksinnön mukaisia yhdisteitä muodostavat kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R tarkoittaa vetyä, hydroksimetyyliä ja metoksimetyyliä, R_1 tarkoittaa vetyä tai metyyliryhmää ja Y tarkoittaa kaavan



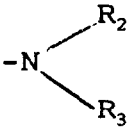
mukaista ryhmää, jossa R_2 on vety, ja R_3 ja R_4 tarkoittavat samaa kuin edellä.

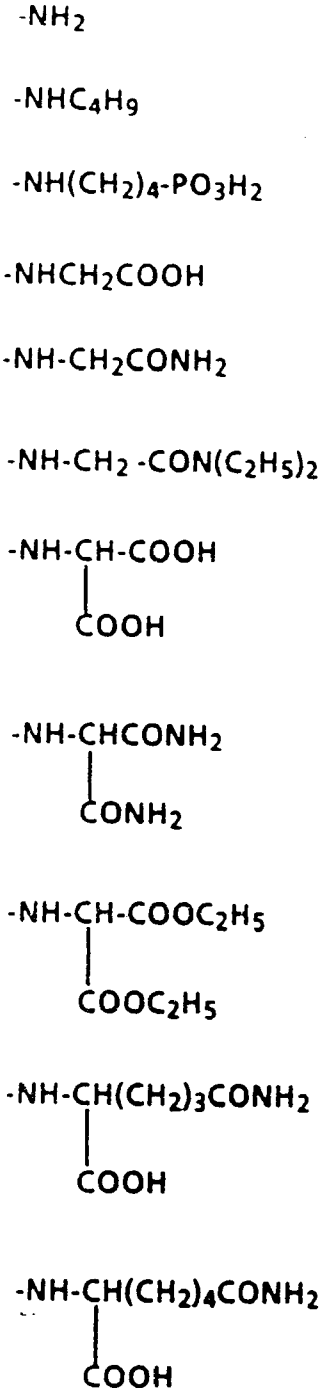
Edelleen edullisen ryhmän keksinnön mukaisia yhdisteitä muodostavat sellaiset kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R on vety, hydroksimetyyli tai metoksimetyyli, R_1 tarkoittaa vetyä tai metyyliryhmää, R_4 on vety, metyyli tai hydroksimetyyli, sillä edellytyksellä, että kun R_4 on vety tai hydroksimetyyli, R on metoksimetyyli ja R_1 on metyyli, ja Y on amino-osa, joka on johdettu luonnollisesta aminohaposta, kuten esimerkiksi glysiinistä, ornitiinista, seriinistä, asparagiinihaposta, tyrosiinista, leusiinista, fenyylialaniinista, metioniinista, proliinista, treoniinista, lysiinistä, tai synteettisestä dipeptidistä, kuten glysyylilysiinistä, seryyliproliinista, glysyyliprolinamidista, tyrosyyliprolinamidista, treonyyliprolinamidista, leusyyliprolinamidista.

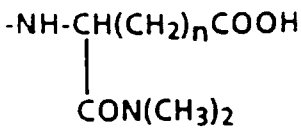
Yhdisteiden edullinen ryhmä on myös sellainen, joka sisältää sellaiset kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R on vety, hydroksimetyyli tai metoksimetyyli, R_1 on vety tai metyyli, R_4 on vety, metyyli tai hydroksimetyyli, sillä edellytyksellä, että kun R_4 on vety tai hydroksimetyyli, R

on metoksimetyyli ja R_1 on metyyli, Y on ryhmä NR_2R_3, jossa R_2 on vety ja R_3 on lineaarinen alkyyliketju, joka sisältää mieluimmin 3-12 hiiliatomia, vielä mieluummin 3-7 hiiliatomia, jotka on substituoitu ryhmällä, joka on COOH, SO_3H tai PO_3H.

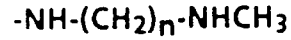
Viimeinen edullinen yhdisteryhmä on sellainen, jonka yhdisteillä on kaava I, jossa R on vety, hydroksimetyyli tai metoksimetyyli, R_1 on vety tai metyyli, R_4 tarkoittaa samaa kuin edellä ja Y on ryhmä NR_2R_3, jossa R_2 on vety ja R_3 on $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-COOH.

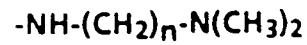
Keksinnön mukaisiin, tyypillisiin yhdisteisiin kuuluvat sellaiset kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R, R_1, R_4 ja Y tarkoittavat samaa kuin edellä ja  tarkoittaa ryhmiä:

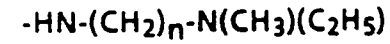




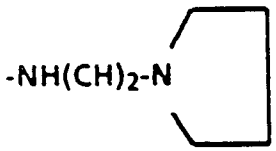
jossa n on 2, 3 tai 4

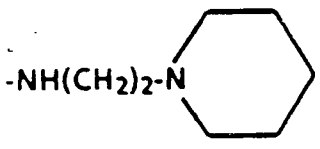


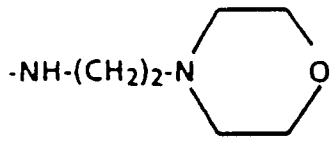


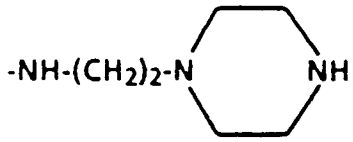


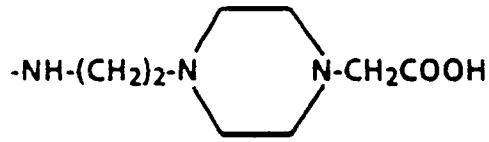
joissa n on 2, 3, 4, 5, 6, 7 tai 8

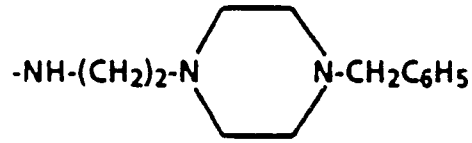


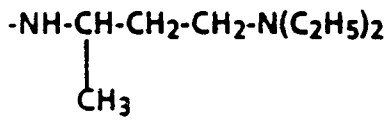


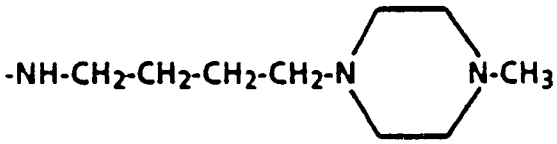


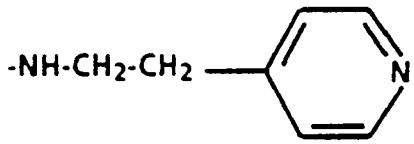


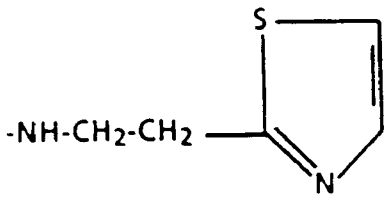


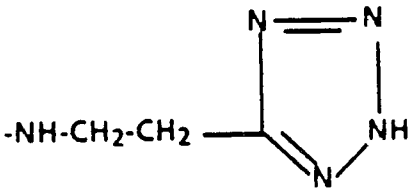


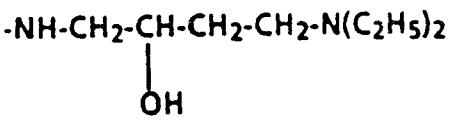


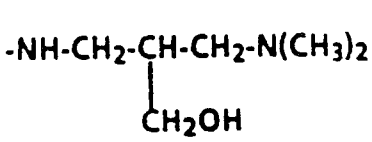


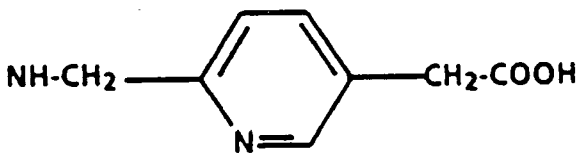


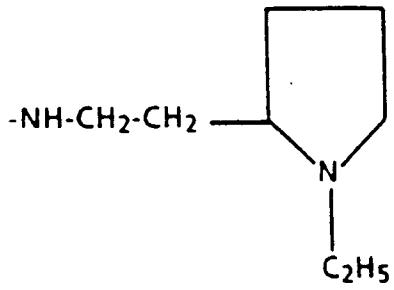

S
-NH-CH2-CH2
N

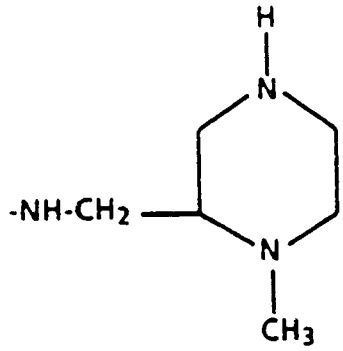

N
N
-NH-CH2-CH2
NH
N

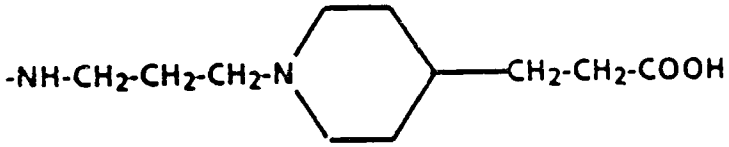

-NH-CH2-CH-CH2-CH2-N(C2H5)2
OH

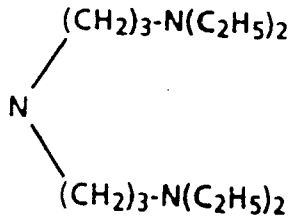

-NH-CH2-CH-CH2-N(CH3)2
CH2OH

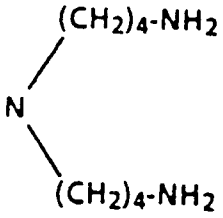

NH-CH2
CH2-COOH
N

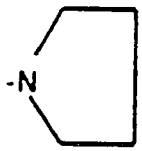

-NH-CH2-CH2
N
C2H5

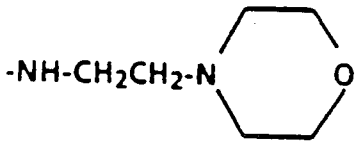

H
N
-NH-CH2
N
CH3

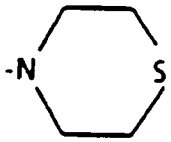

-NH-CH2-CH2-CH2-N
CH2-CH2-COOH

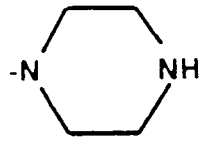

(CH2)3-N(C2H5)2
N
(CH2)3-N(C2H5)2

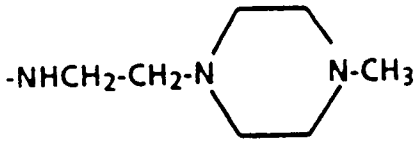

(CH2)4-NH2
N
(CH2)4-NH2

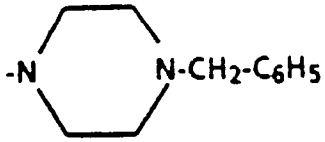

-N

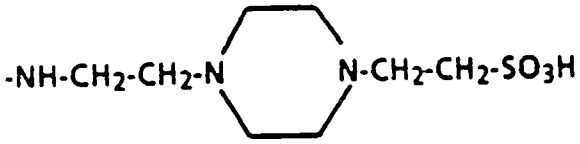

-NH-CH2CH2-N
O

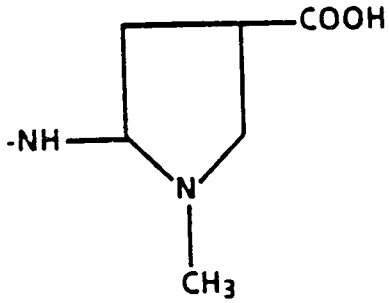

-N
S

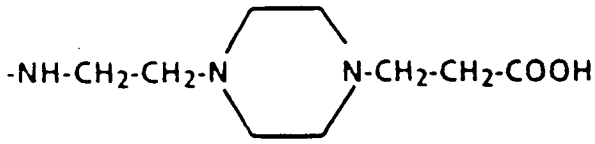

-N
NH

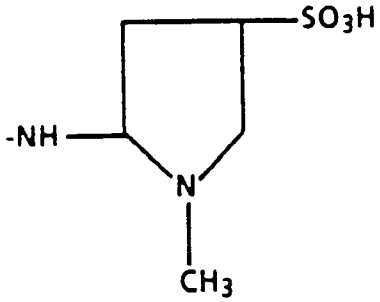

-NHCH2-CH2-N
N-CH3

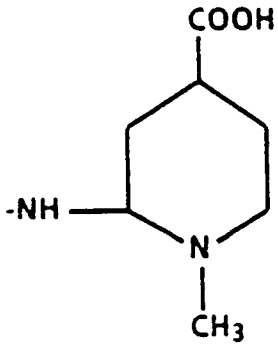

-N
N-CH2-C6H5

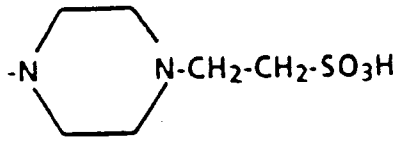

-NH-CH2-CH2-N
N-CH2-CH2-SO3H

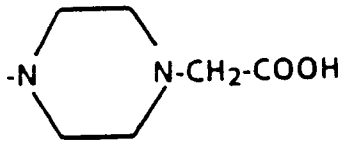

COOH
-NH
N
CH3


-NH-CH2-CH2-N
N-CH2-CH2-COOH


SO3H
-NH
N
CH3


COOH
-NH
N
CH3





$-NH-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_m-COOH$

$-NH-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_m-SO_3H$

$-NH-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-COOH$

$-NH-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-SO_3H$

$-NH-(CH_2)_n-S-(CH_2)_m-COOH$

$-NH-(CH_2)_n-S-(CH_2)_m-SO_3H$

joissa n on 2, 3, 4, tai 5 ja
m on 1, 2, 3 tai 4

$$-NH-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-COOH$$

$$-NH-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-SO_3H$$

joissa n on 1, 2 tai 3 ja
m on 0, 1 tai 2

Keksinnön mukaiset yhdisteet voivat muodostaa suoloja tavanomaisten menetelmien mukaisesti.

Erityisesti sellaiset kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa ryhmä $-NR_2R_3$ sisältää muita amiiniryhmiä, muodostavat happoadditiosuoloja.

Lisäksi sellaiset keksinnön yhdisteet, jotka sisältävät happoryhmiä $-NR_2R_3$-osassa, voivat myös muodostaa emäsadditiosuoloja.

Yleensä sellaiset keksinnön mukaiset yhdisteet, jotka sisältävät happamia ja emäksisiä ryhmiä, voivat muodostaa sisäisiä suoloja. Tämän keksinnön piirissä "sisäiset suolat" sisältyvät "ei-suola-muodon" määritelmään.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden edulliset additiosuolat ovat farmaseuttisesti hyväksyttävät happo- ja/tai emäsadditiosuolat.

Käsitteellä "farmaseuttisesti hyväksyttävät happo- ja/tai emäsadditiosuolat" tarkoitetaan sellaisia suoloja, jotka saadaan happojen ja/tai emästen kanssa, jotka biologisen valmistuksen ja formulaation kannalta katsottuna soveltuvat farmaseuttiseen käyttöön sekä käytettäväksi eläimen kasvun edistämiseksi.

Kaavan I mukaisten yhdisteiden tyypillisiä ja sopivia happoadditiosuoloja ovat suolat, jotka muodostetaan standardireaktiolla sekä orgaanisten että epäorgaanisten happojen, kuten esimerkiksi kloorivety-, bromivety-, rikki-, fosfori-, etikka-, trifluorietikka-, trikloorietikka-, meripihka-, sitruuna-, askorbiini-, maito-, omena-, fumaari-, palmitiini-, kooli-, pamoe-, lima-, glutamiini-, kamferi-, glutaari-, glykoli-, ftaali-, viini-, lauriini-, stearііni-, salisyyli-, metaanisulfoni-, dodekyylisulfonihapon (estolihapon), bentseenisulfonihapon, sor-

biini-, pikriini-, bentsoe-, kanelihapon ja vastaavien happojen kanssa.

Tyypillisiä esimerkkejä näistä emäksistä ovat: alkalimetalli- tai maa-alkalimetallihydroksidi, kuten natrium-, kalium- ja kalsiumhydroksidi, ammoniakki ja orgaaniset alifaattiset, alisykliset tai aromaattiset amiinit, kuten metyyliamiini, dimetyyliamiini, trimetyyliamiini, 2-amino-2-hydroksimetyyli-1,3-propaanidioli (TRIS), pikoliini ja emäksiset aminohapot, kuten lysiini, ornitiini, arginiini ja histidiini.

Keksinnön mukaisten, vapaan amino- tai ei-suola-muodon sisältävien yhdisteiden muuttaminen vastaaviksi additiosuoloiksi ja päinvastoin, t.s. keksinnön mukaisen yhdisteen additiosuolan muuttaminen ei-suola-muotoon tai vapaan aminon muotoon, ovat tavanomaista teknistä taito ja kuuluvat keksinnön piiriin.

Esimerkiksi kaavan I mukainen yhdiste voidaan muuttaa vastaavaksi happo- tai emäsadditiosuolaksi liuottamalla ei-suola-muoto vesipitoiseen liuottimeen ja lisäämällä pieni molaarinen ylimäärä valittua happoa tai emästä. Muodostunut liuos tai suspensio lyofilisoidaan sen jälkeen ja haluttu suola otetaan talteen. Lyofilisoimisen sijasta eräissä tapauksissa on mahdollista ottaa lopullinen suola talteen uuttamalla orgaanisella liuottimella, erotettu orgaaninen faasi konsentroidaan pieneen tilavuuteen ja saostetaan lisäämällä ei-liuotinta.

Siinä tapauksessa, että lopullinen suola on liukenematon orgaaniseen liuottimeen, johon ei-suola-muoto liukenee, se otetaan talteen suodattamalla ei-suola-muodon orgaanisesta liuoksesta sen jälkeen, kun on lisätty stökiömetrinen määrä tai pieni molaarinen ylimäärä valittua happoa tai emästä.

Ei-suola-muoto voidaan valmistaa vastaavasta happo- tai emässuolasta, joka liuotetaan vesipitoiseen liuottimeen, joka sen jälkeen neutraloidaan ei-suola-muodon vapauttamiseksi. Sen jälkeen tämä otetaan talteen esimerkiksi uuttamalla orgaanisella liuottimella tai muuttamalla toiseksi emäs- tai happoadditiosuolaksi, siten että lisätään valittua happoa tai emästä ja työskennellään edellä esitetyllä tavalla.

Kun suolan poiston jälkeen tarvitaan neutralointia, voidaan käyttää yleistä suolan poistomenetelmää.

Esimerkiksi voidaan kätevästi käyttää pylväskromatografiaa ja siinä kontrolloidun huokoskoon omaavia polydekstraanihartseja (kuten Sephadex LH 20) tai silanoitua piihappogeeliä. Sen jälkeen, kun ei-toivotut suolat on eluoitu vesipitoisella liuoksella, haluttu tuote eluoidaan veden ja polaarisen tai apolaarisen, orgaanisen liuottimen seoksen lineaarisella gradientilla tai vaihe-gradientilla, kuten asetonitriilin ja veden seoksella, jossa on asetonitriiliä suhteesta 50:50 noin 100 %:iin.

Kuten on alalla tunnettua, suolan muodostamista joko farmaseuttisesti hyväksyttävien happojen (emästen) tai ei-farmaseuttisesti hyväksyttävien happojen (emästen) kanssa voidaan käyttää sopivana puhdistusmenetelmänä. Kaavan I mukaisen yhdisteen suolamuoto muodostetaan ja eristetään, jonka jälkeen se voidaan muuttaa vastaavaksi ei-suola-muodoksi tai farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

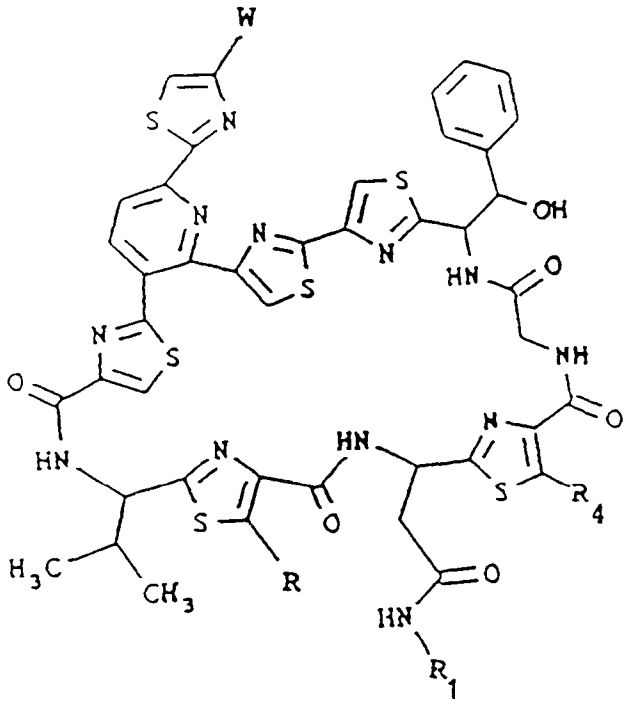
Eräissä tapauksissa kaavan I mukaisen yhdisteen happoadditiosuola liukenee paremmin veteen ja hydrofiilisiin liuottimiin ja sillä on lisääntynyt kemiallinen stabiilisuus.

Kuitenkin koska kaavan I mukaisten yhdisteiden ja niiden suolojen ominaisuudet ovat hyvin samankaltaisia, tässä hakemuksessa sillä mitä sanotaan kaavan I mukaisten yhdisteiden biologisista aktiivisuuksista, tarkoitetaan myös niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja ja päinvastoin.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä, niiden ominaisuuksien perusteella, voidaan käyttää aktiiviaineina lääkeaineiden valmistamiseksi ihmisen tai eläimen hoitamiseksi.

Erityisesti kaavan I mukaisten antibiootti GE 2270-yhdisteiden amidijohdannaiset ovat antimikrobisia aineita, jotka ovat pääasiallisesti aktiivisia gram-positiivisia bakteereja vastaan ja gram-positiivisia sekä gram-negatiivisia anaerobeja vastaan.

Yleisessä menetelmässä keksinnön mukaisen yhdisteen valmistamiseksi suoritetaan reaktio (amidoiminen), jossa sopiva, kaavan II mukainen antibioottiyhdiste GE 2270



II

jossa W tarkoittaa karboksi- tai aktivoitua esteriryhmää, R tarkoittaa vetyä, hydroksimetyyliä tai metoksimetyyliä, R_1 tarkoittaa vetyä tai metyyliä, R_4 tarkoittaa vetyä, metyyliä tai hydroksimetyyliä, sillä edellytyksellä, että kun R_4 tarkoittaa vetyä tai hydroksimetyyliä, R samanaikaisesti on metoksimetyyli ja R_1 on metyyli, saatetaan reagoimaan valitun, kaavan HNR_2R_3 mukaisen amiinin kanssa, jossa R_2 ja R_3 tarkoittavat samaa kuin edellä, inertissä, orgaanisessa liuottimessa ja kun W on karboksi, mukana käytetään kondensoivaa ainetta.

Suoritettaessa amidoiminen tämän keksinön mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, on joskus edullista suojata reaktioon osallistuvien yhdisteiden ryhmät, jotka eivät osallistu amidoimisreaktioon mutta jotka voisivat olla herkkiä reaktio-olosuhteisiin tai vaikuttaa negatiivisesti reaktion etenemiseen, esimerkiksi tuottamalla ei-toivottuja sivutuotteita.

Lisäksi kun aminohappo sisältää muita reaktiokykyisiä ryhmiä, kuten amino-, karboksi- tai merkaptoryhmiä, jotka voivat häiritä amidoimisen etenemistä, nämä suojataan alalla sinänsä tunnettujen menetelmien avulla, kuten sellaisilla, joita kuvataan viitekirjoissa E.Gross ja J.Meienhofer "The Peptides", vol.3, Academic Press, New York, 1981 ja M.Bodanszky ja A.Bodanszky "The Practice of Peptide Synthesis", Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1984. Näiden suojaryhmien täytyy olla pysyviä olosuhteissa, joissa amidoimisreaktio tapahtuu, ja niiden täytyy olla helposti poistettavissa reaktion lopussa ilman, että vaikutetaan joko juuri muodostuneeseen amidisidokseen tai molekyylin mihinkään muuhun osaa.

Tyypillisiä esimerkkejä N-suojaryhmistä, joita voidaan edullisesti käyttää keksinnön mukaisessa menetelmässä aminoryhmän suojaamiseksi, ovat karbamaatin muodostavat reagenssit, joille on tunnusomaista seuraavat oksikar-

bonyyliryhmät: 1,1-dimetyylipropynyylioksikarbonyyli, tert.-butyylioksikarbonyyli, vinyylioksikarbonyyli, aryylioksikarbonyyli, kinnamyylioksikarbonyyli, bentsyylioksikarbonyyli, p-nitrobentsyylioksikarbonyyli-3,4-dimetoksi-6-nitrobentsyylioksikarbonyyli, 2,4-diklooribentsyylioksikarbonyyli, 5-bentsisoksatsolyylimetyylioksikarbonyyli, 9-antranyylimetyylioksikarbonyyli, difenyylimetyylioksikarbonyyli, isonikotinyylioksikarbonyyli, difenyylimetyylioksikarbonyyli, isonikotinyylioksikarbonyyli, S-bentsyylioksikarbonyyli ja vastaavat.

Sopiva suojaus reaktiokykyiselle karbosykliselle happoryhmälle on esimerkiksi esteriryhmän muodostaminen.

Alan ammattimies pystyy, myös tässä esitetyn perusteella, päättelemään, mitkä amiinin HNR_2R_3 ryhmät on tarpeen suojata, kuinka ne tulee suojata ja mikä on sopiva suojauksen poistoreaktio, joka on tarpeen lopullisen tuotteen vapauttamiseksi.

Kuten on selvää alan ammattimiehelle, spesifisen suojaryhmän valinta riippuu viime kädessä tietyn amidijohdannaisen, joka halutaan saada, ominaisuuksista. Itse asiassa lopullisessa yhdisteessä tämän amidiryhmän tulisi olla pysyvä suojaryhmän (-ryhmien) poisto-olosuhteissa.

Koska erilaisten suojaryhmien poisto-olosuhteet ovat tunnetut, alan ammattimies pystyy valitsemaan sopivan suojaryhmän.

Inerttejä, orgaanisia liuottimia, jotka ovat käyttökelpoisia kondensaatioreaktioon, ovat sellaiset liuottimet, jotka eivät vaikuta epäsuotuisasti reaktion etenemiseen ja pystyvät ainakin osittain liuottamaan lähtöaineena käytettyä antibioottia.

Esimerkkejä mainituista inerteistä liuottimista ovat orgaaniset amidit, glykolien ja polyolien eetterit, fosforiamidit, sulfoksidit. Edullisia esimerkkejä inerteistä liuottimista ovat: dimetyyliformamidia, dimetoksietaani, heksametyylifosforiamidi, dimetyylisulfoksidi, dioksaani ja näiden seokset.

Joskus vesi on sopiva käytettäväksi reaktio-olosuhteissa.

Kondensoiva aine keksinnön mukaisessa menetelmässä, kun W on karboksi, on sellainen, joka soveltuu amidisidosten muodostamiseen orgaanisissa yhdisteissä ja erityisesti peptidisynteeseissä.

Tyypillisiä ja edullisia esimerkkejä kondensoivista aineista ovat (C_1-C_4)alkyyli, fenyyli tai heterosykliset fosforiatsidaatit, kuten difenyylifosforiatsidaatti (DPPA), dietyylifosforiatsidaatti, di(4-nitrofenyyli)fosforiatsidaatti, dimorfolyylifosforiatsidaatti ja difenyylifosforikloridaatti tai bentsotriatsol-1-yylioksitripyrrolidinofosfoniumheksafluorifosfaatti (PyBOP). Edullinen kondensoiva aine on difenyylifosforiatsidaatti (DPPA).

Keksinnön mukaisessa menetelmässä amiinina reagoivaa ainetta HNR_2R_3 käytetään tavallisesti pieni molaarinen ylimäärä.

Yleensä käytetään yksin- - kaksinkertaista ylimäärää, kun taas 1,2- - 1,5-kertainen molaarinen ylimäärä on edullinen.

Suoritettavan amidoimisen kannalta on tarpeen, että amiini HNR_2R_3 pystyy muodostamaan suolan lähtöaineena käytetyn antibiootin karboksiryhmän kanssa. Siinä tapauksessa, että amiini HNR_2R_3 ei ole riittävän vahva muodostaaksen tällaista suolaa valitussa reaktioseoksessa, on tarpeen lisätä reaktioseokseen suolaa muodostavaa emästä ainakin

ekvimolaarinen määrä lähtöaineena käytettyyn antibioottiin nähden.

Esimerkkejä mainituista suolaa muodostavista emäksistä ovat tertiaariset, orgaaniset, alifaattiset tai alisykliset amiinit, kuten trimetyyliamiini, trietyyliamiini, N-metyylipyrrolidiini, tai heterosykliset emäkset, kuten pikoliini ja vastaavat.

Kondensoivaa ainetta käytetään tavallisesti pieni molaarinen ylimäärä, kuten 1,1- - 1,5- ja mieluimmin 1,2-kertainen määrä lähtöaineena käytettyyn antibioottiin GE 2270 nähden.

Lisäksi amiinina reagoiva HNR_2R_3 voidaan edullisesti lisätä reaktioseokseen vastaavana happoadditiosuolana, esim. hydrokloridia. Tässä tapauksessa käytetään ainakin kaksinkertaista molaarista annosta ja mieluimmin 2- - 3-kertaista molaarista ylimäärää vahvaa emästä, joka pystyy vapauttamaan amiinin HNR_2R_3 sen suoloista. Myös tässä tapauksessa sopiva emäs on tertiaarinen, orgaaninen, alifaattinen tai alisyklinen amiini, kuten edellä esimerkeinä mainitut. Itse asiassa ainakin eräissä tapauksessa amiinin HNR_2R_3, joka sen jälkeen vapautetaan *in situ* edellä mainituilla emäksillä, suolan käyttö on paljon edullisempaa erityisesti silloin, kun suola on pysyvämpi kuin vastaava, vapaa amiini.

Reaktiolämpötila vaihtelee huomattavasti riippuen spesifisistä lähtöaineista ja reaktio-olosuhteista. Yleensä reaktio on edullista suorittaa lämpötiloissa, jotka ovat välillä 0 - 20 °C.

Myös reaktioaika vaihtelee huomattavasti riippuen muista reaktioparametreistä. Yleensä kondensaatioreaktio tapahtuu täydellisesti noin 5-24 tunnissa.

Joka tapauksessa reaktion etenemistä seurataan TLC:llä tai mieluimmin HPLC:llä alalla tunnettujen menetelmien mukaisesti.

Näiden kokeiden tulosten perusteella alan ammattimies pystyy arvioimaan reaktion etenemistä ja päättelemään milloin reaktio pysäytetään ja aloitetaam reaktiomassan käsitteleminen edelleen sinänsä tunnettujen menetelmien mukaisesti, joihin kuuluvat esimerkiksi uuttaminen liuottimilla, saostaminen siten, että lisätään ei-liuottimia, jne., yhdessä muiden erottamisten ja puhdistusten kanssa, jotka suoritetaan pylväskromatografisesti.

Kuten edellä jo mainittiin, kun kaavan HNR_2R_3 mukaisen reagoivan aineen suojaaminen on tarpeen, suojatusta lopputuotteeesta poistetaan sen jälkeen suojaus menetelmillä, jotka ovat sinänsä tunnetut ja riippuvat pääasiallisesti kyseessä olevasta suojaryhmästä.

Kun GE 2270:n lähtöaineena käytetään aktivoitua esteriä, mainittu esteri on sellainen, jossa esteröivällä alkoholilla aikaansaadaan poistoryhmä, joka voidaan helposti korvata ja substituoida amiinilla HNR_2R_3 reaktio-olosuhteissa, jotka eivät muuta molekyylin muita osia. Amiinina reagoivaa ainetta käytetään tavallisesti molaarinen ylimäärä aktivoituun esteriin nähden liuottimessa, joka on jokin edellä mainituista tai alempialkanoli. Reaktiolämpötila vaihtelee tavallisesti 0 °C:sta 100 °C:seen. Esimerkkejä aktivoiduista estereistä ovat alempialkyyliesterit, joissa alempialkyyliosa on mahdollisesti substituoitu syanolla ja nitrolla, fenyyliesterit, jotka ovat substituoituja halo- ja nitroryhmillä, sekä esteriosa, joka sisältyy GE 2270:n tekijään A_2.

On selvää, että monissa tapauksissa keksinnön mukainen yhdiste voidaan valmistaa useammalla kuin yhdellä tavalla

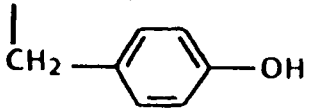
ja että keksinnön mukainen yhdiste voidaan muuttaa toiseksi sinänsä tunnetuilla reaktioilla.

Esimerkiksi kun amiini HNR_2R_3 sisältää karboksi- tai esteriryhmän, joka voidaan edelleen muuttaa vastaavaksi amidijohdannaiseksi, haluttu, kaavan I mukainen yhdiste voidaan valmistaa kondensoimalla ensin mainittu amiini valitun lähtöaineena käytetyn GE 2270:n kanssa ja sen jälkeen karboksi- tai esteriryhmä muutetaan amidiksi reaktiolla sopivan amiinin kanssa.

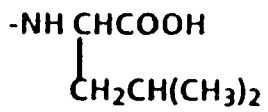
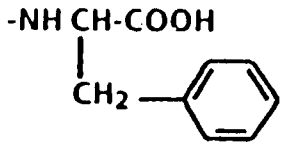
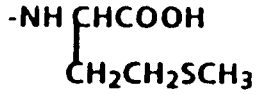
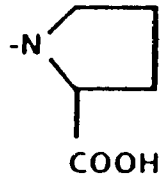
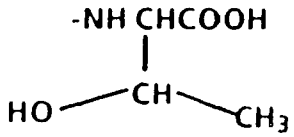
Seuraavissa taulukoissa on esitetty eräiden keksinnön mukaisten tyypillisten yhdisteiden rakennekaavat (TAULUKKO I) ja niiden valmistusmenetelmät (jotka on kuvattu yksityiskohtaisesti kokeellisessa osassa), lähtöaineet ja reaktiosaannot (TAULUKKO II).

Seuraavassa taulukossa (TAULUKKO I) on esitetty keksinnön mukaisten tyypillisten esimerkkiyhdisteiden rakennekaavat

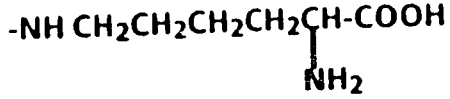
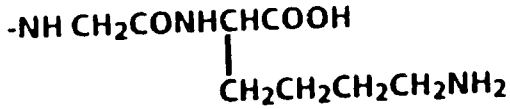
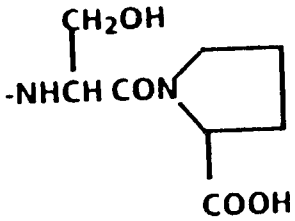
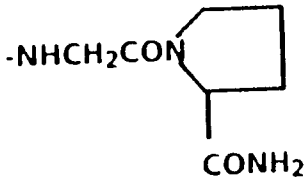
TAULUKKO I

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
1	-NH CH_2COOH	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
2	-NH $CH(CH_2CH_2CH_2NH_2)COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
3	-NH $CH(CH_2OH)COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
4	-NH $CH(CH_2COOH)COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
5	-NH $CH(CH_2$-$)COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3

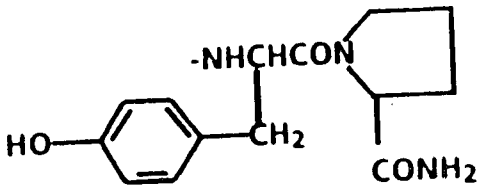
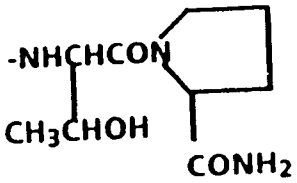
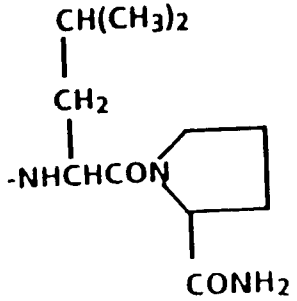
TAULUKKO I (jatkuu)

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
6		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
7		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
8		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
9		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
10		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3

TAULUKKO I (jatkuu)

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
11		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
12		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
13		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
14		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3

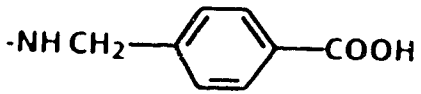
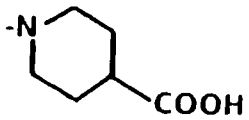
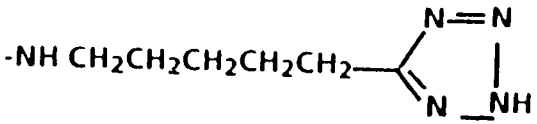
TAULUKKO I (jatkuu)

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
15		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
16		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
17		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3

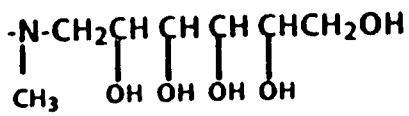
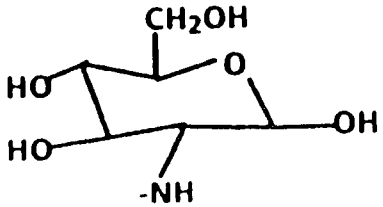
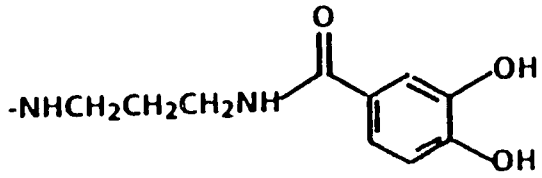
TAULUKKO I (jatkuu)

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
18	-NH $CH_2CH_2CH_2COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
19	-NH $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
20	-NH $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
21	-NH $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
22	-NH $CH_2CH_2SO_3H$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
23	-NH $CH_2CH_2CH_2SO_3H$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3

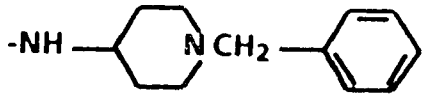
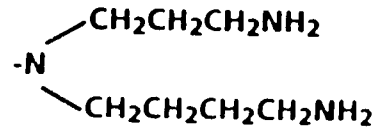
TAULUKKO I (jatkuu)

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
24	-NH $CH_2CH_2CH_2PO_3H_2$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
25	-NH $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2PO_3H_2$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
26		CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
27		CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
28		CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3

TAULUKKO I (jatkuu)

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
29		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
30		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
31		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
32	-NH $CH_2CH_2N(CH_3)_2$	$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3

TAULUKKO I (jatkuu)

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
33		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
34		$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
35	$-NH_2$	$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3
36	$-NH\ CH_2CH_2CH_2NH_2$	$CH_2O\text{-}CH_3$	CH_3	CH_3

TAULUKKO I (jatkuu)

Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
37	-NH CH_2CHO	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
38	-NH $CH_2CH_2NHCH_2CH_2COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
39	-NH $CH_2CH_2SCH_2CH_2COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
40	-NH $CH_2CH_2CH_2CH = CHCOOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3
41	-NH $CH_2CH_2OCH_2CH_2COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_3

TAULUKKO I (jatkuu)

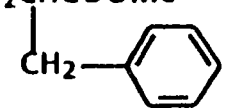
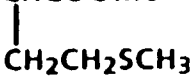
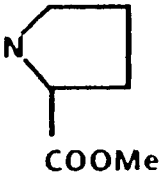
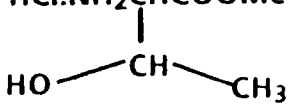
Yhdisteen numero	Y	R	R_1	R_4
42	-NH $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	CH_2O-CH_3	CH_3	CH_2OH
43	-NH $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	H	H	CH_3
44	-NH $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	CH_2OH	CH_3	CH_3

Yhdisteet nro 2, 11, 12, 34, 36 esitettiin trifluoriasetaattisuoloina

TAULUKKO II

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
1	A_3 + $HCl.NH_2CH_2COOEt$	A_1	80%
2	A_3 + $HCl.NH_2CH(CH_2CH_2CH_2NH.Cbz)COOMe$	A_1	72%
3	A_3 + $HCl.NH_2CH(CH_2OH)COOMe$	A_1	70%
4	A_3 + $HCl.NH_2CH(CH_2COOMe)COOMe$	A_1	54%
5	A_3 + $HCl.NH_2CH(CH_2-C_6H_4-OH)COOMe$	A_1	70%
6	A_3 + $HCl.NH_2CH(CH_2CH(CH_3)_2)COOMe$	A_1	70%

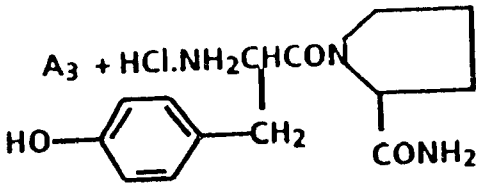
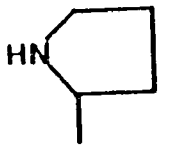
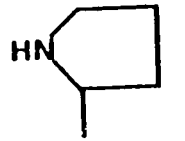
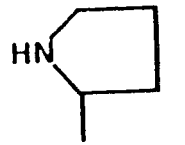
TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
7	A_3 + HCl.NH_2CHCOOMe 	A_1	60%
8	A_3 + HCl.NH_2CHCOOMe 	A_1	70%
9	A_3 + HCl.HN 	A_1	75%
10	A_3 + HCl.NH_2CHCOOMe 	A_1	70%

TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
11	A_3 + $NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH(NH.Cbz)-COOH$	B_1	64%
12	A_3 + TFA.$NH_2CH_2CONHCH(CH_2CH_2CH_2CH_2NH.Cbz)COOH$	B_1	74%
13	<u>3</u> + HCl.HN(COOMe)	C_1	70%
14	<u>1</u> + HN($CONH_2$)	C	83%

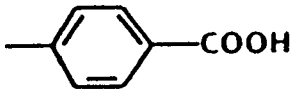
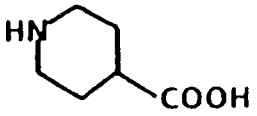
TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
15		A	60%
	or		
	<u>5</u> + 	C	70%
16	<u>10</u> + 	C	60%
17	<u>6</u> + 	C	65%

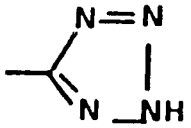
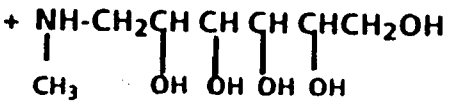
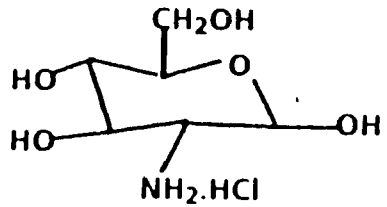
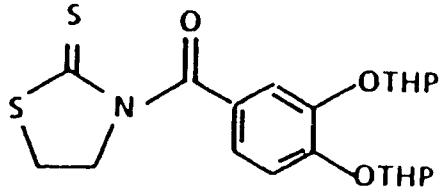
TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
18	A_3 + $HCl.NH_2CH_2CH_2CH_2COOMe$	A_1	73%
19	A_3 + $HCl.NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOMe$	A_1	77%
	A_3 + $NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	B	70%
20	A_3 + $PTSA.NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOMe$	A_1	75%
21	A_3 + $PTSA.NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOMe$	A_1	70%
22	A_3 + $NH_2CH_2CH_2SO_3H$	B	20%

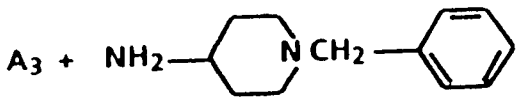
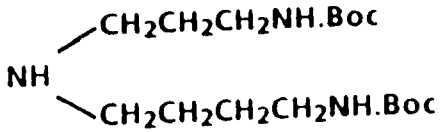
TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
23	A_3 + $NH_2CH_2CH_2CH_2SO_3H$	B	25%
24	A_3 + $NH_2CH_2CH_2CH_2PO_3H_2$	B	40%
25	A_3 + $NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2PO_3H_2$	B	35%
26	A_3 + 	B	60%
27	A_3 + 	B	50%

TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
28	A_3 + $NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$ 	B	65%
29	A_3 + 	A	20%
30	A_3 + 	A	80%
31	36 + 	C_1	80%

TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
32	A_3 + $NH_2CH_2CH_2N(CH_3)_2$	A	75%
33	A_3 + 	A	60%
34	A_3 + 	A_1	50%
35	A_3 + NH_3 in MeOH	D	83%
36	A_3 + $NH_2CH_2CH_2CH_2NH.Boc$	A_1	70%

TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
37	$A_3 + NH_2CH_2CH(OCH_3)_2$	A_1	65%
38	$37 + HCl.NH_2CH_2CH_2COOCH_2CH_3$	C_1	20%
39	$A_3 + TFA.NH_2CH_2CH_2SCH_2CH_2COOCH_3$	A_1	33%
40	$A_3 + TFA.NH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH\text{-}COOH$	B	51%

TAULUKKO II (jatkuu)

Yhdisteen numero	Lähtöaineet (GE 2270 tekijä – amiini)	Menetelmä	Kokonaissaanto
41	A_3 + $TFA.NH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2COOH$	B	37%
42	C_{2a} + $HCl.NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOCH_3$	F	40%
	$NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	G	35%
43	D_1 + $HCl.NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOCH_3$	H	50%
	$NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	I	40%
44	D_2 + $HCl.NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOCH_3$	J	35%
	$NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	K	30%

TFA = trifluorietikkahappo
PTSA = p–tolueenisulfonihappo

HPLC-analyysi

Seuraavassa taulukossa (TAULUKKO III) esitetään tämän keksinnön mukaisten tyypillisten esimerkkiyhdisteiden R_t-arvot.

Analyysit suoritettiin Varian model 5000 LC:llä, joka oli varustettu 10 µl:n silmukkainjektoripumpulla, ja muunnettavalla aallonpituusdetektorilla, joka oli Varian 2050, aallonpituudella 254 nm.

Kolonnit: Esikolonni oli LiChroCart-LiChrsorb RP-8 (5 µm), jota seurasi kolonni LiChroCart 125-4 LiChrospher 100 RP-8 (5 µm).

Eluentit: A 0,05 M vesip. $HCOONH_4$
B CH_3CN
C THP

Menetelmä A: isokraattinen 44 % B:ta A:ssa
virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä B: isokraattinen 40 % B:ta A:ssa
virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä C: isokraattinen 38 % B:ta A:ssa
virtausnopeus: 0,5 ml/min

Menetelmä D: isokraattinen 30 % B:ta A:ssa
virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä E: isokraattinen 38 % B:ta A:ssa
virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä F: gradientti, jossa on B:tä 38 %:sta 55 %:iin A:ssa 11 minuutissa seuraavan ohjelman mukaisesti

aika (min)	% B:tä A:ssa
0	38
6	38
7	45
10	45
11	55

virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä G: gradientti, jossa on B:tä 38 %:sta 55 %:iin A:ssa 25 minuutissa seuraavan ohjelman mukaisesti

aika (min)	% B:tä A:ssa
0	38
6	38
10	44
15	44
25	55

virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä H: isokraattinen 55 % B:ta A:ssa
virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä I: isokraattinen 60 % B:ta A:ssa
virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä L: isokraattinen 48 % B:ta A:ssa
virtausnopeus: 0,7 ml/min

Menetelmä M: gradientti seuraavan ohjelman mukaisesti:

aika (min)	% A:ta	% B:tä	% C:tä
0	74	10	16
20	62	19	19

virtausnopeus 0,7 ml/min.

TAULUKKO III

HPLC-analyysi

Yhdisteen n:o	Menetelmä	R_t (min)	K
1	A	2.56	0.92
2	B	4.09	1.15
3	C	6.21	1.12
4	D	14.70	1.79
5	E	5.99	1.28
6	A	4.05	1.46
7	A	4.52	1.63
8	A	3.44	1.24
9	E	5.32	1.18
10	E	4.22	0.90
11	F	14.30	3.05
12	F	5.99	1.28
13	E	4.88	1.04
14	G	14.09	3.01
15	G	17.60	3.76
16	G	13.77	2.94
17	G	23.75	5.07
18	G	7.49	1.60

K = suhteellinen retentioaika

TAULUKKO III (jatkuu)

HPLC-analyysi

Yhdisteen n:o	Menetelmä	R_t (min)	K
19	F	8.84	1.89
20	G	17.77	3.78
21	G	31.10	6.64
22	F	5.01	1.07
23	F	4.40	0.94
24	F	6.27	1.34
25	F	11.17	2.39
26	F	29.04	6.02
27	F	6.28	1.34
28	F	12.14	2.59
29	F	8.02	1.71
30	E	6.81-7.61 anomeerinen seos	1.45-1.62 anomeerinen seos
31	F	17.64	3.76
32	B	9.64	2.70
33	H	15.10	7.40
34	I	7.22	3.92
35	L	10.28	4.11
36	F	19.32	4.13

K = suhteellinen retentioaika

TAULUKKO III (jatkuu)

HPLC-analyysi

Yhdisteen n:o	Menetelmä	R_t (min)	K
37	F	14.56	3.11
38	F	11.00	2.35
39	F	9.48	2.02
40	F	6.84	1.46
41	F	3.95	0.84
42	M	17.23	1.32 *
43	M	15.76	1.52 **
44	M	16.64	1.50 ***
19	M	20.81	1.32

K = suhteellinen retentioaika

K = suhteellinen retentioaika R_t amidi/R_t GE 2270
sopiva lähtöaine
(t.s. kaavan II mukainen
yhdiste, jossa W = COOH)

KOKEELLINEN OSA

TAULUKKO IV - NMR

^{1}H-NMR-spektrit rekisteröitiin Bruker spektrometrillä DMSO-d_6:ssa (heksadeuterodimetyylisulfoksidi), sisäisenä standardina käytettiin TMS:ää (0,00 ppm) [δ, ppm, m] 250 MHz:llä ja/tai 500 MHz:llä (s=singletti, br s=leveä signletti, d=dubletti, dd, dublettien dubletti, t=tripletti, m=multipletti).

TAULUKKO V - IR

Infrapunaspektrit (IR) rekisteröitiin Perkin Elmer mod. 580 spektrofotometrillä nujolitahtaassa.

TAULUKKO VI - UV

Ultraviolettiabsorptiospektrit rekisteröitiin Perkin Elmer Model 320 spektrometrillä.

Alan ammattimiehelle on selvää, että seuraavissa TAULUKOISSA IV, V ja VI ei ole esitetty kaikkien saatujen piikkien arvoja vaan ainoastaan sellaisten piikkien arvot, joilla on merkitystä yksittäisen aineen tunnistamiseksi.

TAULUKKO IV - NMR-spektrit

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
1	0.84 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 2.57 (s, 3H); 3.39 (s, 3H); 3.77 (dd, 1H); 3.99 (d, 2H); 4.25 (dd, 1H); 4.96 (s, 2H); 7.36-7.22 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.50 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
2	0.79 (d, 3H); 0.85 (d, 3H); 2.05-1.70 (m, 4H); 2.54 (s, 3H); 3.33 (s, 3H); 3.65 (m, 2H); 3.81 (dd, 1H); 4.10 (m, 1H), 4.35 (dd, 1H); 4.99 (s, 2H); 7.35-7.05 (m, 7H); 8.20 (s, 1H); 8.42 (s, 1H); 8.58 (s, 1H)
3	0.84 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 2.58 (s, 3H); 3.37 (s, 3H); 3.80 (dd, 2H); 3,84 (dd, 1H); 3.91 (dd, 1H); 4.26 (dd, 1H); 4.55 (m, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.36-7.20 (m, 7H); 8.29 (s, 1H); 8.55 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
4	0.85 (d, 3H); 0.89 (d, 3H); 2.58 (s, 3H); 2.90 (m, 2H); 3.38 (s, 3H); 3.70 (dd, 1H); 4.29 (dd, 1H); 4.85 (m, 1H); 4.98 (s, 2H); 7.40-7.20 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.52 (s, 1H); 8.58 (s, 1H)
5	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 2.58 (s, 3H); 3.11 (m, 2H); 3.26 (br; s, 1H); 3.38 (s, 3H); 3.78 (dd, 1H); 4.28 (dd, 1H) 4.64 (m, 1H); 4.97 (s, 2H); 6.68 (d, 1H); 7.09 (d, 1H); 7.40-7.20 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.47 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)

TAULUKKO IV - NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
6	0.84 (d, 3H). 0.87 (d, 3H); 0.92 (d, 3H); 0.95 (d, 3H); 1.69 (m, 2H); 1.86 (m, 1H); 2.57 (s, 3H); 3.37 (s, 3H); 3.78 (dd, 1H); 4.26 (dd, 1H); 4.53 (m, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.38-7.20 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.46 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
7	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 2.58 (s, 3H); 3.20 (m, 2H); 3.37 (s, 3H); 3.77 (dd, 1H); 4.25 (dd, 1H); 4.73 (m, 1H); 7.40-7.2 (m, 12H); 8.28 (s, 1H); 8.47 (s, 1H) 8.59 (s, 1H)
8	0.85 (d, 3H); 0.89 (d, 3H); 2.08 (s, 3H); 2.16 (m, 2H); 2.56 (m, 2H); 2.57 (s, 3H); 3.40 (s, 3H); 3.79 (dd, 1H); 4.27 (dd, 1H); 4.61 (m, 1H); 5.00 (s, 2H); 7.37-7.20 (m, 7H); 8.29 (s, 1H); 8.52 (s, 1H); 8.60 (s, 1H)
9	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 2.45-1.70 (m, 4H); 2.58 (s, 3H); 3.37 (s, 3H); 3.68 (m, 2H); 3.78 (dd, 1H); 4.10 (m, 1H); 4.27 (dd, 1H); 4.49 (m, 1H); 7.35-7.22 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.50 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
10	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.19 (d, 3H); 2.59 (s, 3H); 3.39 (s, 3H); 3.78 (dd, 1H); 4.30 (m, 2H); 4.48 (dd, 1H); 4.99 (s, 2H); 7.4-7.2 (m, 7H); 8.33 (s, 1H); 8.49 (s, 1H); 8.60 (s, 1H)

TAULUKKO IV – NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
11	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H): 1.55-1.35 (m, 2H); 1.61 (m, 2H); 1.83 (m, 2H); 2.58 (s, 3H); 3.34 (m, 2H); 3.38 (s, 3H); 3.79 (dd, 1H); 3.91 (br; s, 1H); 4.29 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.35-7.13 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.43 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
12	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.37 (m, 2H); 1.70-1.49 (m, 3H); 1.75 (m, 1H); 2.58 (s, 3H); 2.76 (m, 2H); 3.38 (s, 3H); 3.78 (dd, 1H); 4.03 (m, 2H); 4.28 (m, 2H); 4.97 (s, 2H); 7.35-7.20 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.49 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
13	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.98-1.82 (m, 2H); 2.18 (m, 2H); 2.56 (s, 3H); 2.69 (dd, 2H); 3.36 (s, 3H); 3.85-3.62 (m, 3H); 4.31 (m, 2H); 4.85 (m, 1H); 4.96 (s, 2H); 7.38-7.19 (m, 7H); 8.24 (s, 1H); 8.55 (s, 1H); 8.63 (s, 1H)
14	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.99-1.82 (m, 3H); 2.06 (m, 1H); 2.58 (s, 3H); 3.58 (m, 1H); 3.67 (m, 1H); 3.79 (dd, 1H); 4.18 (d, 2H); 4.28 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 6.93 (s, 1H); 7.36-7.28 (m, 8H); 8.28 (s, 1H); 8.52 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
15	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 2.07-1.63 (m, 4H); 2.58 (s, 3H); 2.99 (dd, 1H); 3.09 (dd, 1H); 3.38 (s, 3H); 3.51 (m, 1H); 3.77 (m, 2H); 4.30 (m, 2H); 4.89 (m, 1H); 4.98 (s, 2H); 6.66 (d, 1H); 6.95 (br; s, 1H); 7.16 (d, 1H); 7.39-7.20 (m, 8H); 8.23 (s, 1H); 8.42 (s, 1H); 8.58 (s, 1H)

TAULUKKO IV – NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
16	0.84 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 1.20 (d, 3H); 1.98-1.80 (m, 3H); 2.08 (m, 1H); 2.56 (s, 3H); 3.36 (s, 3H); 3.85-3.71 (m, 2H); 4.13 (m, 1H); 4.28 (dd, 1H); 4.31 (dd, 1H); 4.73 (m, 1H); 5.05 (d, 1H); 6.89 (br; s, 1H); 7.15 (br; s, 1H); 7.38-7.19 (m, 7H); 8.26 (s, 1H); 8.51 (s, 1H); 8.56 (s, 1H)
17	0.84 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 0.94 (d, 3H); 0.98 (d, 3H); 2.10-1.62 (m, 7H); 2.56 (s, 3H); 3.36 (s, 3H); 3.65 (m, 1H); 3.88-3.70 (m, 2H); 4.31 (m, 2H); 4.88 (m, 1H); 4.96 (s, 2H); 6.79 (br, s, 1H); 7.18 (br; s, 1H); 7.35-7.20 (m, 7H); 8.25 (s, 1H); 8.48 (s, 1H); 8.56 (s, 1H)
18	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.81 (m, 2H); 2.30 (t, 2H); 2.58 (s, 3H); 3.35 (m, 2H); 3.37 (s, 3H); 3.78 (dd, 1H); 4.28 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.35-7.20 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.46 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
19	0.84 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 1.35 (m, 2H); 1.56 (m, 4H); 2.22 (t, 2H); 2.58 (s, 3H); 3.36 (m, 2H); 3.38 (s, 3H); 3.80 (dd, 1H); 4.29 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.42-7.22 (m, 7H); 8.29 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 8.62 (s, 1H)

TAULUKKO IV – NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
20	0.84 (d, 3H); 0.88 (d; 3H); 1.31 (br; s, 6H); 1.51 (m, 2H); 1.57 (m, 2H); 2.19 (t, 2H); 2.58 (s, 3H); 3.32 (m, 2H); 3.37 (s, 3H); 3.79 (dd, 1H); 4.28 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.38-7.19 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
21	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.41-1.20 (m, 12H); 1.47 (m, 2H); 1.57 (m, 2H); 2.17 (t, 2H); 2.58 (s, 3H); 3.29 (m, 2H); 3.38 (s, 3H); 3.79 (dd, 1H); 4.28 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.38-7.19 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.43 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
22	0.85 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 2.57 (s, 3H); 2.79 (t, 2H); 3.37 (s, 3H); 3.59 (t, 2H); 3.78 (dd, 1H); 4.28 (dd, 1H); 4.97 (s, 1H); 7.41-7.20 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.44 (s, 1H); 8.57 (s, 1H)
23	0.84 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 1.67 (m, 2H); 2.53 (t, 2H); 2.57 (s, 3H); 3.26 (t, 2H); 3.37 (s, 3H); 3.78 (dd, 1H); 4.28 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.41-7.26 (m, 7H); 8.26 (s, 1H); 8.44 (s, 1H); 8.57 (s, 1H)
24	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.58 (m, 2H); 1.79 (m, 2H); 2.58 (s, 3H); 3.38 (s, 3H); 3.50 (m, 2H); 3.78 (dd, 1H); 4.28 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.38-7.21 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)

TAULUKKO IV – NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
25	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.65-1.35 (m, 8H); 4.58 (s, 3H); 3.38 (s, 3H); 3.78 (dd, 1H); 4.28 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.40-7.20 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.43 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
26	0.85 (d, 3H); 0.89 (d, 3H); 2.56 (s, 3H); 3.36 (s, 3H); 3.80 (dd, 1H); 4.31 (dd, 1H); 4.62 (br; s, 2H); 4.96 (s, 2H); 7.39-7.15 (m, 7H); 7.47 (d, 2H); 7.90 (d, 2H); 8.26 (s, 1H); 8.41 (s, 1H); 8.58 (s, 1H)
27	0.84 (d 3H); 0.88 (d, 3H); 1.62 (br, s, 2H); 1.92 (br, s, 2H); 2.58 (s, 3H); 2.60 (m, 1H); 3.38 (s, 3H); 3.79 (dd, 1H); 4.16 (m, 2H); 4.29 (dd, 1H); 4.38 (m, 2H); 7.35-7.19 (m, 7H); 8.25 (s, 1H); 8.29 (s, 1H); 8.57 (s, 1H)
28	0.85 (d, 3H); 0.89 (d, 3H); 1.39 (m, 2H); 1.61 (m, 2H) 1.76 (m, 2H); 2,58 (s, 3H); 2.88 (t, 2H); 3.33 (m, 2H); 3.80 (dd, 1H); 4.29 (dd, 1H); 4.98 (s, 2H); 7.34-7.20 (m, 7H) 8.26 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 8.58 (s, 1H)
29	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 2.58 (s, 6H); 3.38 (s, 3H); 3.70-3.41 (m, 5H); 3.89-3.75 (m, 2H); 3.98 (br; s, 1H); 4.35-4.26 (m, 2H); 4.97 (s, 2H); 7.35-7.21 (m, 7H); 8.26 (s, 1H); 8.28 (s, 1H); 8.58 (s, 1H)

TAULUKKO IV – NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
30	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 2.58 (s, 3H); 3.29-3.14 (m, 2H); 3.38 (s, 3H); 3.90-3.49 (m, 4H); 4.29 (dd, 1H); 4.92 (m, 1H); 4.97 (s, 2H); 5.12 (t, 1H); 7.35-7.18 (m, 7H); 8.26 (s, 1H); 8.51 (s, 1H); 8.58 (s, 1H)
31	0.86 (d, 3H); 0.89 (d, 3H); 1.81 (m, 2H); 2.59 (s, 3H); 3.32 (m, 4H); 3.39 (s, 3H); 3.80 (dd, 1H); 4.30 (dd, 1H); 4.99 (s, 2H); 6.75 (d, 1H); 7.41-7.18 (m, 9H); 8.28 (s, 1H); 8.46 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
32	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 2.21 (s, 6H); 2.59 (s, 3H); 3.38 (s, 3H); 3.43 (m, 4H); 3.81 (dd, 1H); 4.31 (dd, 1H); 4.98 (s, 2H); 7.45-7.19 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 8.61 (s, 1H)
33	0.86 (d, 3H); 0.90 (d, 3H); 1.91-1.70 (m, 2H); 2.26-2.05 (m, 2H); 2.60 (s, 3H); 2.91-2.69 (m, 4H); 3.40 (s, 3H); 3.51 (br; s, 2H); 3.95-3.75 (m, 2H); 4.30 (dd, 1H); 4.99 (s, 2H); 7.41-7.18 (m, 12H); 8.28 (s, 1H) 8.45 (s, 1H); 8.66 (s, 1H)
34	0.85 (d, 3H); 0.89 (d, 3H); 1.81-1.49 (m, 4H); 2.01-1.88 (m, 2H); 2.59 (s, 3H); 2.98-2.65 (m, 4H); 3.39 (s, 3H); 3.80-3.51 (m, 4H); 3.81 (dd, 1H); 4.31 (dd, 1H); 4.99 (s, 2H); 7.41-7.18 (m, 7H); 7.90-7.65 (m, 6H); 8.25 (s, 1H); 8.36 (s, 1H); 8.61 (s, 1H)

TAULUKKO IV – NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
35	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 2.59 (s, 3H); 3.39 (s, 3H); 3.79 (dd, 1H); 4.29 (dd, 1H); 4.98 (s, 2H); 7.40-7.19 (m, 7H); 7.72 (br, s, 1H); 8.03 (br, s, 1H); 8.28 (s, 1H); 8.47 (s, 1H); 8.60 (s, 1H)
36	0.85 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.87 (m, 2H); 2.54 (s, 3H); 2.89 (m, 2H); 3.37 (s, 3H); 3.42 (m, 2H); 3.79 (dd, 1H); 4.29 (dd, 1H); 4.98 (s, 2H); 7.38-7.20 (m, 7H); 7.69 (br; s, 3H); 8.29 (s, 1H); 8.49 (s, 1H); 8.61 (s, 1H)
37	0.83 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 1.32 (m, 1H); 2.16 (m, 1H); 2.46 (d, 3H); 2.57 (s, 3H); 2.71 (m, 1H); 3.37 (s, 3H); 3.78 (dd, 1H); 4.16 (d, 1H); 4.26 (dd, 1H); 4.67 (m, 1H); 4.96 (s, 2H); 6.02 (d, 1H); 6.35 (dd, 1H); 7.35-7.20 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.49 (s, 1H); 8.60 (s, 1H); 9.61 (s, 1H)
38	0.83 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 1.25 (m, 1H); 2.2 (m, 1H); 2.5 (s, 3H); 2.70 (m, 3H); 3.35 (s, 3H); 3.63 (m, 1H); 3.79 (d, 1H); 4.27 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.4-7.15 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.53 (s, 1H); 8.61 (s, 1H)

TAULUKKO IV – NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
39	0.83 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 1.32 (m, 1H); 2.16 (m, 1H); 2.47 (d, 3H); 2.57 (s, 3H); 2.72 (m, 4H); 3.37 (s, 3H); 3.50 (m, 2H); 3.78 (dd, 1H); 4.27 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 7.40-7.20 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.49 (s, 1H); 8.60 (s, 1H)
40	0.83 (d, 3H); 0.87 (d, 3H); 1.32 (m, 1H); 1.71 (m, 2H); 2.25-2.14 (m, 3H); 2.46 (d, 3H); 2.57 (s, 3H); 2.7 (m, 1H); 3.37 (s, 3H); 3.76 (dd, 1H); 4.27 (dd, 1H); 4.97 (s, 2H); 5.81 (d, 1H, J=15.7 Hz); 6.78 (m, 1H); 7.39-7.12 (m, 7H); 8.28 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 8.60 (s, 1H)
41	0.86 (d, 3H); 0.89 (d, 3H); 1.43 (m, 1H); 2.19 (m, 1H); 2.47 (d, 3H); 2.59 (s, 3H); 2.72 (m, 1H); 3.39 (s, 3H); 3.50 (t, 2H); 3.58 (t, 2H); 3.68 (t, 2H); 3.79 (dd, 1H); 4.99 (s, 2H); 7.42-7.20 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.47 (s, 1H); 8.59 (s, 1H)
42	0.83 (d, 3H); 0.85 (d, 3H); 1.2-1.4 (m, 3H); 1.5-1.65 (m, 4H); 2.22 (t, 3H); 2.60 (d, 1H); 2.69 (d, 1H); 3.37 (s, 3H); 3.79 (dd, 1H); 4.27 (dd, 1H); 4.86 (d, 2H); 4.97 (s, 2H); 5.00 (dd, 1H); 5.1-5.4 (m, 3H); 5.74 (t, 1H); 6.00 (d, 1H); 7.2-7.4 (m, 7H); 8.27 (s, 1H); 8.44 (s, 1H); 8.62 (s, 1H)

TAULUKKO IV - NMR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	^{1}H-NMR (DMSOd_6) δ(ppm)
43	0.84 (d, 3H); 0.89 (d, 3H); 1.4-1.2 (m, 3H); 1.65-1.50 (m, 4H); 2.23 (t, 3H); 2.59 (s, 3H); 2.79 (m, 1H); 3.87 (m, 1H); 4.25 (m, 1H); 5.04 (t, 1H); 5.35-5.20 (m, 3H); 6.09 (d, 1H); 6.67 (br, s, 1H); 7.04 (br, s, 1H); 7.35-7.15 (m, 6H); 8.24 (s ,1H); 8.26 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 8.61 (s, 1H)
44	0.84 (d, 3H); 0.88 (d, 3H); 1.4-1.25 (m, 3H); 1.65-1.50 (m, 4H); 2.23 (t, 3H); 2.58 (s, 3H); 2.75 (m, 1H); 3.78 (dd, 1H): 4.28 (dd, 1H); 4.98 (m, 3H); 5.35-5.15 (m, 3H); 6.03 (m, 2H); 7.42-7.15 (m, 7H): 8.30 (s, 1H): 8.45 (s, 1H): 8.62 (s, 1H)

TAULUKKO V – IR-spektrit

Yhdisteen n:o	I.R. (nujol cm^{-1})
1	3370; 3110; 1730; 1655; 1545; 1520
2	3350; 3110; 1720; 1650; 1535; 1500
3	3340; 3105; 1720; 1645; 1535; 1500
4	3360; 1725; 1640; 1535
5	3350; 3110; 1725; 1650; 1535; 1510
6	3370; 3105; 1725; 1655; 1535; 1500
7	3360; 3100; 1725; 1655; 1535; 1490
8	3370; 3105; 1725; 1655: 1535; 1505
9	3370; 3110; 3100; 1725; 1657; 1550; 1530; 1505
10	3370; 3105; 1730; 1655; 1540; 1510
11	3359; 3115; 1653; 1551; 1510;
12	3360; 3113; 1720; 1662; 1547; 1510

TAULUKKO V – IR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	I.R. (nujol cm^{-1})
13	3370; 3110; 1720; 1655; 1530; 1505
14	3350; 3120; 1655; 1535; 1500
15	3350; 3100; 1650; 1530; 1510;
16	3340; 3105; 1650; 1530
17	3340; 3100; 1655; 1530
18	3350; 3100; 1710; 1645; 1540
19	3360; 3115; 1720; 1665; 1540; 1506;
20	3350; 3113; 1720; 1659; 1549; 1506
21	3340; 1710; 1645; 1540; 1500
22	3304; 1653; 1540
23	3333; 1657; 1547; 1092; 1038;
24	3354; 3113; 1653; 1550; 1506; 1245

TAULUKKO V – IR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	I.R. (nujol cm $^{-1}$)
25	3348; 3111; 1660; 1548; 1507; 1245
26	3315; 1653; 1539; 1238
27	3361; 3113; 1720; 1653; 1531; 1507; 1092
28	3333; 1653; 1547; 1494; 1243
29	3356; 3114; 1653; 1508; 1088
30	3360; 1670; 1505; 1200
31	3351; 3115; 1653; 1549; 1509; 1250
32	3370; 3110; 1655; 1545; 1500; 1245
33	3350; 1655; 1530; 1490; 1220
34	3360; 3105; 1650; 1545; 1510; 1240
35	3320; 1747; 1650; 1540; 1225
36	3330; 1662; 1547; 1496; 1201

TAULUKKO V – IR-spektrit (jatkuu)

Yhdisteen n:o	I.R. (nujol cm $^{-1}$)
37	3327; 1730; 1653; 1464; 1377
38	3355; 1720; 1657; 1543; 1377
39	3321; 1717; 1652; 1545
40	3337; 1665; 1549
41	3341; 1721; 1653; 1548; 1377
42	3335; 1722; 1647; 1543
43	3317; 1665; 1539
44	3317; 1720; 1649; 1545

TAULUKKO VI

UV-arvot λ max ($E^{1\%}_{1cm}$)

Yhdisteen n:o	MeOH	HCl 0.1N	Fosfaattipuskuri pH 7.38	KOH 0.1N
1	309 (290.9)	312	309 (247.9)	309 (252.7)
2	309 (257.5)	310 (222.6)	311	309 (226.3)
3	309 (297.5)	312	309 (229.6)	309 (235.8)
4	309 (245.1)	312	308 (234.7)	308 (234.1)
5	308 (173.8)	312	309 (150.0)	305 (181.2)
6	309 (277.1)	313	309 (229.8)	309 (236.7)
7	309 (258.6)	313	309 (207.9)	309 (218.9)
8	309 (279.8)	311	309 (225.9)	309 (229.4)
9	309 (261.9)	313	308 (228.1)	309 (235.0)
10	309 (279.3)	314	309 (241.8)	309 (251.1)
11	309 (216.8)	310 (178.5)	312	310 (194.9)
12	309 (226.2)	310 (188.3)	311	309 (202.4)

TAULUKKO VI (jatkuu)

U.V. DATA λmax ($E^{1\%}_{1cm}$)

Yhdisteen n:o	MeOH	HCl 0.1N	Fosfaattipuskuri pH 7.38	KOH 0.1N
13	308 (237.9)	314	308 (247.4)	308 (260.3)
14	309 (263.4)	313	313	314
15	309 (222.6)	313	314	304 (169.8)
16	309 (235.6)	313	312	312
17	309 (230.3)	312	312	312
18	309 (288.8)	313	309 (239.4)	309 (248.0)
19	309 (283.2)	312	309 (220.3)	309 (230.1)
20	309	314	309	309
21	309 (271.6)	313	311 (221.6)	309 (221.6)
22	309 (190.9)	309 (152.2)	308 (160.4)	309 (165.6)
23	309 (242.2)	310 (182.2)	309 (200.9)	309 (200.9)
24	309	312	310	309

TAULUKKO VI (jatkuu)

U.V. DATA λmax ($E^{1\%}_{1cm}$)

Yhdisteen n:o	MeOH	HCl 0.1N	Fosfaattipuskuri pH 7.38	KOH 0.1N
25	309	312	310	309
26	309 (260.0)	313	310 (197.7)	310 (208.6)
27	310 (264.6)	313	310 (227.4)	310 (232.1)
28	309 (260.5)	314	310 (186.8)	310 (203.6)
29	309 (243.4)	311	312	311
30	309 (248.5)	311	311	309
31	305 (253.7)	310	310	313 (249.5)
32	309 (267.9)	310 (234.9)	312	312
33	309 (247.5)	311 (234.4)	314	312
34	310 (224.0)	309 (198.2)	310	312
35	308 (269.8)	314	313	313
36	309 (243.9)	309 (205.5)	312	313

TAULUKKO VI (jatkuu)

U.V. DATA λmax ($E^{1\%}_{1cm}$)

Yhdisteen n:o	MeOH	HCl 0.1N	Fosfaattipuskuri pH 7.38	KOH 0.1N
37	309 (255.1)	312	314	312
38	308	308	308	308
39	308 (247.9)	312	308 (201.3)	308 (215)
40	309 (304.3)	312	309 (235.9)	309 (262.0)
41	309 (256.4)	312	309 (215.1)	309 (228.6)
42	309	312	309	307
43	309 (253.6)	313	309 (208.4)	309 (235.4)
44	309 (264.9)	314	309 (208.1)	309 (223.7)

Keksinnön mukaisten yhdisteiden antimikrobinen aktiivisuus voidaan todeta joukolla standarditestejä *in vitro*.

MIC-arvot kannoille *Propionibacterium acnes* ja *Bacteroides fragilis* määritetään agarlaimennuksella (ymppi $10^4/10^5$ CFU/täplä). MIC-arvot muille organismeille määritetään mikroliemilaimennuksella (ymppi 10^4 - 10^5 CFU/ml). Inkubointiajat ovat 18-24 tuntia, paitsi kannoilla *Haemophilus influenzae, P. acnes, B. fragilis* (48 tuntia). Kaikkia organismeja inkuboidaan 37 °C:ssa; kantaa *H. influenzae* inkuboidaan 5%:isessa CO_2-atmosfäärissä, anaerobeja anaerobisessa kaasuseoksessa. Käyteyt alustat ovat: Iso-Sensitest-liemi (Oxoid) (*Staphylococci, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Proteus vulgaris;* aivo-sydän-infuusioliemi (Difco) + 1 % Supplement C:tä (Difco) (*H. influenzae*).

TAULUKOSSA VII on esitetty pienimmät estävät konsentraatio (the minimal inhibitory concentrations, MIC, µg/ml) eräille mikro-organismeille.

TAULUKKO VII – (MIC, µg/ml)

Kanta	Yhdiste esimerkistä n:o				
	1	2	6	7	8
Staph. aureus L165 Tour	0.5	0.13	<0.13	0.25	0.25
Staph. epidermidis L147 ATCC 12228	1	0.25	1	0.5	2
Staph. haemolyticus L602	4	16	1	4	2
Strep. pneumoniae L44 UC41	8	>128	2	4	4
Strep. faecalis L149 ATCC 7080	0.25	0.06	<0.13	<0.13	0.25
Prop. acnes L1014 ATCC 6919	<0.13	0.06	<0.13	<0.13	<0.13
Bact. fragilis L1010 ATCC 23745	8	>128	>128	>128	32
Haemophilus Influenzae type B	8	>128	32	128	64
Esch. coli L47 SKF 12140	>128	>128	>128	>128	>128
Prot. vulgaris ATCC 881	>128	>128	>128	>128	>128

TAULUKKO VII – (MIC, μg/ml) (jatkuu)

Kanta	Yhdiste esimerkistä n:o				
	14	18	19	20	26
Staph. aureus L165 Tour	0.06	0.25	0.06	0.25	0.25
Staph. epidermidis L147 ATCC 12228	0.13	0.25	0.06	0.25	0.25
Staph. haemolyticus L602	0.25	1	0.25	0.25	0.5
Strep. pneumoniae L44 UC41	>128	1	0.25	2	2
Strep. faecalis L149 ATCC 7080	0.06	0.13	0.06	<0.13	0.13
Prop. acnes L1014 ATCC 6919	0.03	0.016	0.008	0.03	0.008
Bact. fragilis L1010 ATCC 23745	>128	2	4	>128	32
Haemophilus Influenzae type B	>128	2	2	>128	8
Esch. coli L47 SKF 12140	>128	>128	>128	>128	>128
Prot. vulgaris ATCC 881	>128	>128	>128	>128	>128

TAULUKKO VII – (MIC, µg/ml) (jatkuu)

Kanta	Yhdiste esimerkistä n:o			
	27	28	32	35
Staph. aureus L165 Tour	0.25	0.13	0.5	0.13
Staph. epidermidis L147 ATCC 12228	0.5	0.5	0.5	0.13
Staph. haemolyticus L602	1	1	0.5	0.5
Strep. pneumoniae L44 UC41	8	2	1	>128
Strep. faecalis L149 ATCC 7080	1	0.06	0.25	0.06
Prop. acnes L1014 ATCC 6919	0.03	0.008	0.13	0.004
Bact. fragilis L1010 ATCC 23745	64	>128	>128	>128
Haemophilus Influenzae type B	8	>128	>128	>128
Esch. coli L47 SKF 12140	>128	>128	>128	>128
Prot. vulgaris ATCC 881	>128	>128	>128	>128

TAULUKKO VII – (MIC, μg/ml) (jatkuu)

Kanta	Yhdiste esimerkistä n:o				
	36	37	38	39	40
Staph. aureus L165 Tour	0.13	0.03	32	0.13	0.25
Staph. epidermidis L147 ATCC 12228	0.13	0.06	32	0.25	0.25
Staph. haemolyticus L602	0.13	0.13	64	2	1
Strep. pneumoniae L44 UC41	4	>128	>128	4	1
Strep. faecalis L149 ATCC 7080	0.13	0.06	16	≤0.13	≤0.13
Prop. acnes L1014 ATCC 6919	0.06	0.004	0.25	≤0.13	-
Bact. fragilis L1010 ATCC 23745	>128	>128	>128	8	4
Haemophilus Influenzae type B	>128	>128	>128	1	1
Esch. coli L47 SKF 12140	>128	>128	>128	>128	>128
Prot. vulgaris ATCC 881	>128	>128	>128	>128	>128

TAULUKKO VII – (MIC, µg/ml) (jatkuu)

Kanta	Yhdiste esimerkistä n:o			
	41	42	43	44
Staph. aureus L165 Tour	0.25	0,13	0.13	0.13
Staph. epidermidis L147 ATCC 12228	0.5	0,13	0.5	0.5
Staph. haemolyticus L602	1	0.5	0.5	1
Strep. pneumoniae L44 UC41	2	1	0.5	1
Strep. faecalis L149 ATCC 7080	≤0.13	0.13	0.13	0.06
Prop. acnes L1014 ATCC 6919	≤0.13	0.016	0.016	0.016
Bact. fragilis L1010 ATCC 23745	4	>128	>128	>128
Haemophilus Influenzae type B	1	4	>128	>128
Esch. coli L47 SKF 12140	>128	>128	>128	>128
Prot. vulgaris ATCC 881	>128	>128	>128	>128

Ominaisuuksiensa perusteella keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää aktiivisina aineosina lääkeaineiden valmistamiseksi ihmisen tai eläimen hoitamiseksi.

Erityisesti kaavan I mukaisten antibiootisten GE 2270 yhdisteiden amidijohdannaiset ovat antimikrobisia aineita, jotka ovat ensi sijassa aktiivisia gram-positiivisia bakteereja sekä gram-positiivisia että gram-negatiivisia anaerobeja vastaan.

Keksinnön mukaisten antibioottisten aineiden pääasiallinen terapeuttinen indikaatio on näin ollen sellaisten infektioiden hoito, joissa esiintyy niille herkkiä mikroorganismeja.

Käsite "hoito" tarkoittaa ennaltaehkäisyä, hoitoa ja parantamista.

Potilas, joka saa tällaista hoitoa, on mikä tahansa sitä tarvitseva eläin, mukaan lukien kädelliset, erityisesti ihmiset, ja muut imettäväiset, kuten hevonen, karja, sika ja lammas ja siipikarja sekä yleensä lemmikit.

Keksinnön mukaiset yhdisteet voidaan annostaa sellaisenaan tai seoksessa farmaseuttisesti hyväksyttävien kantoaineiden kanssa ja ne voidaan annostaa myös toisiin antimikrobisiin aineisiin yhdistettynä. Näin ollen yhdistelmäterapia käsittää aktiivisten yhdisteiden peräkkäisen, samanaikaisen ja erikseen tapahtuvan annostuksen siten, että ensimmäisenä annostettavan yhdisteen terapeuttiset vaikutukset eivät vielä ole kokonaan hävinneet kun myöhemmin annostettava yhdiste annetaan.

Edullinen farmaseuttinen valmiste on valmiste, joka soveltuu tooppiseen annostukseen vahingoittumattomalla tai vahingoittuneelle iholle tai limakalvomembraanille. Esimerkkejä tällaisista valmisteista ovat jauheet, salvat,

voiteet ja lotionit. Täyteaineita näissä valmisteissa ovat tavanomaiset, farmaseuttisesti hyväksyttävät kantoaineet, kuten rasvaiset salvaperusaineet (esim. setyyliesterivaha, öljyhappo, oliiviöljy, parafiini, valaanpääöljy, tärkkelysglyseriitti), absorboivat salvaperusaineet (esim. vedetön lanoliini, hydrofiilinen vaseliini), emulsion rasvaperusaineet (esim. setyylialkoholi, glyseryylimonostearaatti, lanoliini, stearii nihappo), vesiliukoiset salvaperusaineet (esim. glykolieetterit ja niiden johdannaiset, joita ovat polyeteeniglykolit, poly(oksi-1,2-etaanidiyyli)-alfa-hydro-omega-hydroksioktadekanoaatti, polysorbaatit ja polyeteeniglykolien monostearaatit).

Nämä valmisteet voivat sisältää muita tunnettuja täyteaineita, kuten säilöntäaineita ja ne valmistetaan alalla tunnetulla ja viitekäsikirjoissa kuvatulla tavalla, kuten Remington's Pharmaceutical Sciences, 17.painos, 1985, Mack Publishing Co.

Keksinnön mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa myös sellaiseksi valmisteeksi, joka on sopiva parenteraaliseen annostukseen, alalla sinänsä tunnettujen menetelmien mukaisesti. Esimerkiksi keksinnön mukainen yhdiste valmistetaan yhdessä polypropeeniglykolin tai dimetyyliasetamidin ja pinta-aktiivisen aineen, kuten polyoksieteenisorbitaanimono-oleaatin tai polyetoksyloidun risiiniöljyn, kanssa.

Edullinen valmiste parenteraaliseen annostukseen sisältää seuraavat täyteaineet: Cremophor® EL (polyoksyyli 35 risiiniöljy USP/NF) 20 %, propeeniglykoli 5-10 %.

Mieluimmin tätä valmistetta käytetään i.v.-annostukseen hoidettaessa mitä tahansa infektiota, johon liittyy keksinnön mukaiselle antibiootille herkkä mikro-organismi.

Esimerkki sopivasta koostumuksesta käytettäväksi i.v.:sti, on seuraava:

yhdiste nro 19	100 mg
propeeniglykoli	1 ml
vesi injektioon q.s.	5 ml

fosfaattipuskuri pH 8-8,5.

Hoidettaessa pseudomembraanista koliittia tai muita sairauksia, joille on ominaista anaerobien esiintyminen maha-suoli-alueella, keksinnön mukaisten yhdisteiden tehokas annos voidaan annostaa oraalisesti sopivassa farmaseuttisessa muodossa, kuten kapselina tai vesipitoisena suspensiona.

Aktiivisen aineosan annos riippuu monista tekijöistä, mukaan lukien hoidettavan potilaan tyyppi, ikä ja vaste, spesifinen aktiivinen aine ja valmiste, joka valitaan annostukseen, annostuskaavio, jne.

Yleensä tehokkaita antimikrobisia annoksia käytetään yhtenä ainoana yksikköannosmuotona. Näiden annosmuotojen toistetut annokset, esim. 2-6 kertaa päivässä, ovat yleensä edulliset. Tehokas annos voi yleensä olla 0,5-50 mg/painokilo/päivä.

Edullinen tooppinen valmiste on salva, joka sisältää keksinnön mukaista yhdistettä 1 %:sta 10 %:iin.

Joka tapauksessa määräävä lääkäri pystyy määrittämään tietyssä tilanteessa potilaalle annettavan optimiannoksen.

Paitsi että keksinnön mukaisia yhdisteitä käytetään lääkkeinä ihmisten ja eläinten terapiassa, niitä voidaan käyttää myös eläinten kasvua edistävinä aineina.

Tähän tarkoitukseen keksinnön mukaista yhdistettä annostetaan oraalisesti sopivassa ravinnossa. Tarkka käytetty konsentraatio on sellainen, joka vaaditaan, jotta aktiivinen aine edistää kasvua tehokkaassa määrin kulutettaessa normaalit määrät ravintoa.

Keksinnön mukaisen aktiiviyhdisteen lisäys eläinrehuun suoritetaan mieluimmin valmistamalla sopiva esiseos rehusta, joka sisältää aktiiviyhdistettä tehokkaassa määrin, ja tämä esiseos yhdistetään valmisannokseen.

Vaihtoehtoisesti välituotteena valmistettu konsentraatti tai ravintolisäaine, joka sisältää aktiivisen aineen, voidaan sekoittaa ravintoon. Tapa, jolla tällaiset ravintoesiseokset ja valmisannokset voidaan valmistaa ja annostaa, on kuvattu viitekirjoissa (kuten "Applied Animal Nutrition", W.H.Freeman ja Co., S.Francisco, USA, 1969 tai "Livestock Feeds and Feeding", O ja B kirjat, Corvallis, Oregon, USA, 1977).

Seuraavat esimerkit kuvaavat edelleen keksintö eikä niitä tule pitää millään tavoin keksintöä rajoittavina.

MENETELMÄ A - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n tekijän A_3 reaktio valitun amiinin kanssa.

Esimerkki 1: Yhdisteen nro 15, 29, 30, 32, 33 valmistaminen

Liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 1 mmooli GE 2270:n tekijää A_3 (joka valmistettiin kuten eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 406745 kuvataan) 10 ml:ssa dimetyyliformamidia (DMF), lisättiin 0 °C:ssa 1,2 mmoolia valittua amiinia, 1,4 mmoolia trietyyliamiinia (TEA) ja 1,2 mmoolia difenyylifosforiatsidaattia (DPPA). (Jos käytettiin valitun amiinin suolaa (kloridia, p-tolueenisulfonaattia, jne.) oli käytettävä kaksinkertaista

määrää TEA:ta.) Lämpötilan annettiin kohota huoneen lämpötilaan ja sekoittamista jatkettiin noin 4 tuntia. Sen jälkeen reaktioseos hapotettiin 1 N vesipitoisella HCl:llä pH-arvoon noin 3, jonka jälkeen laimennettiin vedellä tuotteen saostamiseksi täydellisesti. Märkä, kiinteä aine kuivattiin ilmassa, jonka jälkeen se puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 3-5%:inen metanoli kloroformissa. Otsikossa mainitun yhdisteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin haihdutettiin. Kiinteä aine trituroitiin etyylieetterin kanssa, saatiin otsikossa mainittu yhdiste hienona jauheena.

MENETELMÄ A1 - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n tekijän A_3 reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää toisen reaktiokykyisen funktionaalisen ryhmän (ryhmiä), joka (jotka kaikki) on suojattu, ja lopuksi suojaryhmä (-ryhmät) poistetaan.

Esimerkki 2: Yhdisteen nro 34, 36 valmistaminen

Reaktio suoritettiin pääasiallisesti kuten esimerkissä 1 kuvataan. Heti kun reaktiotuote oli puhdistettu pikakromatografisesti, 1 mmooli saatua, kiinteää ainetta käsiteltiin 7 ml:lla kylmää trifluorietikkahappoa (TFA). Suspensiota pyöritettiin muutaman minuutin ajan kunnes saatiin liuos ja TFA haihdutettiin tyhjössä kylmässä. Kumimainen tuote, joka sisälsi vielä jälkiä TFA:sta, käsiteltiin sen jälkeen etyylieetterillä ja otsikossa mainittu yhdiste saatiin trifluoriasetaattisuolana hienojakoisen jauheen muodossa.

Esimerkki 3: Yhdisteen nro 1, 3-10, 18-21, 39 valmistaminen

Reaktio suoritettiin pääasiallisesti kuten esimerkissä 1 kuvataan. Heti kun reaktiotuote oli puhdistettu pikakro-

matografisesti, 1 mmooli saatua, kiinteää ainetta liuotettiin 20 ml:aan dioksaania ja lisättiin 1,2 ml 1 N vesipitoista NaOH:ta samalla sekoittaen huoneen lämpötilassa. Viiden tunnin kuluttua liuos hapotettiin 1 N vesipitoisella HCl:llä pH-arvoon 2 ja laimennettiin vedellä otsikossa mainitun yhdisteen saostamiseksi täydellisesti, se suodatettiin ja annettiin kuivua ilmassa, saatiin otsikossa mainittu yhdiste hienona jauheena.

Esimerkki 4: Yhdisteen nro 2 valmistaminen

Reaktio suoritettiin pääasiallisesti kuten esimerkissä 3 kuvataan. Heti kun esteriryhmän hydrolyysi oli kokonaan suoritettu ja yhdisteen oli annettu kuivua ilmassa, 1 mmooli saatua, kiinteää ainetta liuotettiin 20 ml:aan TFA:ta ja lisättiin 50 mmoolia tioanisolia samalla sekoittaen huoneen lämpötilassa, kuten kuvaavat Y.Kiso *et al.* julkaisussa Chem.Pharm.Bull. 28, 673, 1980. TFA haihdutettiin 3,5 tunnin kuluttua tyhjössä kylmässä ja jäännös otettiin talteen minimimäärään 1%:ista metanolia kloroformissa. Lisäämällä etyylieetteriä aikaansaatiin otsikossa mainitun yhdisteen saostuminen, yhdiste suodatettiin, pestiin vielä etyylieetterillä ja kuivattiin tyhjössä, saatiin otsikossa mainitun yhdisteen trifluoriasetaattisuola hienona jauheena.

Esimerkki 4bis: Yhdisteen nro 37 valmistaminen

Reaktio suoritettiin pääasiallisesti kuten esimerkissä 1 kuvataan. Heti kun lähtöaine oli hävinnyt reaktioseoksesta, lisättiin vettä ja saatu sakka suodatettiin, pestiin vielä vedellä ja annettiin kuivua ilmassa. Sen jälkeen raakamateriaali liuotettiin 3 ml:aan THF:ää ja sekoitettiin yön yli huoneen lämpötilassa 10 %:isen vesipitoisen HCl:n läsnäollessa. Laimentamalla vedellä aikaansaatiin tuotteen täydellinen saostuminen, tuote suodatettiin ja sen annettiin kuivua ilmassa. Sen jälkeen kiinteä aine

puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 2-4%:inen metanoli kloroformissa. Otsikossa mainitun yhdisteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin haihdutettiin, saatiin vaaleankeltainen jauhe.

MENETELMÄ B - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n tekijän A_3 reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää suojaamattomia happo-osia.

Esimerkki 5: Yhdisteen nro 19, 22-28, 40, 41 valmistaminen

1,1 mmoolia DPPA:ta lisättiin 0 °C:ssa liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 1 mmooli GE 2270:n tekijää A_3 ja 1,5 mmoolia TEA:ta 10 ml:ssa DMF:ää. Lämpötilan annettiin kohota huoneen lämpötilaan ja sekoittamista jatkettiin vielä 4,5 tunnnin ajan. Sen jälkeen liuokseen lisättiin huoneen lämpötilassa 1,5 mmoolia valittua amiinia ja 2 mmoolia TEA:ta ja sekoittamista jatkettiin samassa lämpötilassa 5 lisätuntia. (Jos valittu amiini sisälsi useamman kuin yhden happoryhmän, TEA:n määrä säädettiin siten, että se vapautti aminoryhmän). Sen jälkeen reaktioseos hapotettiin 1 N vesipitoisella HCl:llä pH-arvoon noin 2 ja sitten laimennettiin vedellä tuotteen saostamiseksi täydellisesti. Märkä, kiinteä aine kuivattiin ilmassa, jonka jälkeen se puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 5-10%:inen metanoli kloroformissa. Otsikossa mainitun yhdisteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin haihdutettiin. Kiinteä aine trituroitiin etyylieetterin kanssa, saatiin otsikossa mainittu yhdiste hienona jauheena.

MENETELMÄ B1 - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n tekijän A_3 reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää reaktiokykyisen funktionaalisen ryhmän (ryhmiä), jotka kaikki ovat

erilailla suojattuja, suojaamattoman happoryhmän (-ryhmien) lisäksi, ja myöhemmin tapahtuva suojaryhmän (-ryhmien) poistaminen.

Esimerkki 6: Yhdisteen nro 11,12 valmistaminen

Reaktio suoritettiin pääasiallisesti kuten esimerkissä 5 kuvataan. Heti kun reaktiotuote oli puhdistettu pikakromatografisesti, 1 mmooli saatua, kiinteää ainetta liuotettiin 20 ml:aan TFA:ta ja lisättiin 50 mmoolia tioanisolia samalla sekoittaen huoneen lämpötilassa. TFA haihdutettiin 3,5 tunnin kuluttua tyhjössä kylmässä ja jäännös otettiin talteen minimimäärään 1%:ista metanolia kloroformissa. Etyylieetterilisäys indusoi otsikossa mainitun yhdisteen saostumisen, yhdiste suodatettiin, pestiin vielä etyylieetterillä ja kuivattiin tyhjössä, saatiin otsikossa mainitun yhdisteen trifluoriasetaattisuola hienona jauheena.

MENETELMÄ C: Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n tekijän A_3 valittujen amidijohdannaisten reaktio valitun reagenssin kanssa.

Esimerkki 7: Yhdisteen nro 14, 15, 16, 17 valmistaminen yhdisteestä nro 1, 5, 10 ja vastaavasti 6.

Liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 1 mmooli GE 2270:n tekijän A_3 sopivaa amidijohdannaista (valmistettu edellisissä esimerkeissä kuvatulla tavalla) 10 ml:ssa DMF:ää, lisättiin 0 °C:ssa 1,2 mmoolia valittua amiinia, 1,4 mmoolia TEA:ta ja 1,2 mmoolia DPPA:ta. (Jos käytettiin valitun amiinin suolaa (kloridia, p-tolueenisulfonaattia, jne.) täytyi käyttää kaksinkertaista määrää TEA:ta.) Lämpötilan annettiin kohota huoneen lämpötilaan ja sekoittamista jatkettiin noin 4 tuntia. Sen jälkeen reaktioseos hapotettiin 1 N vesipitoisella HCl:llä pH-arvoon noin 3, jonka jälkeen laimennettiin vedellä tuot-

teen saostamiseksi täydellisesti. Märkä, kiinteä aine kuivattiin ilmassa, jonka jälkeen se puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 3-5%:inen metanoli kloroformissa. Otsikossa mainitun yhdisteen sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin haihdutettiin. Kiinteä aine trituroitiin etyylieetterin kanssa, saatiin otsikossa mainittu yhdiste hienona jauheena.

MENETELMÄ C1 - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n tekijän A_3 valitun amidijohdannaisen reaktio valitun reagenssin kanssa, joka sisältää toisen reaktiokykyisen funktionaalisen ryhmän (ryhmiä), joka (jotka kaikki) on suojattu, ja myöhemmin tapahtuva suojaryhmän (-ryhmien) poistaminen.

Esimerkki 8: Yhdisteen nro 13 valmistaminen yhdisteestä nro 3

Reaktio suoritettiin kuten esimerkissä 7 kuvataan. Heti kun reaktiotuote oli puhdistettu pikakromatografisesti, 1 mmooli saatua, kiinteää ainetta liuotettiin 20 ml:aan dioksaania ja lisättiin 1,2 ml 1 N vesipitoista NaOH:ta samalla sekoittaen huoneen lämpötilassa. Liuos hapotettiin 5 tunnin kuluttua 1 N vesipitoisella HCl:llä pH-arvoon 2 ja laimennettiin vedellä otsikossa mainitun yhdisteen saostamiseksi täydellisesti, yhdiste suodatettiin ja sen annettiin kuivua ilmassa, saatiin otsikossa mainittu yhdiste hienona jauheena.

Esimerkki 9: Yhdisteen nro 31 valmistaminen yhdisteestä nro 36.

Liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 1 mmooli GE 2270:n tekijän A_3 sopivaa amidijohdannaista (valmistettu edellisissä esimerkeissä kuvatulla tavalla) 10 ml:ssa 10%:ista metanolista kloroformia, lisättiin huoneen läm-

pötilassa 1,2 mmoolia TEA:ta ja 1,1 mmoolia valittua reagenssia (katso taulukko). Liuotin haihdutettiin 20 minuutin kuluttua tyhjössä ja jäännös käsiteltiin 5%:isella vesipitoisella Na_2CO_3:lla. Saatu kiinteä aine suodatettiin, pestiin vielä 5%:isella Na_2CO_3:lla ja vedellä ja lopuksi liuotettiin uudestaan 10 ml:aan metanolia. Tähän liuokseen lisättiin 0,5 ml vettä ja 0,1 mmoolia p-tolueenisulfonihappoa ja reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa yön yli. Sen jälkeen liuos haihdutettiin pieneen tilavuuteen (noin 2ml) tyhjössä ja lisättiin vettä otsikossa mainitun yhdisteen saostamiseksi, joka, sen jälkeen kun se kuivattiin ilmassa, saatiin hienona jauheena.

Esimerkki 9bis: Yhdisteen nro 38 valmistaminen yhdisteestä nro 37.

Liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 0,23 mmoolia GE 2270:n tekijän A_3 sopivaa amidijohdannaista (valmistettu edellisissä esimerkeissä kuvatulla tavalla) 40 ml:ssa etanolia, lisättiin huoneen lämpötilassa 9,2 mmoolia etikkahappoa, 9,2 mmoolia natriumasetaattia ja 0,506 mmoolia valittua reagenssia (katso taulukko II). Kahden tunnin kuluttua lisättiin 0,46 mmoolia $NaBH_4$:ää (Fluka) ja sekoittamista jatkettiin yön yli samassa lämpötilassa. Haihduttamalla liuotin saatiin raakamateriaali, joka pestiin 10 ml:lla 1 N HCl:ää, suodatettiin ja annettiin kuivua ilmassa. Sen jälkeen kiinteä aine puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 0-10%:inen metanoli dikloorimetaanissa. Otsikossa mainitun yhdisteen metyyliesterin (välituote) sisältävät fraktiot yhdistettiin ja liuotin haihdutettiin, saatiin kiinteä aine, joka liuotettiin uudestaan 2 ml:aan dioksaania ja käsiteltiin yön yli 1,2 moolin ylimäärällä 1 N NaOH:ta huoneen lämpötilassa. Haihduttamalla liuotin saatiin kiinteä aine, joka puhdistettiin edelleen trituroimalla etyyliasetaatin ja meta-

nolin 1:1-seoksella, saatiin otsikossa mainittu yhdiste hienona jauheena.

MENETELMÄ D - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n tekijän A_2 reaktio valitun amiinin kanssa.

Esimerkki 10: Yhdisteen nro 35 valmistaminen

1 mmooli GE 2270:n tekijää A_2 (valmistettu eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 406745 kuvatulla tavalla) liuotettiin 10 ml:aan kyllästettyä metanolista ammoniakkiliuosta. Liuoksen annettiin seistä 3 päivää huoneen lämpötilassa, jonka jälkeen se haihdutettiin tyhjössä. Jäännös otettiin talteen 2 ml:aan metanolia ja otsikossa mainittu yhdiste saostettiin vedellä, suodatettiin ja annettiin kuivua ilmassa. Trituroitiin etyylieetterin kanssa, saatiin otsikossa mainittu yhdiste hienona jauheena.

MENETELMÄ E - Keksinnön mukaisen yhdisteen suolan valmistaminen.

Esimerkki 11: Yhdisteen nro 19 arginiinisuolan valmistaminen.

Suspensioon, jossa oli 3 g yhdistettä nro 19 (2,42 mmoolia) 180 ml:ssa dioksaania, lisättiin samalla sekoittaen liuos, jossa oli 423 mg L-arginiinia (2,42 mmoolia) 120 ml:ssa vettä, ja ei-kirkas liuos lyofilisoitiin halutun suolan talteenottamiseksi.

MENETELMÄ F - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n komponentin C_{2a} (t.s. kaavan II mukainen yhdiste, jossa R on metoksimetyyli, R_1 on metyyli, R_4 on hydroksimetyyli ja W on COOH) reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää toisen reaktiokykyisen funktionaalisen ryhmän (ryhmiä), joka

(jotka kaikki) on suojattu, ja myöhemmin tapahtuva suojaryhmän (-ryhmien) poistaminen.

Esimerkki 12: Yhdisteen nro 42 valmistaminen.

Reaktio suoritettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla käyttäen lähtöaineena GE 2270:n komponenttia C_{2a} tekijän A_3 sijasta.

MENETELMÄ G - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n komponentin C_{2a}, joka on kuvattu menetelmässä F, reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää suojaamattomia happo-osia.

Esimerkki 13: Yhdisteen nro 42 valmistaminen.

Reaktio suoritettiin esimerkissä 5 kuvatulla tavalla käyttäen lähtöaineena GE 2270:n komponenttia C_{2a} tekijän A_3 sijasta.

MENETELMÄ H - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n komponentin D_1 (t.s. kaavan II mukainen yhdiste, jossa R ja R_1 ovat vety, R_4 on metyyli ja W on COOH) reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää toisen reaktiokykyisen funktionaalisen ryhmän (ryhmiä), joka (jotka kaikki) on suojattu, ja myöhemmin tapahtuva suojaryhmän (-ryhmien) poistaminen.

Esimerkki 14: Yhdisteen nro 43 valmistaminen.

Reaktio suoritettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla käyttäen lähtöaineena GE 2270:n komponenttia D_1 tekijän A_3 sijasta.

MENETELMÄ I - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n komponentin D_1, joka on kuvattu menetelmässä H, reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää suojaamattomia happo-osia.

Esimerkki 15: Yhdisteen nro 43 valmistaminen.

Reaktio suoritettiin esimerkissä 5 kuvatulla tavalla käyttäen lähtöaineena GE 2270:n komponenttia D_1 tekijän A_3 sijasta.

MENETELMÄ J - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n komponentin D_2 (t.s. kaavan II mukainen yhdiste, jossa R on hydroksimetyyli, R_1 ja R_4 ovat metyyli ja W on COOH) reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää toisen reaktiokykyisen funktionaalisen ryhmän (ryhmiä), joka (jotka kaikki) on suojattu, ja myöhemmin tapahtuva suojaryhmän (-ryhmien) poistaminen.

Esimerkki 16: Yhdisteen nro 44 valmistaminen.

Reaktio suoritettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla käyttäen lähtöaineena GE 2270:n komponenttia D_2 tekijän A_3 sijasta.

MENETELMÄ K - Lähtöaineena käytetyn GE 2270:n komponentin D_1, joka on kuvattu menetelmässä J, reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää suojaamattomia happo-osia.

Esimerkki 17: Yhdisteen nro 44 valmistaminen.

Reaktio suoritettiin esimerkissä 5 kuvatulla tavalla käyttäen lähtöaineena GE 2270:n komponenttia D_2 tekijän A_3 sijasta.

MENETELMÄ L - Antibiootin GE 2270 pienempien komponenttien (C_{2a}, D_1, D_2 ja E) seoksen (lähtöaine) reaktio valitun amiinin kanssa, joka sisältää toisen reaktiokykyisen funktionaalisen ryhmän (ryhmiä), joka (jotka kaikki) on suojattu, ja myöhemmin suoritettava suojaryhmän (-ryhmien) poistaminen.

Esimerkki 18:

Reaktio suoritettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla käyttäen lähtöaineena antibiootin GE 2270:n pienempien komponenttien (C_{2a}, D_1, D_2 ja E) seosta tekijän A_3 sijasta ja metyyli-6-aminokaproaattihydrokloridia (Fluka). R_t (min) viittaa HPLC-menetelmän M, joka on esitetty HPLC-analyysiosassa.

Kun Y = $-NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOCH_3$, R_t (min) on 43,43 GE 2270:n tekijälle C_{2a}; 39,42 GE 2270:n tekijälle D_1; 42,29 GE 2270:n tekijälle D_2 ja vastaavasti 37,41 GE 2270:n tekijälle E.

Kun Y = $-NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$, R_t (min) on 17,23 GE 2270:n tekijälle C_{2a}; 15,76 GE 2270:n tekijälle D_1; 16,64 GE 2270:n tekijälle D_2 ja vastaavasti 15,13 GE 2270:n tekijälle E.

MENETELMÄ M - Lähtöaineena käytetyn antibiootin GE 2270 pienempien komponenttien (C_{2a}, D_1, D_2 ja E) valitun seoksen reaktio amiinin kanssa, joka sisältää suojaamattomia happo-osia.

Esimerkki 19:

Reaktio suoritettiin esimerkissä 5 kuvatulla tavalla käyttäen lähtöaineena antibiootin GE 2270 pienempien komponenttien (C_{2a}, D_1, D_2 ja E) valittua seosta tekijän A_3 sijasta ja 6-aminokaproiinihappoa (Fluka).

R_t (min) viittaavat menetelmään M, joka on esitetty HPLC-analyysiosassa ja on 17,23 GE 2270:n tekijälle C_{2a}; 15,76 GE 2270:n tekijälle D_1; 16,64 GE 2270:n tekijälle D_2 ja vastaavasti 15,13 GE 2270:n tekijälle E.

LÄHTÖAINEIDEN VALMISTAMINEN

1. Seuraavat lähtöaineet on hankittu Fluka'lta (Fluka Chemika-Biochemika, Buchs, Sveitsi):
glysiinietyyliesterihydrokloridi,
L-treoniinimetyyliesterihydrokloridi,
L-tyrosiinimetyyliesterihydrokloridi,
L-leusiinimetyyliesterihydrokloridi,
L-fenyylialaniinimetyyliesterihydrokloridi,
L-metioniinimetyyliesterihydrokloridi,
L-proliinimetyyliesterihydroklori,
L-treoniinimetyyliesterihydrokloridi,
Na-Cbz-L-lysiini,
metyyli-4-aminobutyraattihydrokloridi,
metyyli-6-aminokaproaattihydrokloridi,
6-aminokaproiinihappo,
4-(metyyliamino)bentsoehappo,
piperidiini-4-karboksyylihappo,
N-metyyli-D-glukamiini,
D(+)-glukoosiamiinihydrokloridi,
2-dimetyyliaminoetyyliamiini,
aminoasetaldehydidimetyyliasetaali,
β-alaniinietyyliesterihydrokloridi.

2. Seuraavat lähtöaineet on hankittu Sigma'lta (Sigma, Biochemicals Organic Compounds, St.Louis, USA):
Nδ-Cbz-L-ornitiini,
L-asparagiinihappodimetyyliesterihydrokloridi.

3. Seuraavat lähtöaineet hankittiin Aldrich'ilta (Aldrich, Catalogo Prodotti di Chimica Fine, Milano, Italia):
L-proliiniamidi,
tauriini,
3-amino-1-propaanisulfonihappo,
3-aminopropyylifosfonihappo,
4-amino-1-bentsyylipiperidiini.

4. Antibiootin GE 2270 tuottaminen antibiootin GE 2270 tekijöiden A_1, B_1, B_2, C_1, C_2, C_{2a}, D_1, D_2 ja E valmistamiseksi

Kannan *Planobispora rosea* ATCC 53773 viljelmää kasvatetaan kaurajauhoagarvinopinnalla kaksi viikkoa 28-30 °C:ssa, jonka jälkeen sitä käytetään ympättäessä 500 ml:n pullot, jotka sisältävät 100 ml seuraavan koostumuksen omaavaa ympppialustaa:

tärkkelys	20 g/l
polypeptoni	5 g/l
hiivauute	3 g/l
lihauute	2 g/l
soijapapujauhe	2 g/l
kalsiumkarbonaatti	1 g/l
tislattu vesi q.s.	100 ml

(pH-säädetään arvoon 7,0 ennen sterilointia).

Pulloja inkuboidaan pyöröravistelijassa (200 kierr./min) 28-30 °C:ssa 92 tuntia. Sen jälkeen saatua viljelmää käytetään ympättäessä astiafermentori, joka sisältää 4 l samaa kasvualustaa, ja viljelmää inkuboidaan 28-30 °C:ssa 48 tuntia samalla sekoittaen (noin 900 kierr./min) ja ilmastaen (noin yksi standardilitra ilmaa/tilavuus/minuutti).

Saatu liemi siirretään fermentoriin, joka sisältää 50 l seuraavaa tuotantokasvualustaa:

tärkkelys	20	g/l
peptoni	2,5	g/l
hydrolysoitu kaseiini	2,5	g/l
hiivauute	3	g/l
lihauute	2	g/l
soijapapujauhe	2	g/l
kalsiumkarbonaatti	1	g/l
tislattu vesi q.s.		

(pH säädetään arvoon 7,0 ennen sterilointia) ja inkuboidaan noin 72 tuntia 28-30 °C:ssa.

Antibiootin tuotantoa seurataan paperikiekkoagar-kokeella käyttäen testiorganismina kantaa *B.subtilis* ATCC 6633, jota kasvatetaan Davis'in minimikasvualustalla. Inkubointivyöhykkeet arvioidaan yön yli 35 °C:ssa suoritetun inkuboinnin jälkeen.

4a) Raa'an antibiootin GE 2270 talteenotto

Edellä saatu fermentaatiomassa otetaan talteen ja se suodatetaan käyttäen mukana suodatusapuainetta (Clarcell).

Antibiootin GE 2270 on havaittu löytyvän ensi sijassa myseelistä, joskin tietty määrä sitä voidaan ottaa talteen myös suodoksista.

Suodoksen pH säädetään arvoon noin 7,0 ja uutetaan etyyliasetaatilla (50 l). Orgaaninen faasi erotetaan sentrifugoimalla ja konsentroidaan pieneen tilavuuteen alennetussa paineessa. Sen jälkeen saatu öljymäinen jäännös käsitellään petrolieetterillä raa'an antibiootin GE 2270 saostamiseksi, joka antibiootti kerätään suodattamalla ja kuivataan. Saadaan 415 mg antibiootin GE 2270 raakaa kompleksia.

Myseeli uutetaan kaksi kerta 20 l:lla metanolia ja yhdistetyt uutteet konsentroidaan alennetussa paineessa, saadaan vesipitoinen jäännös, joka uutetaan kaksi kertaa etyyliasetaatilla. Raaka antibiootti GE 2270 (6,06 g) saostetaan konsentroidusta orgaanisesta faasista lisäämällä petrolieetteriä.

4b) Antibiootin GE 2270 tekijän A eristäminen

Edellä kuvatun menetelmän mukaisesta myseelistä saatu raaka yhdiste (3 g) liuotetaan tetrahydrofuraaniin ja konsentroidaan alennetussa paineessa piihappogeelin (230-400 mesh) läsnäollessa. Saatu, kiinteä jäännös kerätään ja siirretään kromatografiapylvääseen, joka sisältää 300 g piihappogeeliä (230-400 mesh) ja joka on valmistettu metyleenikloridiin (CH_2Cl_2). Pylväs kehitetään ensin metyleenikloridilla (2 l) ja sen jälkeen peräkkäin metyleenikloridin ja metanolin 1,5 litran seoksilla, joissa on seuraavat suhteet: 98/2, 96/4, 94/6, 92/8, 90/10 ja 88/12 (til./til.).

Kerätään fraktiot, jotka analysoidaan TLC:llä, HPLC:llä ja mikrobiologisesti kantaa *B.subtilis* vastaan ja yhdistetään niiden antibioottisen sisällön mukaisesti.

Yhdistetyt fraktiot, jotka sisältävät antibiootin GE 2270 tekijän A, konsentroidaan alennetussa paineessa, saadaan öljymäinen jäännös, joka liuotetaan tetrahydrofuraaniin.

Tästä liuoksesta antibiootin GE 2270 tekijä A (600 mg) saostetaan lisäämällä petrolieetteriä.

4bis) Antibiootin GE 2270 pienempien komponenttien seoksen eristäminen

Tyypillinen seos, jossa on erityisen runsaasti pienempiä komponentteja C_{2a}, D_1, D_2 ja E, tutkittiin HPLC:llä, ver-

taamalla jokaisen yksittäisen komponentin analyyttistä näytettä.

R_t (min) viittaa HPLC-menetelmään M, joka on esitetty HPCL-analyysiosassa ja se on 20,55 GE 2270:n tekijälle C_{2a}; 17,43 GE 2270:n tekijälle D_1; 18,17 GE 2270:n tekijälle D_2 ja 16,61 GE 2270:n tekijälle E.

Tämän fraktion konsentroiminen alennetussa paineessa tuotti öljyn, joka liuotettiin uudestaan tetrahydrofuraaniin ja saostettiin petrolieetterillä, saatiin valkeahko jauhe.

4c) Antibiootin GE 2270 tekijöiden B_1, B_2, C_1, C_2, D_1, D_2 ja E erottaminen ja eristäminen

Antibiootin GE 2270 tekijät D_1, D_2 ja E erotetaan ja puhdistetaan edellä saadusta raakaseoksesta preparatiivisella HPLC:llä käyttäen 250x20 mm:n pylvästä, joka on pakattu Nucleosil'lla® C18 (piihappogeeli, joka on funktionalisoitu oktadekyylisilaaniryhmillä) (5 µm) ja eluoidaan seoksilla, jotka ovat faasi A: CH_3CN:tetrahydrofuraani:40 mM $HCOONH_4$ (40:40:20), faasi B: CH_3CN:tetrahydrofuraani:40 mM $HCOONH_4$ (10:10:80). Antibioottinen seos (6 mg) liuotettiin 3 ml:aan faasia B ja 1 ml:aan faasia A ja injektoitiin HPLC-kolonniin, jota eluoitiin virtausnopeudella 14 ml/min faasin A ja B seoksella 26:74. Eluoidut fraktiot kerättiin aallonpituudella 254 saadun UV-adsorptioprofiilin mukaan. Peräkkäiset kromatografia-ajot, joilla oli homogeeninen sisältö, yhdistettiin ja konsentroitiin alennetussa paineessa CH_3CN:n poistamiseksi. Jäännöksenä saadulla liuoksella havaittiin antibakteerinen aktiivisuus kantaa *Staphylococcus aureus* Tour L165 vastaan paperikiekkotestissä. Nämä liuokset lyofilisoitiin ainakin kolme kertaa $HCOONH_4$-puskurijäännöksen poistamiseksi täydellisesti HPLC-faaseista.

Saannot olivat seuraavat: antibiootin GE 2270 tekijää E 11 mg, antibiootin GE 2270 tekijää D_1 12 mg, antibiootin GE 2270 tekijää D_2 10 mg.

4d) Puhdistetun seoksen, joka sisältää antibiootin GE 2270 tekijän C_{2a} seoksessa muiden GE 2270:n tekijöiden kanssa, eristäminen

Raa'an GE 2270:n tekijöiden valmisteet, jotka saatiin kuudesta toistetusta fermentaatiosta, yhdistettiin ja liuotettiin 12 litraan CH_2Cl_2:metanoli-seosta (93:7). Liukenematon aine poistettiin suodattamalla ja liuos, joka sisälsi antibioottikompleksin, siirrettiin 13 kg:n (230-400 mesh) piihappogeelipylvääseen, joka oli tasapainotettu CH_2Cl_2:metanoli-seoksella (93:7). Antibiootin GE 2270 tekijä C_{2a} eluoitiin pylväästä, eluointiaineena oli CH_2Cl_2:metanoli-seos (93:7). Fraktiot, jotka sisälsivät keksinnön mukaisen antibiootin (HPLC-analyysi) yhdistettiin, konsentroitiin alennetussa paineessa ja kuivattiin, saatiin 23,5 g antibiootin GE 2270 tekijää C_{2a} seoksessa muiden pienempien tekijöiden kanssa.

Annos (5,5 g) tätä valmistetta puhdistettiin taas pikakromatografisesti pylväässä, joka sisälsi 400 g piihappogeeliä (230-400 mesh) ja joka oli tasapainotettu metyleenikloridiin (CH_2Cl_2). Pylväs kehitettiin ensin metyleenikloridilla (1 litra) ja sen jälkeen peräkkäin sarjalla seoksia, joissa oli metyleenikloridia ja metanolia seuraavissa suhteissa (til./til.): 96/4 (3 litraa), 94/6 (1 litra), 92/8 (2 litraa), 90/10 (6 litraa) ja 88/12 (4 litraa).

Fraktiot, jotka sisälsivät pääasiallisesti GE 2270:n tekijän C_{2a} (HPLC-analyysi) yhdistettiin ja konsentroitiin. Antibioottinen valmiste (646 mg) saostui petrolieetterilisäyksen jälkeen.

4e) Antibiootin GE 2270 puhtaan tekijän C_{2a} eristäminen

Puhdistettu seos, joka sisälsi ensi sijassa antibiootin GE 2270 tekijän C_{2a}, puhdistettiin edelleen preparatiivisella HPLC:llä edellä kuvatusta valmisteesta.

Annos edellä kuvattua antibioottivalmistetta (10 mg) liuotettiin 1 ml:aan faasia A (CH_3CN:tetrahydrofuraani:40 mM $HCOONH_4$ - 40:40:20) ja 1 ml:aan faasia B (CH_3CN:tetrahydrofuraani:40 mM $HCOONH_4$ - 10:10:80) ja injektoitiin HPLC 250x20 mm:n Hibar kolonniin (E.Merck, Darmstadt, Saksa), joka oli pakattu 7 µm:n Nucleosil'lla® (piihappogeeli, joka on funktionalisoitu oktadekyylisilaaniryhmillä), joka oli tasapainotettu seoksella, jossa oli 40 % faasia A ja 60 % faasia B. Kolonni eluoitiin virtausnopeudella 15 ml/min käyttäen 22 minuutin lineaarista gradienttia, jossa oli faasia A 40 %:sta 50 %:iin. UV-detektio tapahtui aallonpituudella 254 nm. Kymmenen peräkkäisen kromatografisen ajon fraktiot, jotka sisälsivät keksinnön mukaisen puhtaan antibiootin, yhdistettiin ja konsentroitiin alennetussa paineessa CH_3CN:n poistamiseksi. Antibiootin GE 2270 tekijä C_{2a} saostettiin vedestä. Sakka kerättiin sentrifugoimalla, pestiin kaksi kertaa tislatulla vedellä ja kuivattiin tyhjössä, saatiin 66 mg puhdasta antibioottia.

5. Antibiootin GE 2270 tekijän A2 valmistaminen

Antibiootin GE 2270 tekijä A (valmistettu edellä kuvatulla tavalla) (86 mg) liuotetaan 17 ml:aan 95%:ista etanolia ja 1,7 ml:aan etikkahappoa. Inkuboidaan 60 °C:ssa 24 tuntia, jonka jälkeen muodostunut liuos laimennetaan 0,1 M natriumfosfaattipuskurilla pH 7,5 (100 ml) ja pH säädetään 1 M natriumhydroksidilla arvoon 7,5. Etanoli poistetaan haihduttamalla alennetussa paineessa ja vesipitoinen jäännös uutetaan kaksi kertaa etyyliasetaatilla (100 ml). Orgaaninen faasi konsentroidaan alennetussa paineessa

kiinteän jäännöksen saamiseksi, joka liuotetaan tetrahydrofuraaniin, jonka jälkeen se saostetaan lisäämällä petrolieetteriä. Antibiootin GE 2270 tekijä A_2 (62 mg) saadaan yhdessä vähäisten määrien kanssa antibiootin GE 2270 tekijöitä A ja A_1. Antibiootin GE 2270 puhdas tekijä A_2 saadaan preparatiivisella HPLC:llä seuraavalla tavalla:

10 mg edellä saatu raakatuotetta liuotetaan tetrahydrofuraaniin, laimennetaan liukoisuusrajalle vedellä ja sen jälkeen injektoidaan HPLC-systeemiin, jossa on kolonni (250x20 mm), joka on pakattu Nucleosil'lla® C18 (5 µm), joka on käänteisfaasinen piihappogeeli, jonka valmistaja on Stacroma®, eluointi tapahtuu lineaarisella gradientilla, jossa on faasia B 64 %:sta 93 %:iin faasissa A, 20 minuutissa virtausnopeudella noin 15 ml/min. Tässä systeemissä faasi A on 90:10-seos (til./til.), jossa on 18 mM natriumfosfaattia pH 7,2 ja asetonitriiliä, kun taas faasi B on 40:60-seos (til./til.), jossa on 18 mM natriumfosfaattia pH 7,2 ja asetonitriiliä. Viiden toisiaan seuraavan ajon fraktiot kerätään ja UV-mitataan aallonpituudella 330 nm. Fraktiot, jotka sisältävät olennaisia määriä antibiootin GE 2270 tekijää A_2 ja jotka vastaavat UV-eluointiprofiilin suurimpia piikkejä, yhdistetään ja konsentroidaan alennetussa paineessa vesipitoiseksi faasiksi, joka uutetaan kaksi kertaa etyyliasetaatilla. Tämä orgaaninen kerros pestään sen jälkeen tislatulla vedellä jäännöksenä olevien epäorgaanisten suoloja poistamiseksi ja konsentroidaan kiinteän jäännöksen saostamiseksi, joka sen jälkeen liuotetaan tetrahydrofuraaniin ja saostetaan uudestaan petrolieetterillä, saadaan antibiootin GE 2270 puhdas tekijä A_2 (45 mg).

Eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 406745 kuvataan eräs toinen vaihtoehtoinen menetelmä antibiootin GE 2270 tekijän A_2 valmistamiseksi antibiootin GE 2270 tekijän A pääreaktiotuotteena.

6. Antibiootin GE 2270 tekijän A_3 valmistaminen

Antibiootin GE 2270 tekijää A_2 inkuboidaan 1 tunti huoneen lämpötilassa 0,5 M natriumkarbonaatissa. Sen jälkeen reaktioseos laimennetaan kylmällä vedellä ja pH säädetään arvoon 6,5 kloorivetyhapolla. Neutraloitu liuos sisältää antibiootin GE 2270 tekijän A_3 pääreaktiotuotteena. Tämä antibiootti uutetaan vesipitoisesta faasista etyyliasetaatilla ja sen jälkeen saostetaan konsentroidusta orgaanisesta faasista lisäämällä petrolieetteriä.

Antibiootin GE 2270 puhdas tekijä A_3 saadaan pylväskromatografisesti seuraavassa esitetyllä tavalla:

1,5 g GE 2270:n raakaa A_3:a liuotetaan 60 ml:aan metanolin ja dikloorimetaanin 1/1-seosta (til./til.) ja adsorboidaan piihappogeelin pinnalle (75-230 mesh) haihduttamalla liuottimet alennetussa paineessa. Sen jälkeen kiinteä jäännös laitetaan dikloorimetaanilla tasapainotetun piihappogeelipylvään (75-230 mesh, täytteen korkeus 40 cm) yläosaan. Sitten pylväs eluoidaan metanolin seoksilla dikloorimetaanissa seuraavassa järjestyksessä: 1) 2% metanolia (450 ml), 2) 5 % metanolia (500 ml), 3) 10 % metanolia (600 ml), 4) 15 % metanolia (500 ml), 5) 20 % metanolia (500 ml), 6) 30 % metanolia (250 ml).

Kerätään fraktiot ja niitä seurataan TLC:llä ja mikrobiologisella testillä, jossa käytetään kantaa *B.subtilis* ATCC 6633. Antibiootin GE 2270 tekijä A_3 esiintyy tavallisesti eluaateissa, jotka sisältävät noin 15-20 % metanolia.

Halutun tuotteen sisältävät fraktiot yhdistetään ja konsentroidaan alennetussa paineessa. Jäännökseen lisätään petrolieetteriä, jonka jälkeen antibiootin GE 2270 tekijä A_3 saostuu (854 mg puhdasta tuotetta).

7. Sopivan lähtöaineen valmistaminen antibiootin tekijöistä D_1, D_2, E ja C_{2a}

Noudattaen olennaisesti edellä kohdissa 5 ja 6 esitettyä menetelmää mutta lähtemällä antibiootin GE 2270 yksittäisistä tekijöistä D_1, D_2, E ja C_{2a} tekijän A sijasta, saadaan sopivat, kaavan III mukaiset lähtöaineet, joissa W on COOH tai aktivoitu esteri, R on vety tai CH_2OH, R_1 on CH_3 tai vety ja R_4 on hydroksimetyyli tai metyyli.

7a) Sopivan lähtöaineen valmistaminen antibiootin GE 2270 pienempien komponenttien (C_{2a}, D_1, D_2 ja E) seoksesta

Noudattaen olennaisesti edellä kohdassa 5 ja 6 esitettyä menetelmää mutta lähtemällä antibiootin GE 2270 pienempien komponenttien (C_{2a}, D_1, D_2 ja E) seoksesta yksittäisen tekijän A sijasta, saadaan sopiva, kaavan III mukainen lähtöaine, jossa W on COOH tai aktivoitu esteri, R, R_1 ja R_4 ovat metoksimetyyli, metyyli ja hydroksimetyyli C_{2a}:lla, vety, vety ja metyyli D_1:llä, hydroksimetyyli, metyyli ja metyyli D_2:lla ja vastaavasti hydroksimetyyli, vety ja metyyli E:llä.

R_t (min) viittaa HPLC-menetelmään M, joka on esitetty HPLC-analyysiosassa.

Kun W on aktivoitu esteri, R_t (min) on 22,51 GE 2270:n tekijällä C_{2a}; 19,80 GE 2270:n tekijällä D_1; 20,41 GE 2270:n tekijällä D_2 ja vastaavasti 18,92 GE 2270:n tekijällä E.

Kun W on COOH, R_t (min) on 12,99 GE 2270:n tekijällä C_{2a}; 10,38 GE 2270:n tekijällä D_1; 11,08 GE 2270:n tekijällä D_2 ja vastaavasti 9,03 GE 2270:n tekijällä E.

8. Glysyyli-Nε-Cbz-L-lysiinitrifluoriasetaatin valmistaminen

4,8 ml DPPA:ta (22 mmoolia) lisättiin 0 °C:ssa liuokseen, jota sekoitettiin hyvin ja jossa oli 3,5 g BOC-glysiiniä (Fluka) (20 mmoolia) ja 7,28 g Nε-Cbz-L-lysiinimetyyliesterihydrokloridia (Fluka) (22 mmoolia) 50 ml:ssa kuivaa DMF:ää. Tähän liuokseen lisättiin 0 °C:ssa 10-15 minuutin kuluessa liuos, jossa oli 5,8 ml TEA:ta (42 mmolia) 50 ml:ssa kuivaa DMF:ää. Sekoittamista jatkettiin vielä 2 tuntia 0 °C:ssa ja sen jälkeen yön yli huoneen lämpötilassa. Reaktioseos laimennettiin 250 ml:lla tolueenia ja 500 ml:lla etyyliasetaattia ja pestiin 1 N vesipitoisella HCl:llä (x3), vedellä, $NaHCO_3$:n kyllästetyllä liuoksella ja suolaliuoksella. Kuivattiin Na_2SO_4:llä ja liuotin haihdutettiin, saatiin 9,7 g paksua öljyä, joka vastusti kaikkia kiteyttämisyrityksiä. Tämän öljyn NMR oli täysin yhtäpitävä BOC-glysyyli-Nε-Cbz-L-lysiinimetyyliesterin rakenteen kanssa.

Öljy liuotettiin 200 ml:aan asetonin ja dioksaanin 1:1-seosta ja lisättiin samalla sekoittaen 0 °C:ssa 30 minuutissa 22 ml 1 N vesipitoista NaOH:ta. Sen jälkeen reaktioseosta sekoitettiin 45 minuuttia huoneen lämpötilassa, laimennettiin 300 ml:lla kylmää vettä, hapotettiin 25 ml:lla 1 N vesipitoista HCl:ää ja uutettiin kloroformilla (x3) ja etyyliasetaatilla (x3). Kuivattiin Na_2SO_4:llä ja liuotin haihdutettiin, saatiin 9,4 g kumia, joka vastusti kaikkia kiteyttämisyrityksiä. Tämän kumin NMR oli täysin yhtäpitävä BOC-glysyyli-Nε-Cbz-L-lysiinin rakenteen kanssa.

Kumimainen yhdiste käsiteltiin 20 ml:lla kylmää trifluorietikkahappoa (TFA). Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa kunnes yhdiste meni kokonaan liuokseen. Liuos haihdutettiin pieneen tilavuuteen tyhjössä kylmässä, jonka jälkeen lisättiin etyylieetteriä otsikossa

mainitun yhdisteen saostamiseksi. Saatiin 9,6 g glysyyli-Nε-Cbz-L-lysiini-trifluoriasetaattia valkoisena jauheena. NMR oli täysin yhtäpitävä rakenteen kanssa.

9. L-tyrosyyli-L-prolinamidin valmistaminen

0,48 ml DPPA:ta (2 mmoolia) lisättiin 0 °C:ssa liuokseen, jota sekoitettiin hyvin ja jossa oli 538 mg BOC-L-tyrosiinia (Fluka) (2 mmoolia), 228,3 mg L-prolinamidia (Aldrich) (2 mmoolia) ja 168 mg $NaHCO_3$:a 5 ml:ssa kuivaa DMF:ää. Reaktioseosta sekoitettiin 24 tuntia huoneen lämpötilassa, jonka jälkeen se laimennettiin 50 ml:lla vettä ja uutettiin kloroformilla (x3). Orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin Na_2SO_4:llä ja liuotin haihdutettiin, saatiin öljy, joka puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli heksaanin ja asetonin 2:3-seos. Tällä tavalla saatiin 420 mg BOC-L-tyrosyyli-L-prolinamidi valkoisena, kiinteänä aineena. NMR oli yhtäpitävä rakenteen kanssa.

Saatu kiinteä aine liuotettiin 6 ml:aan etyyliasetaattia ja sekoitettiin 48 tuntia huoneen lämpötilassa 4 ml:n 3 N vesipitoista HCl:ää läsnäollessa. Sen jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin tyhjössä ja jäännös, joka liuotettiin uudestaan etanoliin, saostettiin etyylieetterillä. Saatiin 302 mg L-tyrosyyli-L-prolinamidia valkoisena jauheena. NMR oli täysin yhteensopiva rakenteen kanssa.

10. Metyyli-8-aminokaprylaatti- ja metyyli-11-aminoundekanoaatti-p-tolueenisulfonaattien valmistaminen

Liuosta, jossa oli 40 mmoolia valittua aminohappoa (Fluka) ja 15,2 g p-tolueenisulfonihappomonohydraattia (Fluka) (80 mmoolia) 200 ml:ssa metanolia, keitettiin palautusjäähdyttäen yön yli. Sen jälkeen liuotin haihdutettiin

tyhjössä ja jäännös liuotettiin uudestaan etyylieetteriin. Jonkin ajan kuluttua otsikossa mainitut yhdisteet kiteytyivät kvantitatiivisesti. Molempien yhdisteiden NMR oli yhteensopiva niiden rakenteen kanssa.

11. 5-aminopentyylifosfonihapon valmistaminen

3,48 g 5-amino-1-pentanolia (Fluka) (33,7 mmoolia) ja 5,0 g ftaalihappoanhydridiä (Fluka) (33,7 mmoolia) sulatettiin yhdessä 180 °C:ssa. Tätä lämpötilaa ylläpidettiin 90 minuutin ajan kunnes ei enää kehittynyt vettä. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneen lämpötilaan ja öljymäinen seos kromatografoitiin piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 2%:inen metanoli kloroformissa. Saatiin 5,9 g puhdasta öljyä. NMR oli yhtäpitävä rakenteen kanssa.

5,9 g:aan öljymäistä välituotetta (25 mmoolia), lisättiin 1,6 ml PBr_3:a (17 mmoolia), lisäys tehtiin annoksittain eksotermisen reaktion kontrolloimiseksi. Reaktioseosta kuumennettiin 100 °C:ssa 1,5 tuntia, jonka jälkeen se kaadettiin murskattuun jäähän. Kiinteä aine, joka erottui, suodatettiin ja sen annettiin kuivua ilmassa yön yli. Saatiin 6,6 g puhdasta bromi-välituotetta. Massa oli yhtäpitävä odotetun molekyylipainon kanssa.

500 mg puhdasta bromivälituotetta (1,69 mmoolia) ja 140 mg trietyylifosfiittia (Fluka) (0,84 mmoolia) kuumennettiin yhdessä 150 °C:ssa noin 1 tunnin ajan. Lisättiin 30 minuutin väliajoin samassa lämpötilassa kolme muuta 140 mg:n annosta trietyylifosfiittia. Kun kaikki lähtöaine oli hävinnyt, ylimääräinen trietyylifosfiitti tislattiin pois ja raakamateriaali puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM -Merck), eluointiaineena oli 2%:inen metanoli dikloorimetaanissa. 468 mg odotettua dietyylifosfonaattia saatiin paksuna öljynä. NMR osoitti rakenteen oikeaksi.

468 mg dietyylifosfonaattivälituotetta käsiteltiin yön yli 3 ml:lla hydratsiinin 0,2 M liuosta metanolissa huoneen lämpötilassa. Saostunut ftaalihydratsidi suodatettiin ja jäljelle jäänyt liuos haihdutettiin kuiviin tyhjössä. Jäännös otettiin talteen 1 N vesipitoiseen HCl:ään ja liuos pestiin etyyliasetaatilla, tehtiin emäksiseksi NaOH:lla ja uutettiin useita kertoja n-butanolilla. Butanolifaasi kuivattiin Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin kuiviin, saatiin 175 mg paksua öljyä, jonka NMR oli yhtäpitävä odotetun tuotteen kanssa.

175 mg dietyyli-5-aminopentyylifosfonaattia keitettiin palautusjäähdyttäen 20 tuntia 0,6 ml:ssa kons.HCl:ää. Sen jälkeen happoliuos haihdutettiin kuiviin tislaamalla atseotrooppisesti tyhjössä n-butanolin läsnäollessa. Saadun lasimaisen öljyn NMR osoitti sen olevan 5-aminopentyylifosfonihappo.

12. 5-(5-aminopentyyli)tetrasolin valmistaminen

Liuokseen, jossa oli 10 ml 6-aminokapronitriiliä (Fluka) (80 mmoolia) ja 13,3 ml TEA:ta (96 mmoolia) 80 ml:ssa tetrahydrofuraania, lisättiin tipoittain 0 °C:ssa samalla sekoittaen 12,48 ml bentsyylikllooriformiaattia (Fluka) (88 mmoolia). Sekoittamista jatkettiin 2 tuntia huoneen lämpötilassa ja liuotin haihdutettiin tyhjössä. Jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin, pestiin 1 N vesipitoisella HCl:llä, vedellä ja sen jälkeen kuivattiin Na_2SO_4:llä ja liuotin haihdutettiin, saatiin 19,6 g siirappia, jonka NMR oli yhtäpitävä rakenteen kanssa.

1 g suojattua 6-aminokapronitriiliä (4,06 mmoolia) 40 ml:ssa 1-metyyli-2-pyrrolidonia, kuumennettiin 150 °C:ssa argonatmosfäärissä 793 mg:n natriumatsidia (12,2 mmoolia) ja 834 mg:n trietyyliamiinihydrokloridia (6,1 mmoolia) läsnäollessa. Neljän tunnin kuluttua reaktioseos laimennettiin 120 ml:lla vettä ja sen jälkeen hapotettiin va-

rovasti 10%:isella vesipitoisella HCl:llä pH-arvoon 1 (varoitus: muodostuu atsotidriinihappoa!). Liuos uutettiin etyyliasetaatilla, orgaaninen faasi uutettiin uudestaan 10%:isella vesipitoisella NaOH:lla (x2) ja emäksinen liuos pestiin etyylieetterillä, hapotettiin kons.HCl:llä ja uutettiin etyyliasetaatilla (x3). Orgaaninen faasi kuivattiin ja haihdutettiin, saatiin siirappi, joka kiteytettiin metanoli/vesi-seoksesta. Saatiin 260 mg hienoa jauhetta. NMR ja massa osoittivat rakenteen oikeaksi.

250 mg N-suojattua aminotetratsolia (0,86 mmoolia) käsiteltiin huoneen lämpötilassa 5 ml:lla tioanisolia (43,25 mmoolia) ja 17,5 ml:lla trifluorietikkahappoa 3 tunnin ajan. Trifluorietikkahappo konsentroitiin tyhjössä kylmässä ja lisättiin etyylieetteriä otsikossa mainitun yhdisteen saostamiseksi sen trifluoriasetaattisuolana. NMR ja massa osoittivat rakenteen oikeaksi.

13. <u>N-[3,4-di-(O-tetrahydropyranyyli)bentsoyyli]-tiatsolidiini-2-tioniinin valmistaminen</u>

Liuosta, jossa oli 4,62 g 3,4-dihydroksibentsoehappoa (Fluka) (30 mmoolia) 40 ml:ssa metanolia, keitettiin palautusjäähdyttäen 24 tuntia 0,325 ml:n kons.H_2SO_4:ää läsnäollessa. Liuos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan, jonka jälkeen lisättiin vähän kiinteää $NaHCO_3$:a ja liuotin haihdutettiin tyhjössä. Jäännös otettiin talteen etyyliasetaattiin, pestiin vedellä, kuivattiin Na_2SO_4:llä ja liuotin haihdutettiin, saatiin siirappi, joka kiteytettiin etyyliasetaatin ja heksaanin seoksesta. Saatiin 3,53 g valkoisia kiteitä.

9,1 ml dihydropyraania (Fluka) (0,1 moolia) ja 250 mg pyridinium-p-tolueenisulfonaattia (1 mmooli) lisättiin huoneen lämpötilassa liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 1,68 g metyyli-3,4-dihydroksibentsoaattia (10 mmoolia) 4 ml:ssa etyyliasetaattia ja 25 ml:ssa dikloorime-

taania. Neljän tunnin kuluttua reaktioseos pestiin $NaHCO_3$:n kyllästetyllä liuoksella, kuivattiin Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin kuiviin, saatiin 3,36 g öljyä, joka käytettiin seuraavassa vaiheessa puhdistamattomana.

Edellisestä reaktiosta saatu raakayhdiste liuotettiin 40 ml:aan asetonia ja lisättiiin liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 20 ml vettä, 2,76 g K_2CO_3:a (20 mmoolia) ja 10 ml 1 N vesipitoista NaOH:ta (10 mmoolia), ja sekoittamista jatkettiin 7 tuntia huoneen lämpötilassa. Asetoni haihdutettiin pois tyhjössä ja jäännöksenä saatu vesifaasi pestiin etyyliasetaatilla. Vesifaasi siirrettiin erlenmeyer-pulloon, joka sisälsi yhtä suuren tilavuuden kloroformia, jäähdytettiin 0 °C:seen ja hapotettiin varovasti 50 ml:lla 1 N vesipitoista HCl:ää samalla voimakkaasti sekoittaen. Sen jälkeen vesifaasi uutettiin 3 lisäkertaa kloroformilla ja yhdistetyt, orgaaniset kerrokset pestiin 0,2%:isella ammoniumformiaatilla, kuivattiin Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin kuiviin, saatiin siirappi, joka kiteytyi heksaanilisäyksen jälkeen. Saatiin 2,34 g valkoista, kiinteää ainetta. NMR oli yhtäpitävä rakenteen kanssa.

333 mg 2-tiatsoliini-2-tiolia (Fluka) (2,8 mmoolia), 577 mg N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä (Fluka) (2,8 mmoolia) ja 35 mg 4-dimetyyliaminopyridiiniä lisättiin annetussa järjestyksessä 0 °C:ssa liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 644 mg bentsoehappovälituotetta (2 mmoolia) 14 ml:ssa etyyliasetaatin ja dikloorimetaanin 5:2-seosta. Sekoittamista jatkettiin yön yli huoneen lämpötilassa, saostunut disykloheksyyliurea suodatettiin pois ja keltainen liuos haihdutettiin tyhjössä, saatiin keltainen öljy, joka puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 25%:inen asetoni heksaanissa. 700 mg keltaisia kiteitä saatiin asetonin ja heksaanin seoksesta.

NMR ja IR osoittivat sen olevan otsikossa mainittua yhdistettä.

14. N^1,N^8-di-tert.-butoksikarbonyylispermidiinin valmistaminen

Liuos, jossa oli 19,72 g BOC-ON:ää (Aldrich) (80 mmoolia) 60 ml:ssa tetrahydrofuraania (THF), josta oli poistettu kaasu, lisättiin tipoittain 1 tunnin kuluessa argonatmosfäärissä liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 5,8 g spermidiiniä (Aldrich) (40 mmoolia) 40 ml:ssa THF:ää, josta oli poistettu kaasu ja joka oli jäähdytetty 0 °C:seen. Sen jälkeen reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa yön yli, jonka jälkeen se haihdutettiin kuiviin. Jäännös otettiin talteen etyylieetteriin, pestiin 1 N vesipitoisella NaOH:lla (x4) ja vedellä (x4), kuivattiin Na_2SO_4:llä ja liuotin konsentroitiin pieneen tilavuuteen tyhjössä. Etyylieetterilisäyksen jälkeen saostui 11 g valkoista jauhetta. NMR osoitti sen olevan otsikossa mainittua yhdistettä.

15. N-tert.-butoksikarbonyylipropyleenidiamiinin valmistaminen

4,2 g BOC-ON:ää (Aldrich) (17,2 mmoolia) lisättiin huoneen lämpötilassa liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 2 g 3-aminopropionitriilifumaraattia (Aldrich) (15,6 mmoolia) liuotettuna seokseen, jossa oli 10 ml dioksaania, 10 ml vettä ja 3,3 ml trietyyliamiinia. Kolmen tunnin kuluttua reaktioseos laimennettiin lisäämällä vettä ja uutettiin dikloorimetaanilla (x3). Yhdistetyt orgaaniset kerrokset pestiin 1 N vesipitoisella NaOH:lla (x3) ja vedellä (x3), kuivattiin Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksenä saatu öljy otettiin talteen etyylieetteriin ja saostettiin heksaanilla, saatiin 2,2 g valkoista jauhetta.

1 g N-BOC-suojattua välituotetta (5,9 mmoolia) 7 ml:ssa 1 N etanolista NaOH:ta hydrattiin 275,8 kPa:n (40 psi) paineessa 130 mg:n Raney-nikkeliä (50%:inen liete vedessä, pH>9) läsnäollessa (Aldrich) 40 tunnin ajan. Raney-nikkeli suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin kuiviin. Jäännös otettiin talteen etyyliasetaattiin ja pestiin 1 N vesipitoisella NaOH:lla, kuivattiin Na_2SO_4:llä ja liuotin poistettiin tyhjössä, saatiin 950 mg väritöntä öljyä, joka seisotettaessa jähmettyi. NMR osoitti sen olevan otsikossa mainittua yhdistettä.

16. 3-(2-aminoetyylitio)propaanihappometyyliesteritrifluoriasetaatin valmistaminen

Liuokseen, jossa oli 0,5 g kysteamiinia (Fluka) (6,48 mmoolia) 5 ml:ssa CH_2Cl_2:ta, lisättiin 1,4 g di-tert.-butyylidikarbonaattia (Aldrich) (6,48 mmoolia) 5 ml:ssa CH_2Cl_2:ta huoneen lämpötilassa samalla sekoittaen. 30 minuutin kuluttua liuotin haihdutettiin ja raakameteriaali liuotettiin 5 ml:aan absoluuttista etanolia. Etanoliseen liuokseen lisättiin 2,7 ml TEA:ta (19,1 mmoolia) ja 1,07 ml metyyli-3-bromipropionaattia (Fluka) (9,57 mmoolia) tässä järjestyksessä. Reaktio tapahtui täydellisesti noin 30 minuutissa. Etanoli poistettiin tyhjössä ja korvattiin 15 ml:lla kloroformia. Orgaaninen faasi pestiin sen jälkeen vedellä, kuivattiin Na_2SO_4:llä ja liuotin haihdutettiin, saatiin öljy, joka lopuksi käsiteltiin 1 ml:lla trifluorietikkahappoa 0 °C:ssa 5 minuutin ajan. Haihdutettiin kuiviin, saatiin 270 mg vaaleankeltaista öljyä. NMR ja IR osoittivat sen olevan otsikossa mainittua yhdistettä.

17. 6-amino-2(E)-hekseenihapon valmistaminen

Liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 2 ml 4-aminobutyyrialdehydidietyyliasetaalia (Fluka) (11,6 mmoolia) ja 3,6 ml TEA:ta (25,6 mmoolia) 5 ml:ssa CH_2Cl_2:ta, lisättiin

30 minuutissa huoneen lämpötilassa liuos, jossa oli 1,5 ml bentsoyylikloridia (Fluka) (12,9 mmoolia) 5 ml:ssa CH_2Cl_2:ta. Yhden tunnin kuluttua reaktioseos laimennettiin lisäämällä 10 ml CH_2Cl_2:ta, pestiin vedellä ja orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4:llä ja tilavuus säädettiin 20 ml:ksi. Uuden liuoksen annettiin reagoida kolmen päivän ajan argonatmosfäärissä 1,6 ml:n kanssa TEA:ta (11,5 mmoolia), 10,2 g:n kanssa di-tert.-butyylidikarbonaattia (Aldrich) (46,8 mmoolia) ja 1,4 g:n kanssa 4-dimetyyliaminopyridiiniä (Fluka) (11,5 mmoolia) huoneen lämpötilassa. Poistamalla liuotin saatiin ruskea öljy, joka puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 20%:inen etyyliasetaatti n-heksaanissa, saatiin 1,6 g 4-aminobutyyrialdehydidietyyliasetaalia, josta N,N-suojaus on poistettu, värittömänä öljynä. NMR osoitti rakenteen oikeaksi.

Sen jälkeen saatu öljy liuotettiin 5 ml:aan THF:ää ja käsiteltiin 5 ml:lla 1 N HCl:ää huoneen lämpötilassa kolmen tunnin ajan. THF poistettiin tyhjössä ja jäljelle jäännyt liuos pestiin kloroformilla (2 ml x 3). Orgaaninen faasi pestiin sen jälkeen Na_2CO_3-liuoksella, vedellä, kuivattiin Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin kuiviin, saatiin öljy, joka käytettiin seuraavassa vaiheessa puhdistamattomana.

Suspensioon, jossa oli 160 mg 60%:ista NaH:ta (4 mmoolia) 5 ml:ssa kuivaa THF:ää 0 °C:ssa argonatmosfäärissä, lisättiin 0,837 ml trietyylifosfonoasetaattia (Fluka) (4,3 mmoolia). 30 minuutin kuluttua lisättiin aikaisemmin saadun aldehydin (1,17 g) (4,02 mmoolia) kuiva THF-liuos (2 ml) ja lämpötilan annettiin kohota huoneen lämpötilaan. Reaktiota sekoitettiin yön yli ja sen jälkeen lisättiin 0 °C:ssa 50 mg lisää 60%:ista NaH:ta. Kahden tunnin kuluttua huoneen lämpötilassa reaktioseos käsiteltiin laimennetulla HCl:llä (10 ml) ja uutettiin etyyliasetaatilla (5 ml x 3). Yhdistetty orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin kuiviin. Raakamate-

riaali puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 15%:inen etyyliasetaatti n-heksaanissa, saatiin 765 mg siirappia. NMR osoitti sen olevan odotettua tuotetta, jossa on kaksoissidos E-konfiguraatiossa (J=16 Hz).

6,15 ml 1 N LiOH:ta (6,15 mmoolia) lisättiin liuokseen, jossa oli 739 mg edellä saatua, tyydyttymätöntä esteriä (2,05 mmoolia) 10 ml:ssa THF:ää, samalla sekoittaen huoneen lämpötilassa. Sen jälkeen, kun lähtöaine oli hävinnyt, reaktioseos konsentroitiin tyhjössä 30 °C:ssa (haudelämpötila). Vesipitoinen liuos hapotettiin pH-arvoon 2 1 N HCl:llä, jonka jälkeen uutettiin etyyliasetaatilla. Yhdistetty, orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4:llä, suodatettiin ja liuotin haihdutettiin, saatiin öljy, joka jähmettyi tyhjössä seisottamisen jälkeen. NMR ja MS osoittivat sen olevan 6-N-BOC-amino-2(E)-hekseenihappo.

N-BOC-suojauksen poistaminen, otsikossa mainitun yhdisteen saamiseksi, suoritettiin puhtaassa (neat) trifluorietikkahapossa 0 °C:ssa juuri ennen kytkentää sopivan lähtöaineena käytetyn GE 2270:n kanssa.

18. <u>3-(2-aminoetoksi)propaanihappotrifluoriasetaatin valmistaminen</u>

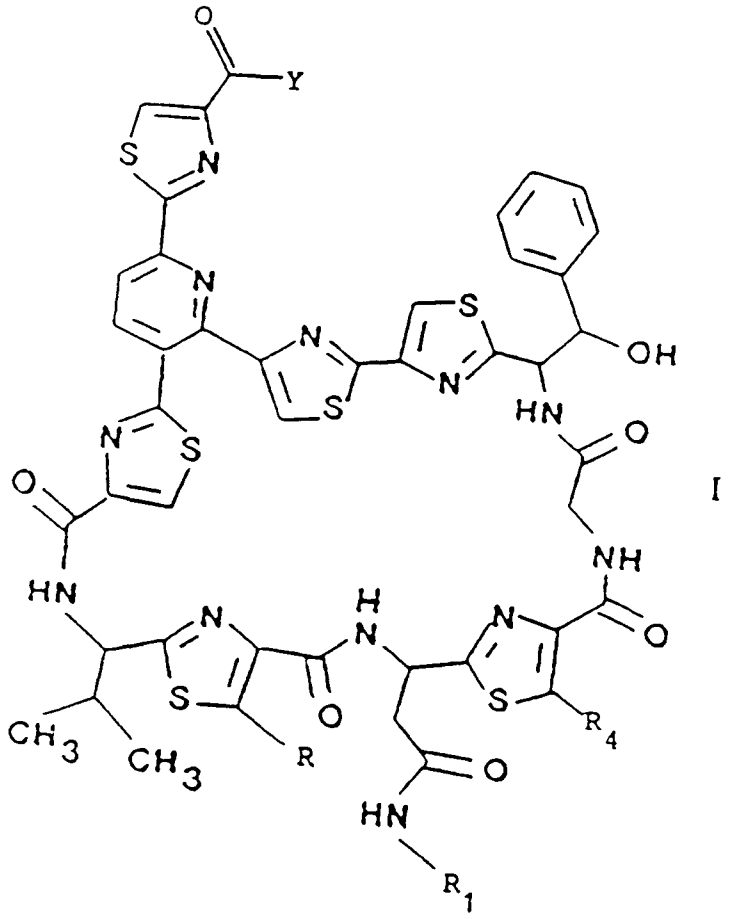
Liuokseen, jota sekoitettiin ja jossa oli 1 g N-BOC-etanoliamiinia (6,22 mmoolia) [valmistettu klassisten menetelmien mukaisesti etanoliamiinista (Fluka)] 10 ml:ssa kuivaa THF:ää -78 °C:ssa, lisättiin 3,88 ml butyylilitiumin (Fluka) 1,6 M liuosta (6,22 mmoolia) argonatmosfäärissä. 30 minuutin kuluttua lisättiin 1,3 g tert.-butyyli-3-bromipropanoaattia [valmistettu klassisten menetelmien mukaisesti 3-bromipropaanihaposta (Fluka)] (6,22 mmoolia), lämpötilan annettiin kohota huoneen lämpötilaan ja muodostunutta seosta sekoitettiin 20 tuntia tässä lämpötilassa. Laimennettiin vedellä, jonka

jälkeen reaktioseos uutettiin n-heksaanilla (5 ml x 2). Poistamalla liuotin saatiin raakamateriaali, joka puhdistettiin pikakromatografisesti piihappogeeli 60:llä (230-400 mesh ASTM - Merck), eluointiaineena oli 20%:inen etyyliasetaatti heksaanissa, saatiin 1,43 g öljyä. NMR osoitti sen olevan kytketty yhdiste.

Kytketyn yhdisteen koko suojauksen poistaminen suoritettiin välittömästi ennenkuin se lisättiin lähtöaineena käytettyyn sopivaan GE 2270:aan, sekoittamalla sitä trifluorietikkahapossa noin 5 minuuttia huoneen lämpötilassa. Trifluorietikkahappo poistettiin tyhjössä, saatiin otsikossa mainittu yhdiste.

Patenttivaatimukset

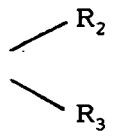
1. Antibiootin GE 2270 amidijohdannainen ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat, jonka yhdisteen kaava I on seuraava



I

jossa R tarkoittaa vetyä, hydroksimetyyliä tai metoksimetyyliä,

R_1 tarkoittaa vetyä tai metyyliä,

Y tarkoittaa kaavan  mukaista ryhmää,

jossa R_2 tarkoittaa vetyä, $(C_1\text{-}C_4)$alkyyliä, amino$(C_2\text{-}C_4)$alkyyliä, $(C_1\text{-}C_4)$alkyyliamino-$(C_1\text{-}C_4)$alkyyliä tai di$(C_1\text{-}C_4)$-alkyyliamino-$(C_1\text{-}C_4)$alkyyliä,

R_3 tarkoittaa vetyä tai suoraa tai haarautunutta (C_1-C_{14})-alkyyliryhmää, jossa on 1-3 substituenttia, jotka ovat karboksi, sulfo, fosfono, amino, joka voi mahdollisesti olla suojattu alempialkoksikarbonyyli- tai bentsyylioksikarbonyyliryhmällä, (C_1-C_4)alkyyliamino, jossa alkyyliosa voi mahdollisesti olla substituoitu karboksiryhmällä, di(C_1-C_4)alkyyliamino, hydroksi, halo, (C_1-C_4)alkoksi, jossa alkyyliosa voi mahdollisesti olla substituoitu karboksiryhmällä, (C_1-C_4)alkoksikarbonyyli, merkapto, (C_1-C_4)alkyylitio, jossa alkyyliosa voi mahdollisesti olla substituoitu karboksiryhmällä, fenyyli, joka voi mahdollisesti olla substituoitu 1-3 substituentilla, jotka ovat karboksi, sulfo, hydroksi, halo tai merkapto, karbamyyli, (C_1-C_6)alkyylikarbamyyli, jossa alkyyliosa voi mahdollisesti olla substituoitu 1 tai 2 substituentilla, jotka ovat karboksi, amino, (C_1-C_4)alkyyliamino tai di(C_1-C_4)alkyyliamino, di(C_1-C_4)alkyylikarbamyyli, jossa alkyyliosat yhdessä viereisen typpiatomin kanssa voivat myös tarkoittaa tyydyttynyttä, 5-7-jäsenistä heterosyklistä rengasta, jonka yksi rengashiili voi mahdollisesti olla substituoitu karboksi- tai karbamyyliryhmällä ja joka voi mahdollisesti sisältää toisen heteroryhmän, joka on O, S tai N, bentsoyyliamino, jossa fenyyliryhmä voi olla substituoitu 1-3 hydroksiryhmällä, typpeä sisältävä, 5-6-jäseninen, heterosyklinen rengas, joka voi olla tyydyttymätön, osittain tyydyttynyt tai kokonaan tyydyttynyt ja joka voi sisältää 1-3 muuta heteroatomia, jotka ovat N, S tai O, jolloin yksi renkaan hiiliatomeista voi mahdollisesti sisältää karboksi-, sulfo-, karboksi(C_1-C_4)alkyyli- tai sulfo(C_1-C_4)alkyyliryhmän ja rengastyppiatomi voi mahdollisesti olla substituoitu (C_1-C_4)alkyylillä, karboksi(C_1-C_4)alkyyli, sulfo(C_1-C_4)alkyyli tai bentsyyli, (C_3-C_6)alkenyyliä, joka on mahdollisesti substituoitu karboksilla tai sulfolla, 1-deoksi-1-glusityyliä, 2-deoksi-2-glukosyyliä, täysin tyydyttynyttä, 5-7-jäsenistä, typpeä sisältävää heterosyklistä rengasta, jossa typpiatomi voi mahdollisesti olla substitoitu (C_1-C_4)alkyylillä tai

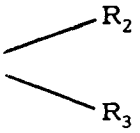
bentsyylillä ja yksi tai kaksi rengasrakenteen hiiliatomia voi sisältää substituentin, joka on (C_1-C_4)alkyyli, karboksi tai sulfo,

tai R_2 ja R_3 yhdessä viereisen typpiatomin kanssa tarkoittavat täysin tyydyttynyttä, 5-7-jäsenistä, heterosyklistä rengasta, joka voi mahdollisesti sisältää toisen heteroatomin, joka on O, S tai N, ja jossa rengashiiliatomeissa voi mahdollisesti olla yksi tai kaksi substituenttia, jotka ovat (C_1-C_4)alkyyli, bentsyyli, karboksi, sulfo, karboksi(C_1-C_4)alkyyli tai sulfo(C_1-C_4)alkyyli,

R_4 tarkoittaa vetyä, metyyliä tai hydroksimetyyliä, sillä edellytyksellä, että kun R_4 on vety tai hydroksimetyyli, R on samanaikaisesti metoksimetyyli ja R_1 on metyyli.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R tarkoittaa metoksimetyyliä ja muut substituentit tarkoittavat samaa kuin patenttivaatimuksessa 1.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R tarkoittaa metoksimetyyliä, R_1 ja R_4 tarkoittavat metyyliä ja Y tarkoittaa ryhmää, jonka kaava on



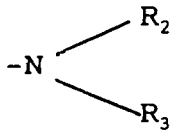
, jossa R_2 on vety ja R_3 tarkoittaa samaa kuin patenttivaatimuksessa 1.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R on metoksimetyyli, R_1 ja R_4 tarkoittavat metyyliryhmää ja Y on amino-osa, joka saadaan luonnollisesta aminohaposta, kuten esimerkiksi glysiinistä, ornitiinista, seriinistä, asparagiinihaposta, tyrosiinista, leusiinista, fenyylialaniinista, metioniinista, proliinista, treoniinista, lysiinistä, tai synteettisestä dipeptidistä, kuten glysyylilysiinistä, seryyliproliinista, glysyy-

liproliiniamidista, tyrosyyliproliiniamidista, treonyyliproliiniamidista, leusyyliproliiniamidista.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R on metoksimetyyli, R_1 ja R_4 ovat metyyli, Y on ryhmä NR_2R_3, jossa R_2 on vety ja R_3 on lineaarinen alkyyliketju, jossa on mieluimmin 3-12 hiiliatomia, vielä mieluummin 3-7 hiiliatomia, jotka ovat substituoidut ryhmällä, joka on COOH, SO_3H tai PO_3H_2.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R on metoksimetyyli, R_1 ja R_4 ovat metyyli, Y on ryhmä NR_2R_3, jossa R_2 on vety ja R_3 on $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-COOH.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R tarkoittaa vetyä, hydroksimetyyliä tai metoksimetyyliä, R_1 tarkoittaa vetyä tai metyyliä, R_4 tarkoittaa vetyä, metyyliä tai hydroksimetyyliä ja Y tarkoittaa ryhmää, jonka kaava on , jossa R_2 on vety ja R_3 tarkoittaa samaa kuin patenttivaatimuksessa 1.

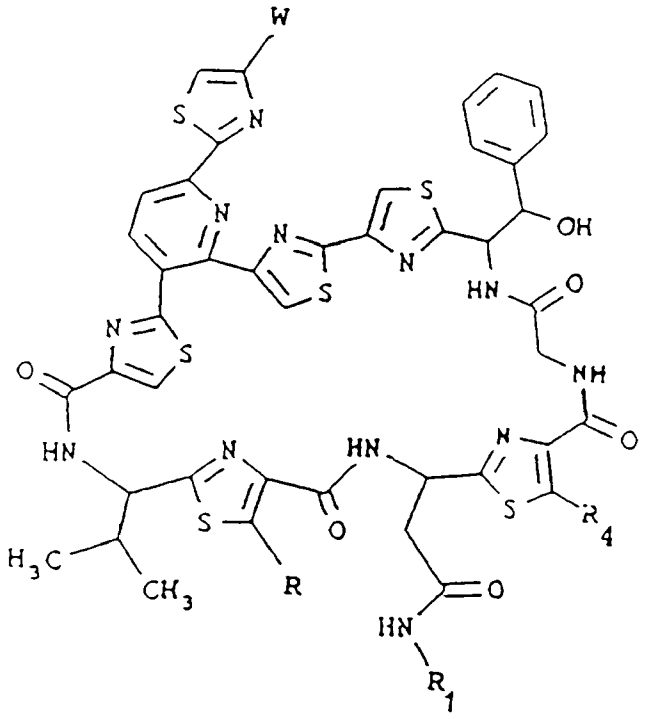
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että Y on amino-osa, joka saadaan luonnollisesta aminohaposta, kuten esimerkiksi glysiinistä, ornitiinista, seriinistä, asparagiinihaposta, tyrosiinista, leusiinista, fenyylialaniinista, metioniinista, proliinista, treoniinista, lysiinistä, tai synteettisestä dipeptidistä, kuten esimerkiksi glysyylilysiinistä, seryyliproliinista, glysyyliproliiniamidista, tyrosyyliproliiniamidista, treonyyliproliiniamidista, leusyyliproliiniamidista.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R on vety, hydroksimetyyli tai metoksimetyyli, R_1 on vety tai metyyli, R_4 on vety, metyyli tai hydroksimetyyli ja Y on ryhmä NR_2R_3, jossa R_2 on vety ja R_3 on line-

aarinen alkyyliketju, jossa on mieluimmin 3-12 hiiliatomia, vielä mieluummin 3-7 hiiliatomia, jotka on substituoitu ryhmällä, joka on COOH, SO_3H tai PO_3H_2.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, **tunnettu** siitä, että R on vety, hydroksimetyyli tai metoksimetyyli, R_1 on vety tai metyyli, R_4 on vety, metyyli tai hydroksimetyyli ja Y on ryhmä NR_2R_3, jossa R_2 on vety ja R_3 on $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-COOH.

11. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että antibiootti GE 2270, jonka kaavan II on



II

jossa W tarkoittaa karboksi- tai aktivoitua esteriryhmää, R tarkoittaa vetyä, hydroksimetyyliä tai metoksimetyyliä, R_1 tarkoittaa vetyä tai metyyliä, R_4 tarkoittaa vetyä, metyyliä tai hydroksimetyyliä, sillä edellytyksellä, että kun R_4 tarkoittaa vetyä tai hydroksimetyyliä, R on samanaikaisesti metoksimetyyli ja R_1 on metyyli, saatetaan reagoimaan valitun kaavan HNR_2R_3 mukaisen amiinin kanssa, jossa R_2 ja R_3 tarkoittavat samaa kuin patenttivaatimuk-

sessa 1, inertissä orgaanisessa liuottimessa ja kun W on karboksi mukana käytetään kondensoidaa ainetta.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kondensoiva aine on (C_1-C_4)alkyyli-, fenyyli- tai heterosyklinen fosforiatsidaatti, kuten difenyylifosforiatsidaatti (DPPA), dietyylifosforiatsidaatti, di(4-nitrofenyyli)fosforiatsidaatti, dimorfolyylifosforiatsidaatti tai difenyylifosforikloridaatti.

13. Patenttivaatimuksien 11 ja 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että reagoivaa amiinia HNR_2R_3 käytetään 1- - 2-kertainen molaarinen ylimäärä verrattuna lähtöaineena käytettyyn antibioottiin ja reaktiolämpötila on 0-20 °C.

14. Minkä tahansa patenttivaatimuksien 1-10 mukainen yhdiste käytettäväksi lääkeaineena.

15. Farmaseuttinen koostumus, **tunnettu** siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksien 1-10 mukaisen yhdisteen aktiiviaineena seoksessa farmaseuttisesti hyväksyttävän kantoaineen kanssa.

16. Minkä tahansa patenttivaatimuksien 1-10 mukaisen yhdisteen käyttö antibioottina käytettävän lääkeaineen valmistamiseksi.