

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 953081 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **953081**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07D493/06

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.12.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **21.06.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.06.1995**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **22.12.1993** PCT/GB1993/002632
Internationell ansökan - International
application

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

22.12.1992 GB 9226724

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Xenova Limited, 240 Bath Road Slough, Berkshire SL1 4EF, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Renno, Didier Vincent, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

2 •O'Beirne, Gerard Bernard, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

3 •Copp, Brent Raymond, Aukland, UUSI-SEELANTI, (NZ)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

**Sekviterpeenit, niiden valmistaminen ja niiden käyttö inhibiittoreina, jotka vaikuttavat GABA-bentsodiatsepiiniireseptoriin
Sekviterpener, deras framställning och deras användning såsom inhibito rer som verkar på GABA-bensodiazepiner**

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

IMI 354451 IMI

Seskviterpeenit, niiden valmistaminen ja niiden käyttö inhibiittoreina, jotka vaikuttavat GABA-bentsodiatsepiinireseptoriin - Seskviterpener, deras framställning och deras användning såsom inhibitorer som verkar på GABA-bensodiazepiner

Esillä oleva keksintö kohdistuu uusiin bentsodiatsepiinireseptoriin sitoutuviin yhdisteisiin. Lisäksi keksintö kohdistuu mainittujen yhdisteiden valmistusmenetelmiin, niitä sisältäviin farmaseuttisiin ja eläinlääkinnällisiin koostumuksiin ja mikro-organismeihin, joista niitä saadaan.

Bentsodiatsepiini (Bz) on konventionaalinen termi, jota käytetään kuvaamaan rakenteellisesti samankaltaisia yhdisteitä, joilla on bentso-1,4-diatsepiiniperusrakenne (Haefely et al., Advances in Drug Res. 14 165-322(1985)). Tämän uuden rengasjärjestelmän aiempien synteettisten analogien farmakologinen seulonta on osoittanut, että bentsodiatsepiineilla on rauhoittavaa ja kouristuksia estävää vaikutusta. Lisätutkimus tuotti vuonna 1960 terapeuttiseen käyttöön tarkoitetun klooridiatsepiinin (Librium).

Laajat sähköfysiologiset tutkimukset ja sitoutumistutkimukset on osoittaneet, että vaikutuksen bentsodiatsepiinimekanismi sisältää pääasiallisen inhiboivan hermotransmitterin, gamma-aminovoihapon (GABA), allosteerisen moduloinnin. Eri-tyisemmin vaikutus saa aikaan neuronien hyperpolarisaation, jonka aiheuttaa lisääntynyt Cl⁻-ionivirtaus GABA-Bz-Cl⁻-ionoforireseptorikompleksin kautta. Tämä reseptorikompleksi on nimetty alatyypiksi A tai GABA_A:ksi.

Suurin osa nykyisin määrätyistä bentsodiatsepiineista on agonisteja ja vaikuttaa tehostamalla GABA-inhiboivaa vaikutusta. Siten niillä on hypnoottisia, kouristusta estäviä ja tuskaa lievittäviä vaikutuksia. Osittaiset (teholtaan alhaiset) agonistit ovat myös mielenkiintoisia, koska niitä voidaan käyttää vähentämään bentsodiatsepiininterapian ei-toivottuja vaikutuksia, kuten rauhoitusta, kestokykyä ja

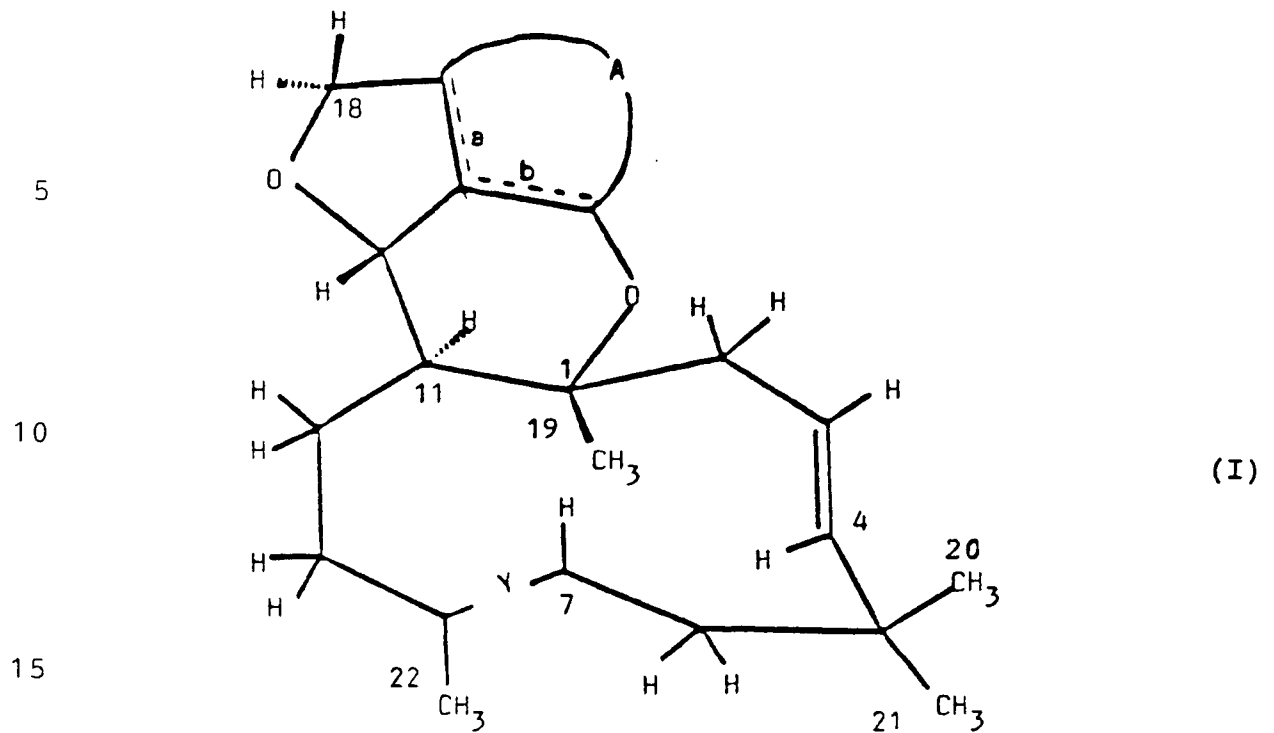
riippuvuutta, säilyttäen silti niiden kliininen vaikutus. Käänteisagonisteilla, joiden biologinen vaikutus on vastakainen klassisille bentsodiatsepiinin vaikutuksille, so. kouristavilla aineilla, on myös postuloitu rooli muistin parantamisessa. Antagonisteilta puuttuu biologinen aktiivisuus mutta niillä on käyttöä ehkäistäessä liiallisia edellä mainittuja vaikutuksia, so. yliannosta. Bentsodiatsepiinien rakenteen aktiivisuuden suhteet (SAR) on karakterisoitu täysin ja farmakofori on identifioitu. Painoa on siten siirretty endogeenisen reseptoriligandin tai uusien rakenteiden identifiointiin potentiaalisina uusina lääkekandidaatteina. Erilaiset kemialliset luokat (esim. bentsatsepiinit, β -karboliinit, syklopyrrolonit, fenyylikinoliinit, triatsolopyridatsiinit ja imidatsopyridiinit) ovat osoittautuneet aktiivisiksi tässä suhteessa. Zopikoni (syklopyrrolonijohdannainen) ja zolpiden (imidatsopyridiini) ovat hypnoottisia aineita.

Nyt on havaittu, että ravintoväliaineen fermentointi sienikannalla Acremonium strictum (Xenova-organismi X06/15/458, IMI 354451) tuottaa uusia yhdisteitä, jotka inhiboivat bentsodiatsepiinin sitoutumista GABA-Bz-Cl⁻-ionoforissa olevaan bentsodiatsepiinireseptoriin. Nämä yhdisteet ovat seskviterpeenejä, jotka muodostavat yhdessä synteettisten johdannaistensa kanssa uuden luokan.

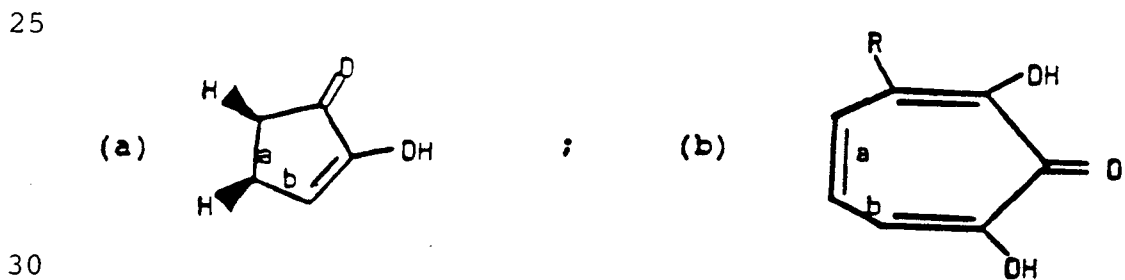
Näin ollen esillä oleva keksintö saa aikaan seskviterpeenin, jolla on kaava I:

30

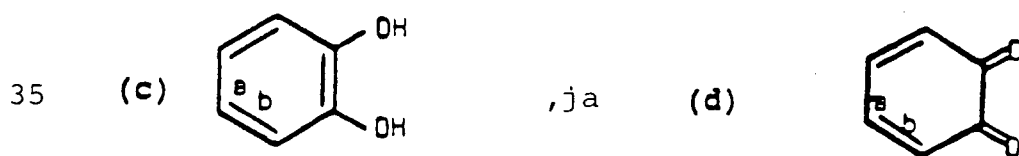
35

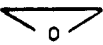


jossa sekä a että b on yksöissidos tai toinen on
 20 yksöissidos ja toinen on kaksoissidos,
 A muodostaa yhdessä a :n että b :n ja hiiliato-
 mien, joihin se on kiinnittynyt, kanssa renkaan, joka on
 valittu seuraavista:

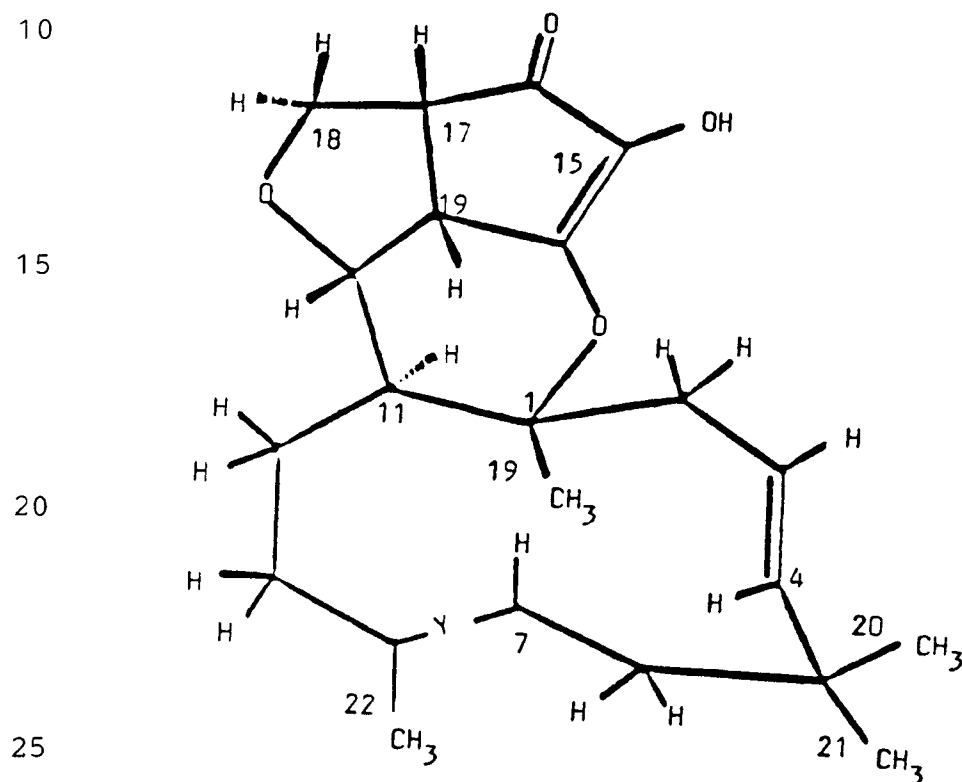


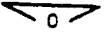
jossa R on H tai OH



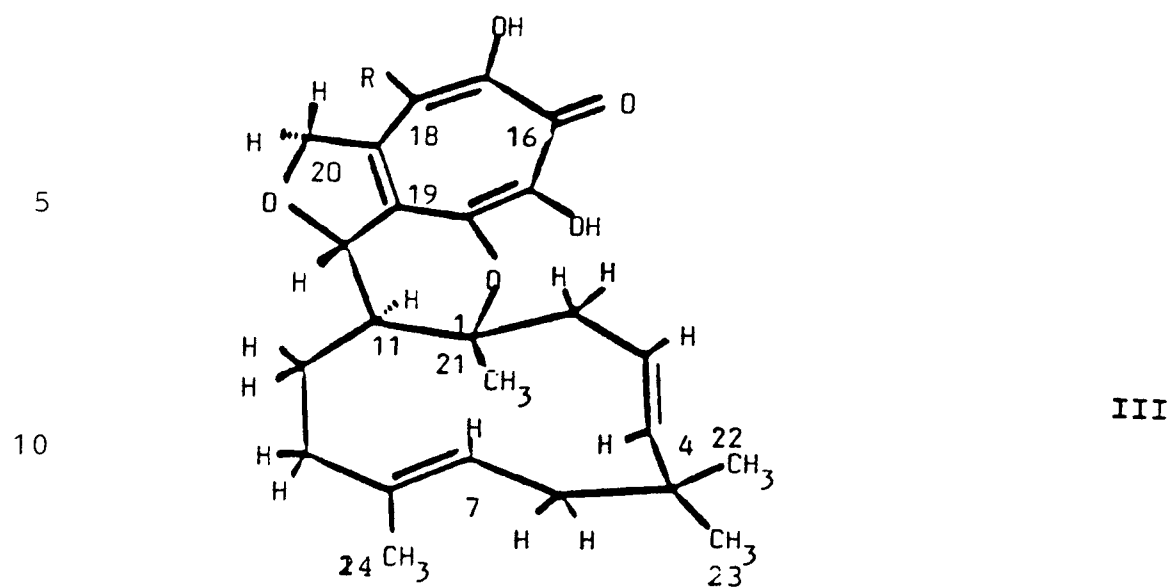
ja Y on kaksoissidos tai, kun A on edellä määritetty rengas (a), Y on joko kaksoissidos tai muodostaa yhdessä hiiliatomin, joihin se on kiinnittynyt, kanssa epoksidikytöksen, , ja sen farmaseuttisesti tai eläinlääketieteellisesti hyväksyttäviä suoloja.

Eräässä suoritusmuodossa kaavan I mukaisella seskviterpeenillä on seuraava rakenne II:



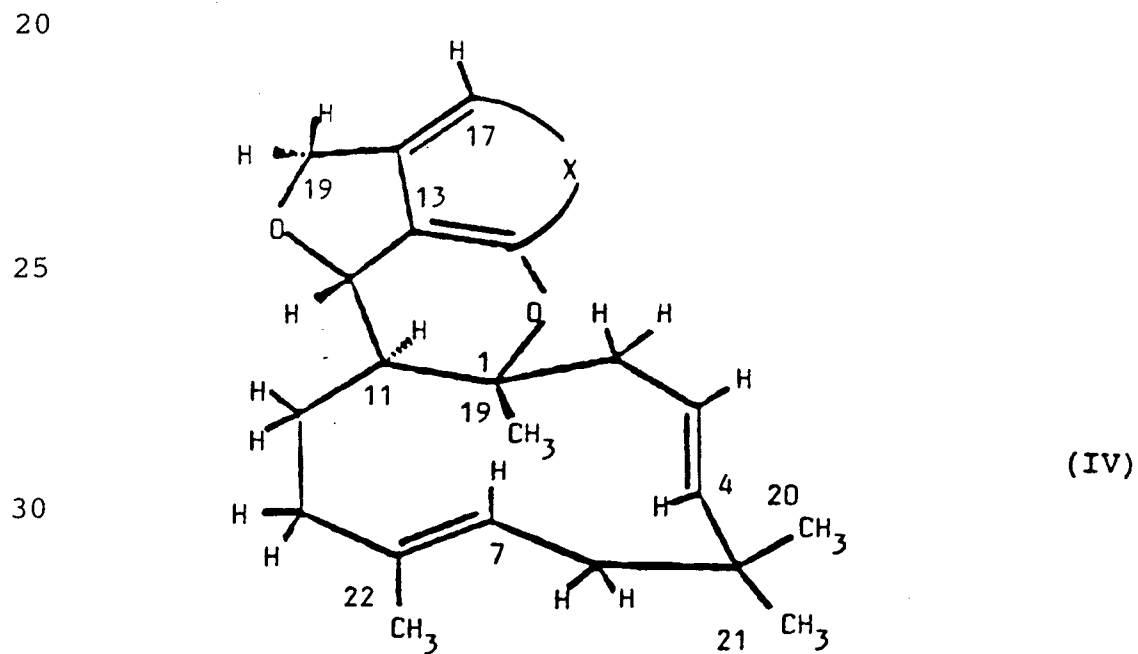
jossa -Y- on kaksoissidos tai muodostaa yhdessä hiiliatomin, joihin se on kiinnittynyt, kanssa epoksidikytöksen .

Toisessa suoritusmuodossa kaavan I mukaisella seskviterpeenillä on seuraava rakenne III:

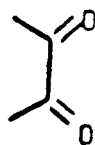


15 jossa R on H tai OH.

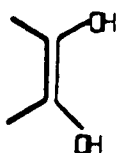
Eräässä suoritusmuodossa kaavan I mukainen seskviterpeenin yhdiste, jolla on seuraava kaava IV:



35 jossa X on



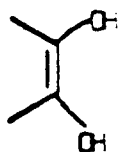
tai



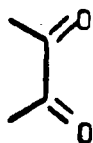
10

Kaavan II mukaista seskviterpeeniä, jossa Y on kaksoissidos, nimitetään tämän jälkeen yhdisteeksi A. Kaavan II mukaista seskviterpeeniä, jossa Y on muodostaa hiiliatomin, johon se on kiinnittynyt, kanssa epoksidikytöksen, nimitetään tämän jälkeen yhdisteeksi A'. Kaavan III mukaista seskviterpeeniä, jossa R on OH, nimitetään tämän jälkeen yhdisteeksi B. Kaavan III mukaista seskviterpeeniä, jossa R on H, nimitetään yhdisteeksi C. Yhdisteen A natriumsuola (15-Ona) on yhdiste D. Kaavan IV mukainen seskviterpeeni, jossa X on

25



on yhdiste E. Kaavan 4 mukainen seskviter-



peeni, jossa X on on yhdiste F. Yhdiste F on yhdisteen E 15,16-ortokinonijohdannainen. Termi "esillä olevat yhdisteet", kun sitä käytetään tämän jälkeen, tarkoittaa kollektiivisesti kaikkia kaavan I mukaisia seskviterpeenejä ja niiden farmaseuttisesti ja eläinlääkinnällisesti hyväksyttäviä suoloja.

35

Kaavan I mukainen seskviterpeeni on eristetty mikro-organismista, jonka nimesimme X06/15/458:ksi ja joka on identifioitu sienikannaksi Acremonium strictum seuraavien morfologisten tietojen pohjalta:

Kasvatettaessa 10 päivää 2 % mallasuuteagarilla kannan X06/15/458 pesäkkeet olivat halkaisijaltaan 15-20 mm verrattuna 37-40 mm:iin, ne itiöityivät runsaasti, olivat ennemminkin puhtaan valkoisia kuin vaihtelivat kellertävän valkoiseen, koostuivat ennemminkin tiheästä kuin irtonaisesta huovastosta, olivat enimmäkseen samettimaisia ja höytäleisiä vain keskustassa untuvaisuuden asemasta keskustassa, reuna epäsäännöllinen, ilmavia, ei teräsvästi rajattuja ja uponneita, conidioforit plektonemaattisesta synnemaattiseen ja pinnalliset pikemminkin kuin vajonneet, pääasiassa ortofialidinen, harvoin monimutkaisempi, suora, asteittain kartiomainen, hyaliininen pikemminkin kuin kromofiilinen, korkeintaan 40-54 μm pitkä x 1,5 μm leveä perustalta verrattuna 20-40 x 1,5-2,0 μm :iin. Sieniversot limaisina valkoisina massoina sylinterimäisesti, 3,0-7,0 x 1,5 μm .

Organismi eroaa seuraavasti tyypillisistä *Acremonium strictum* -kannoista: hitaampi kasvunopeus, puhtaan valkoiset kompaktit pesäkkeet, reuna ilmava, epäsäännöllinen ja diffuusi, conidioforit ilmavia ja niillä on taipumus olla synnemaattisia, keskimääräinen sieniverson pituus pitempi.

Edellä kuvatuista mikroskooppisista ja kokomorfologisista piirteistä sieni-isolaatti X06/15/458 on parhaiten luokiteltu *Acremonium c.f. strictum* W. Gams, kuten kuvataan Gams, W (1971) *Cephalosporium-artige Schimmelpilze*, Gustav Fisher julk.

Kanta X06/15/458 on talletettu Budapestin sopimuksen mukaisesti International Mycological Instituteen, Egham, Surrey, UK. 7. lokakuuta 1992 talletusnumerolla IMI 354451.

Edellä oleva kuvaus valaisee *Acremonium strictum* -kantaa, jota voidaan käyttää esillä olevan keksinnön mukaisten seskviterpeenien valmistuksessa.

Esillä oleva keksintö käsittää kuitenkin edellä kuvatun mikro-organismin mutantit. Esimerkiksi ne, jotka saadaan

luonnollisella valikoinnilla, tai ne jotka valmistetaan mutatointiaineilla mukaan lukien ionisoiva säteilytys, kuten ultraviolettisäteilytys, tai kemialliset mutageenit, kuten nitrosoguanidiini tai muut senkaltaiset käsittelyt, 5 ovat tämän keksinnön piirissä.

Esillä oleva keksintö saa lisäksi aikaan menetelmän esillä olevien yhdisteiden valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää (i) sienikannan X06/15/458 (IMI354451) tai sen mu- 10 tantin, joka tuottaa kaavan (I) mukaista seskviterpeenä, fermentoimisen hiilen, typen ja ei-orgaanisten suolojen lähteessä, (ii) mainitun seskviterpeenin eristämisen fermentointiväliaineesta, (iii) kaavan I mukaisen seskviterpeenin, jossa A on rengas (c), hapettamisen haluttaessa 15 kaavan I mukaiseksi seskviterpeeniksi, jossa A on rengas (d) ja/tai (iv) mainitun seskviterpeenin muuttamisen haluttaessa farmaseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksyttäväksi suolakseen.

20 Kaavan I mukaiset seskviterpeenit valmistetaan tyypillisesti sieniravintoväliaineen aerobisen fermentoinnin aikana jäljempänä kuvatuissa olosuhteissa tuottamalla kanta *Acremonium strictum* X06/15/458 tai tuottamalla X06/15/548:n mutanttikanta. Vesipitoiset väliaineet, kuten ne, joita 25 käytetään monien antibioottisubstanssien valmistamiseen, ovat sopivia. Tällainen ravintoväliaine sisältää hiilen ja typen lähteet, jotka mikro-organismi assimiloii. Haluttaessa voidaan lisätä ei-orgaanisia suoloja, tavallisesti alhaisina tasoina. Lisäksi fermentointiväliaine voi sisältää pieniä 30 määriä metalleja, joita tarvitaan mikro-organismin kasvuun ja haluttujen yhdisteiden tuotantoon. Niitä on tavallisesti läsnä riittävinä konsentraatioina hiilen ja typen kompleksilähteissä, joita voidaan käyttää ravintoainelähteinä, mutta joita voidaan myös lisätä tietenkin haluttaessa 35 erikseen väliaineeseen. Esillä olevan keksinnön kohteena on sienikannan X06/15/458 tai mutantin biologisesti puhdas viljelmä, joka tuottaa kaavan I mukaista seskviterpeenä. Tällaiset viljelmät ovat oleellisesti vapaita muista mikro-organismeista.

Assimiloitavat hiilen, typen ja mineraalien lähteet voidaan saada aikaan joko yksinkertaisilla tai kompleksisilla ravintoaineilla. Hiililähteet käsittävät tavallisesti glukosin, maltoosin, tärkkelyksen, glyserolin, melassit, dekstriinin, laktoosin, sakkaroosin, fruktoosin, karboksyylihapot, aminohapot, glyseridit, alkoholit, alkaanit ja kasviöljyt. Hiililähteet käsittävät tavallisesti 0,5-10 paino-% fermentointiväliaineesta.

10 Typpilähteet käsittävät tavallisesti soijapapujauhon, viljanliotusnesteet, tislauksakat, hiivauutteet, puuvillansienjauhon, peptonit, maapähkinäjauhon, mallasuutteen, melassit, kaseiinin, aminohapposeokset, ammoniakkin (kaasu tai liuos), ammoniumsuolat tai -nitraatit. Ureaa ja muita ami-

15 deja voidaan myös käyttää. Typpilähteet käsittävät tavallisesti 0,1-10 paino-% fermentointiväliaineesta.

Ravintomineraalisuolat, joita voidaan sisällyttää viljelyväliaineeseen, käsittävät tavallisesti käytettyjä suoloja,

20 jotka kykenevät tuottamaan natrium-, kalium-, ammonium-, rauta-, magnesium-, sinkki-, nikkeli-, koboltti-, manganee- si-, vanadiini-, kromi-, kalsium-, kupari-, molybdeenin-, boori-, fosfaatti-, sulfaatti-, kloridi- ja karbonaatti-ioneita.

25 Vaahtoamisen estoainetta voi olla läsnä liiallisen vaahtoamisen estämiseksi ja sitä voidaan lisätä tarvittavin välein.

30 Fermentointi käyttämällä *Acremonium strictum* X06/15/458:aa voidaan suorittaa lämpötiloissa alueella 20-30 °C, edullisesti 24-30 °C. Optimaalisten tulosten saamiseksi on tarkoituksenmukaisinta suorittaa nämä fermentoinnit lämpötilassa alueella 24-26 °C. Ravintoväliaineen pH, joka on so-

35 piva yhdisteiden valmistamiseen, voi vaihdella välillä 5,0-8,5 edullisen alueen ollessa 6,0-7,5.

Pienen mittakaavan fermentoinnit suoritetaan tarkoituksenmukaisesti sijoittamalla sopivia määriä ravintoväliainetta

pulloon tunnetuilla tekniikoilla, inokuloimalla pullo joko *Acremonium strictum* itiöillä tai vegetatiivisella solukasvulla, sulkemalla pullo puuvillatulpalla löysästi ja antamalla fermentaation edistyä vakiohuoneenlämpötilassa noin
 5 25 °C kiertoravistimessa noin 95-300 rpm:ssä 2-10 päivää.

Suuremman mittakaavan työssä on edullista suorittaa fermentointi sopivissa säiliöissä, jotka on varustettu sekoittimella ja fermentointiväliaineen ilmastusvälineellä. Ravin-
 10 toaineväliaine valmistetaan säiliöön ja steriloinnin jälkeen se inokuloidaan *Acremonium strictum* vegetatiivisen solukasvun lähteellä. Fermentaation annetaan jatkua 1-8 päivää sekoittaen ja/tai ilmastaen samalla ravintoväliainetta lämpötilassa alueella 24-30 °C. Ilmastuksen määrä
 15 riippuu useista tekijöistä, kuten fermentterin koko ja sekoitusnopeus. Yleensä suuremman mittakaavan fermentointeja sekoitetaan noin 95-500 rpm ja ilmastuksissa noin 0,1-1,0 vvm.

20 Kaavan I mukainen seskviterpeeni löydetään ensisijaisesti huovastosta fermentoinnin päätyttyä ja se voidaan ottaa talteen ja puhdistaa. Yhdisteen erottaminen ja puhdistaminen fermentointiliemestä ja sen talteenotto voidaan suorittaa käyttämällä liuotinuuttoa, mitä seuraa konventionaalisten kromatografisten fraktionointien käyttäminen erilaisilla kromatografiatekniikoilla ja liuotinjärjestelmillä.
 25 Seskviterpeeni voidaan saada oleellisesti puhtaassa muodossa.

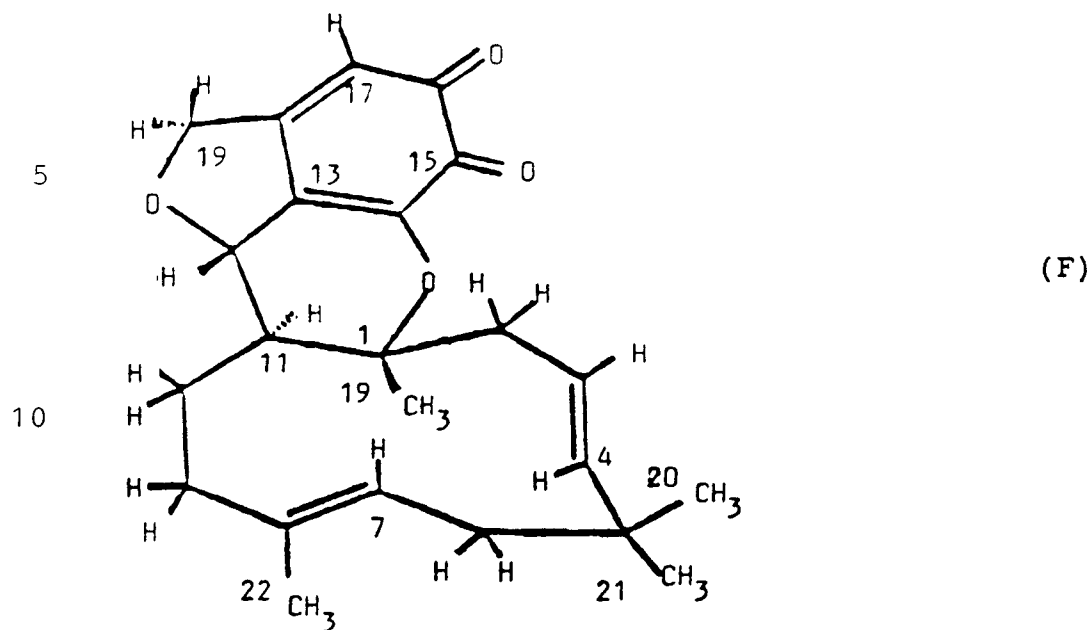
30 Kaavan I mukaiset seskviterpeenit ovat orgaanisiin liuottimiin mukaan lukien etyyliasetaatti, metanoli ja aseton, liukeenevia. Tätä ominaisuutta voidaan käyttää niiden talteenottamiseen fermentointihuovastosta. Täten fermentointihuovastoon yhdistetään sopivasti suunnilleen yhtäläinen
 35 tilavuus orgaanista liuotinta, esimerkiksi asetonia. Saatu raakauute voidaan sitten konsentroida lasketussa paineessa vesisuspension saamiseksi, joka takaisinuuutetaan orgaanisella liuottimella raa'an orgaanisen uutteen saamiseksi. Kokonaisuute suodatetaan (tai sentrifugoidaan) lasketussa

paineessa. Orgaaninen jäännös puhdistetaan sitten ensin kromatografoimalla, esimerkiksi Sephadex LH-20 -pylväskromatografiolla metanoli eluenttina.

- 5 Haluttu tuote ja joitakin epäpuhtauksia pysyy pylväässä, joskin monet epäpuhtaudet (erityisesti ei-polaariset epäpuhtaudet) eivät pysy. Pylväs pestään ei-polaarisella orgaanisella liuottimella, kuten heksaanilla tai tolueenilla muiden epäpuhtauksien poistamiseksi, mitä seuraa jaksoit-
- 10 taiset dikloorimetaanin tai kloroformin ja toisen orgaanisen liuottimen, kuten metanolin tai etyyliasetaatin, seokset. Liuotin haihdutetaan ja jäännös kromatografoidaan edelleen esimerkiksi pylväskromatografiolla, ohutkerroskromatografiolla, preparatiivisella kerroskromatografiolla tai
- 15 suuren suorituskyvyn nestekromatografiolla. Edullisessa suoritumuodossa tämä lisäkromatografointivaihe käsittää toistetun käänteisfaasi-C18 HPLC:n (25 x 10 cm, CH₃CN:H₂O-gradientti).
- 20 Sopivat adsorboivat aineet käsittävät piidioksidigeelin ja oktadekyyllisidotun piidioksidin samalla kun eluenttina voidaan käyttää erilaisia liuottimia tai liuottimien yhdistelmiä. Sitten eluaatin fraktiot tutkitaan ohutkerroskromatografiolla, suuren suorituskyvyn nestekromatografiolla tai
- 25 muilla konventionaalisilla tekniikoilla halutun yhdisteen havaitsemiseksi ja eristämiseksi. Edellä mainittujen tekniikoiden käyttäminen tuottaa puhdistettuja koostumuksia, jotka sisältävät haluttua seskviterpeeniä, jonka läsnäolo määritetään analysoimalla erilaisista kromatografisista fraktioista
- 30 fysikaalis-kemialliset piirteet ja/tai bentsodiatsepiinireseptorikompleksiin sitoutumisaktiivisuus.

Kaavan I mukainen seskviterpeeni, jossa A on rengas (c) (yhdiste E) voidaan hapettaa 15,16-ortokinonijohdannaiseksi, joka on kaavan I mukainen seskviterpeeni, jossa A on

35 rengas (d) (yhdiste F). Yhdisteen F rakenne on seuraava:



Hapettaminen voidaan saavuttaa antamalla yhdisteen E liuok-
sen seisoa ilmassa. Vaihtoehtoisesti hapettaminen voidaan
saavuttaa tai edellä kuvattua ilmahapettamista voidaan
kiihdyttää lisäämällä yhdisteen E liuokseen hapetusainetta.
20 Sopiva esimerkki hapetusaineesta on natriumperjodaatti.

Kaavan I mukainen seskviterpeeni voidaan muuttaa farmaseut-
tisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksyttäväksi suolak-
seen.

25 Esimerkit sopivista suoloista käsittävät ne, joissa on al-
kalimetalleja, kuten natriumia ja kaliumia, ja ammoniumsuo-
lat. Yhdiste D, yhdisteen A natriumsuola, voidaan valmistaa
esimerkiksi käsittelemällä yhdiste A natriumhydroksidilla
30 metanolissa.

Esillä olevilla yhdisteillä on aktiivisuutta hoidettaessa
sairauksia, joita moduloivat GABA-Bz-Cl⁻-ionoforireseptori-
kompleksin sisältämät bentsodiatsepiinireseptorin ligandit.
35 Potilasta hoidetaan keksinnön mukaisesti menetelmällä, joka
käsittää terapeuttisesti tehokkaan määrän jotakin keksinnön
mukaista yhdistettä antamisen potilaalle. Tällä tavalla
esillä olevan keksinnön mukaisia yhdisteitä, joissa on ago-
nistiaktiivisuutta, voidaan käyttää bentsodiatsepiinin si-

toutumisesta GAB-Bz-Cl⁻-ionoforireseptorikompleksin sisältämään bentsodiatsepiinireseptoriin johtuvien tilojen estämiseen.

- 5 Esillä olevilla yhdisteillä on osoittautunut olevan aktiivisuutta bentsodiatsepiinireseptoriin sitoutumistestissä, jossa käytetään puhdistetussa GABA-Bz-Cl⁻-ionoforireseptorikompleksissa läsnäolevalle reseptorille spesifistä tritiumoitua ligandia. Testin yksityiskohdat on esitetty jäl-
- 10 jempänä olevassa esimerkissä 5.

Esillä olevia yhdisteitä voidaan antaa erilaisissa annosmuodoissa, esimerkiksi oraalisesti, kuten tablettien, kapselien, sokerilla tai kalvolla päällystettyjen tablettien,

15 nestemäisten liuosten tai suspensioiden muodossa, tai parenteraalisesti, esimerkiksi lihaksen sisäisesti, suonensisäisesti tai ihonalaisesti. Esillä olevat yhdisteet voidaan antaa siten injektoimalla tai infuusiona.

- 20 Annos riippuu erilaisista tekijöistä, kuten potilaan ikä, paino ja kunto sekä antoreitti. Kuitenkin tavallisesti annos, joka sopii jokaiselle antoreitille aikuisille ihmisille annettavaksi, on 0,001-10 mg/kg, yleisemmin alueella 0,1-5 mg/kg ruumiinpainokiloa kohti. Tällainen annos voi-
- 25 daan antaa esimerkiksi 1-5 kertaa päivässä oraalisesti tai bolusinfuusiona, infusoimalla useita tunteja ja/tai antamalla toistuvasti.

Esillä olevan keksinnön mukaiset yhdisteet formuloidaan

30 käytettäviksi farmaseuttisena tai eläinlääkinnällisenä koostumuksena, joka sisältää lisäksi farmaseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksyttävää kantoainetta tai laimentainta. Koostumukset valmistetaan tyypillisesti noudattamalla konventionaalisia menetelmiä ja niitä annetaan far-

35 maseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti sopivassa muodossa.

Kiinteä oraallinen muoto voi sisältää esimerkiksi yhdessä aktiivisen yhdisteen kanssa laimentimia, kuten laktoosia, dekstroosia, sakkaroosia, selluloosaa, maissitärkkelystä

tai perunatärkkelystä, liukastavia aineita, kuten piidioksidia, talkkia, steariinihappoa, magnesium- tai kalsiumstearaattia ja/tai polyetyleeniglykoleja, sideaineita, kuten tärkkelyksiä, arabikumeja, gelatiinia, metyyyliselluloosaa, 5 karboksimeytyyliselluloosaa tai polyvinyylipyrrolidonia, hajotusaineita, kuten tärkkelystä, algiinihappoa, alginaatteja tai natriumtärkkelysglykolaattia, poreiluseoksia, väriaineita, makeutusaineita, kostutusaineita, kuten lesitiiniä, polysorbaattia, lauryylisulfaatteja. Tällaisia 10 valmisteita voidaan valmistaa tunnetulla tavalla, esimerkiksi sekoittamalla, granuloidamalla, tabletoimalla, sokeripäällystys- tai kalvopäällystysmenetelmillä.

Oraaliseen antamiseen tarkoitettut nestemäiset dispersiot 15 voivat olla siirappeja, emulsioita ja suspensioita. Siirapit voivat sisältää kantoaineena esimerkiksi sakkaroosia tai sakkaroosia glyserolin ja/tai mannitolin ja/tai sorbitolin kanssa. Erityisesti diabeetikopotilaille tarkoitettu siirappi voi sisältää kantoaineina vain tuotteita, esimerkiksi 20 sorbitolia, jotka eivät metabolisoidu glukooksi tai jotka metaboliisoituvat vain pienenä määränä glukooksi. Suspensiot tai emulsiot voivat sisältää kantoaineena esimerkiksi luonnonkumia, agaria, natriumalginaattia, pektiiniä, metyyyliselluloosaa, karboksimeytyyliselluloosaa tai 25 polyvinyylialkoholia.

Lihaksen sisäiseen injektointiin tarkoitettut suspensiot tai liuokset voivat sisältää yhdessä aktiivisen yhdisteen kanssa farmaseuttisesti hyväksyttävää kantoainetta, kuten steriiliä vettä, oliiviöljyä, etyylioleaattia, glykoleita, 30 kuten propyleeniglykolia, ja haluttaessa sopivan määrän lidokaiinihydrokloridia. Suonensisäiseen injektointiin tai infuusioon tarkoitettut suspensiot tai liuokset voivat sisältää kantoainetta, kuten steriiliä vettä, joka on tavallisesti injektointivesi. Ne voivat olla kuitenkin edullisesti steriilin, vesipitoisen, isotonisen suolaliuoksen muodossa. Vaihtoehtoisesti esillä oleva yhdiste voi olla kapseloitu liposomeihin.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä:

Esimerkki 1: X06/15/458:n viljeleminen nestemäisessä väliaineessa

- 5 Kannan X06/15/458 lähtömateriaali generoitiin suspendoimalla kypsä vinopintaviljelmä, joka on kasvatettu MEA:ssa (2 % mallasuutetta, 1,5 % agaria), 5 ml:ssa 10-%:ista glyserolin vesiliuosta. 1 ml tätä suspensiota 1,5 ml:ssa kryolääkepullosta käsittää lähtömateriaalin, joka siirrettiin -135
- 10 °C:n varastosta. Esiviljelmä valmistettiin sijoittamalla aseptisesti 0,5 ml lähtömateriaalia 10 ml:aan ravintoaineliuosta S (1,5 % glyserolia, 1,5 % soijapapupeptonia, 1 % D-glukoosia, 0,5 % mallasuutetta, 0,3 % NaCl, 0,1 % CaCO₃, 0,1 % Tween 80, 0,1 % Junlon PW110 (toimittajat: Honeywell
- 15 and Stein Ltd., Times House, Throwley Way, Sutton, Surrey, SM1 4AF, säädettyä pH:hon 6) testiputkessa (25 mm x 200 mm), jota ravistettiin 240 rpm:ssä 4 päivää 25 °C:ssa.

- Välituoteviljelmä valmistettiin sitten siirtämällä aseptisesti esiviljelmä 300 ml:aan ravintoaineliuosta S 21 Erlenmeyer -pulloon ja inkuboimalla kiertoavistimessa 240
- 20 rpm:ssä 3 päivää 25 °C:ssa.

- Tuotantoviljelmä generoitiin siirtämällä aseptisesti välituoteviljelmä 14 l:n sekoitettuun fermentteriin, joka sisälsi 10 l ravintoaineliuosta P (2,38 % trehaloosia, 0,69 % hiivauutetta, 0,1 % karboksimeetyyliselluloosaa, 0,1 % Tween 80, 0,98 % MES, säädettyä pH:hon 6). Astiaa sekoitettiin 340 rpm:ssä ja se ilmastettiin 0,7 vvm:ssä. pH:ta
- 25 ei säädetty vaan se pysyi alueella 6,0-7,0. Fermentoinnin aikana fermentteriä pidettiin vakio-lämpötilassa 25 °C. 7
- 30 päivän kuluttua fermentaatio pysäytettiin ja biomassa otettiin talteen tuotteen uuttamista varten.

- 35 Suuremman mittakaavan fermentaatiot käyttäen 75 litran fermenttereitä suoritettiin seuraavasti. 40 ml:n esiviljelmä valmistettiin aiemmin kuvatusti (neljä 25 x 200 mm:n testiputkea) ja ne siirrettiin kukin 2 litraan ravintoaineliuosta S, joka on 3 litran fermentterissä. Astiaa sekoitet-

tiin 500 rpm:ssä ja ilmastettiin 0,25 vvm:ssä. pH:ta ei säädetty ja lämpötila pidettiin 25 °C:ssa. 4 päivän kuluttua tämä välituoteviljelmä siirrettiin aseptisesti 75 litran fermentteriin, joka sisälsi 50 litraa ravintoaineliuosta P. Astia ilmastettiin 0,5 vvm:ssä ja sitä sekoitettiin 350 rpm:ssä ylläpitäen liuenneen hapen paine >70 % koko fermentoinnin ajan. pH:ta ei säädetty vaan se pysyi välillä 6,0-7,0 ja lämpötila pidettiin vakiona 25 °C:ssa. 7 päivän kuluttua fermentaatio pysäytettiin ja biomassa otettiin talteen.

Esimerkki 2: Yhdisteen A uuttaminen ja puhdistaminen

14 ml fermentointilientä sentrifugoitiin ja huovasto (~344 g) uutettiin asetonilla (3 x 5 l). Uute konsentroitiin kiviakksi (8,0 g) ja liuotettiin uudelleen puhtaaseen metanoliin. Puhdistaminen suoritettiin käänteisfaasipreparatiivisella HPLC:llä käyttämällä Waters Delta-Pak C18- (100 Å, 15 µm) -pylvästä (ID 10,0 mm, pituus 25,0 cm) ja 4 minuutin liikkuvan faasin gradienttia (80-%:inen asetonitriilin vesiliuos, 12 ml/min virtausnopeus) nostaen lineaarisesti 20 minuuttiin (100 % asetonitriiliä, 12 ml/min virtausnopeus). Aallonpituuden monitorointi oli 280 nm:ssä.

17-18 minuutissa kerätty huippu alistettiin lisäpuhdistukseen käyttämällä samaa pylvästä mutta 15 minuutin liikkuvan faasin gradienttia (40-%:inen asetonitriilin vesiliuos, 12 ml/min virtausnopeus), joka nousi lineaarisesti 20 minuuttiin (100 % asetonitriiliä, 12 ml/min virtausnopeus).

9-10 minuutin välillä kerätty huippu oli kaavan II mukainen seskviterpeeni, jossa Y on kaksoissidos. Yhdisteellä oli seuraavat fysikaaliset piirteet:

Molekyylikaava: $C_{22}H_{30}O_4$

Molekyyllipaino: 358

Liukenevuus käsittää metanolin, asetonin, etyyliasetaatin.

UV: $[\lambda_{max}(nm)(\epsilon)]:$

276.6 (4900)

MeOH

207.6 (30000) MeOH-KOH

311.2 (4100)

Massaspes.: [m/z (intensiteetti (%))]:

5 DEI 358 (M^+ , 100), 233 (55), 203 (15), 155 (20)

DCI (NH_3) 359 (MH^+ , 100), 233 (10), 203 (20), 155 (20)

Suuren resoluution CI: 359.2270,

10 $C_{24}H_{31}O_4$ edellyttää 359.2214

IR (KBr): [ν in cm^{-1}]:

3395.2, 2930.2, 1730.4

15

1H -NMR: [400 MHz, CD_3OD , δ (m, J, posn)]:

1.13 (3H, s, 3H-21), 1.14 (3H, s, 3H-20), 1.37 (1H, m,
H-10a), 1.51 (3H, s, 3H-19), 1.58 (1H, bddd, 13.2, 10.1,
20 6.8, H-10a), 1.72 (3H, s, 3H-22), 1.85 (1H, bdd, 13.0, 4.5,
H-6a), 2.08 (1H, bdd, 12.5, 7.1, H-9a), 2.22 (1H, bdd, 9.8,
5.2, H-11), 2.23 (1H, bdd, 11.6, 11.6, H-9b), 2.33 (1H,
bdd, 12.7, 12.7, H-6b), 2.38 (1H, dd, 14.5, 9.9, H-2a),
25 2.70 (1H, bddd, 14.5, 2.2, 1.6, H-2b), 3.02 (1H, ddd, 7.8,
5.6, 1.5, H-17), 3.67 (1H, dd, 5.8, 5.8, H-13), 3.80 (1H,
dd, 9.3, 7.9, H-18a), 3.83 (1H, bdd, 6.0, 6.0, H-12), 4.03
(1H, bdd, 9.3, 1.5, H-18b), 5.17 (1H, m, H-7), 5.24 (1H,
30 dd, 15.9, 1.5, H-4), 5.32 (1H, ddd, 15.9, 10.0, 2.2, H-3).

^{13}C -NMR: [100 MHz, CD_3OD , δ (m, posn)]:

35 17.66 (q, C-22), 23.71 (q, C-19), 24.92 (q, C-20), 30.85
(q, C-21), 32.24 (t, C-10), 37.37 (t, C-9), 39.37 (s, C-5),
42.22 (d, C-13), 43.11 (t, C-6), 45.01 (d, C-11), 45.17 (t,
C-2), 48.97 (d, C-17), 70.86 (t, C-18), 83.70 (d, C-12),

88.94 (s, C-1), 121.90 (d, C-3), 124.68 (d, C-7), 135.25 (s, C-15), 137.39 (s, C-8), 144.73 (d, C-4), 166.96 (s, C-14), 200.99 (s, C-16).

5

Esimerkki 3: Yhdisteen B uuttaminen ja puhdistaminen

75 ml fermentointilientä sentrifugoitiin ja huovasto uutettiin etyyliasetaatilla (5 x 10 l). Tämä uute konsentroitiin kuivaksi ja liuotettiin uudelleen metanoliin. Puhdistaminen
 10 suoritettiin käänteisfaasipreparatiivisella HPLC:llä käyttämällä Waters Delta-Pak C18- (100 Å, 15 µm) -pylvästä (ID 10,0 mm, pituus 25,0 cm) ja 5 minuutin liikkuvan faasin gradienttia 80 %:ssa asetonitriiliä (10 ml/min virtausnopeus). Aallonpituuden monitorointi oli 280 nm:ssä. Yhdiste,
 15 joka eluoitui 23-25 minuutin välillä, oli yhdiste B, kaavan III mukainen seskviterpeni, jossa R on H. Yhdisteellä oli seuraavat fysikaaliset piirteet:

Molekyylikaava: $C_{24}H_{30}O_6$

Molekyyllipaino: 414

20

Liukenevuus käsittää metanolin, etyyliasetaatin, kloroformin, asetonin.

UV: $[\lambda_{\text{Max}}(\text{nm}) (\epsilon)]:$

25 200 HPLC-liuotin (H_2O-CH_3CN)

268

368

30

277.0 (29500) MeOH

353.5 (3900)

35

289.8 (32100) MeOH-KOH

344.4 (3800)

271.6 (47000) MeOH-TFA
324.8 (3400)

5 Massaspes.: [m/z (intensiteetti (%))]:

DEI 414 (M⁺,100), 331 (45), 277(20), 211 (50)

10 DCI (NH₃) 415 (MH⁺,100)

Suuren resoluution EI: 414.2059,
C₂₄H₃₀O₆ edellyttää 414.2034
211.0240, C₉H₇O₆ edellyttää 211.0240.

15

IR (KBr): [V in cm⁻¹]:

3265, 2960, 2930, 2855, 1735, 1625

20 ¹H-NMR: [400 MHz, CDCl₃, δ (m, J, posn)]:

1.4(t), 1.7(dd), 1.75(dd), 2.05(dd), 2.16(d+dd), 2.3(t),
2.4(dd), 2.7(dt), 4.9(d+td), 5.05(d+d), 5.2(dd), 5.25(dd).

25

¹³C-NMR: {100 MHz, CDCl₃, δ (m, posn)}:

30 160.4,150,146.1,144.2,144,142.1,136,126.9,123.7,123,118.7,
86.9,84.3,72.3,43.5,41.4,40.7,38.2,37.7,29.4,28.2,24.2,
22.7,17

35 Esimerkki 4: Yhdisteen C uuttaminen ja puhdistaminen

75 ml fermentointilientä sentrifugoitiin ja huovasto uutettiin etyyliasetaatilla (5 x 10l). Tämä uute konsentroitiin kuivaksi ja liuotettiin uudelleen metanoliin. Puhdistaminen suoritettiin käänteisfaasipreparatiivisella HPLC:llä käyt-

tämällä Waters Delta-Pak PrepPak 3000 -panosta (C18, 100 Å, 15 µm ID 47 mm, pituus 30,0 cm) ja 0,5 minuutin liikku-
 van faasin gradienttia 80-%:isessa asetonitritriilin vesi-
 liuoksessa (50 ml/min virtausnopeus) nostaen lineaarisesti
 5 30 minuuttiin 100-%:isessa asetonitriilissä (50 ml/min vir-
 tausnopeus). Yhdiste, joka eluokitui 18-19 minuutin välillä,
 oli yhdiste C, kaavan II mukainen seskviterpeni, jossa R
 on H. Tämä huippu puhdistettiin edelleen käyttämällä samaa
 pylvästä mutta ilman 5 minuutin liikkuvan faasin gradient-
 10 tia 30-%:isessa asetonitriilin vesiliuoksessa (50 ml/min
 virtausnopeus) nostaen lineaarisesti 10 minuuttiin 15-%:i-
 sessa asetonitriilin vesiliuoksessa (50 ml/min virtausno-
 peus). Tätä liuotinkoostumusta pidettiin sitten 15 minuut-
 tia 15-%:isessa asetonitriilin vesiliuoksessa (50 ml/min
 15 virtausnopeus) ja nostettiin sitten lineaarisesti 5 minuut-
 tin kuluttua 100 %:iin asetonitriiliä (50 ml/min virtausno-
 peus). Mielenkiinnon kohteena oleva huippu (yhdiste C) elu-
 oitui 22-24 minuutin välillä tämän gradientin alaisena. Yh-
 disteellä oli seuraavat fysikaaliset piirteet:

20

Molekyylikaava: C₂₄H₃₀O₅

Molekyylipaino: 398

Liukenevuus käsittää metanolin, asetonin, etyyliasetaatin.

25	UV:	[λ _{max} (nm) (ε)]:	
		270.6 (41700)	MeOH
		338.4 (3800)	
30		209.3 (13300)	MeOH-KOH
		282.3 (41400)	
		326.4 (3200)	
		342.8 (3900)	
35		390.0 (3000)	
		271.2 (52200)	MeOH-TFA
		316.6 (4300)	

Massaspes.: [m/z (intensiteetti (%))]:

DEI 398 (M⁺, 100), 315 (90), 256 (100), 233 (95),
195 (40)

5 DCI(NH₃) 399 (MH⁺, 100), 222 (10), 205 (90), 195 (20),
172 (70)

Suuren resolution EI: 398.2093,
10 C₂₄H₃₀O₅ edellyttää 398.2085

IR (KBr): [ν in cm⁻¹]:

3400 (sh), 3200, 2928, 1750, 1600, 1380

15 ¹H-NMR: [400 MHz, C₆D₆, verrattu 7,16 ppm:ään, δ (m, J,
posn)]:

0.75* (3H, s, 3H-23), 0.93* (3H, s, 3H-22), 1.01 (3H, s, 3H-
21), 1.11 (1H, t, 11.7, H-10a), 1.40 (1H, bdd, 14.9, 7.6,
20 H-10b), 1.45 (3H, bs, 3H-24), 1.63 (1H, dd, 13.0, 5.0, H-
6a), 2.05 (1H, bt, 11.5, H-6b), 2.10 (1H, m, H-2a), 2.11
(1H, m, H-9a), 2.17 (1H, dd, 11.0, 3.8, H-11), 2.60 (1H, t,
12.1, H-9b), 2.74 (1H, bd, 14.5, H-2b), 4.37 (1H, dd, 12.9,
25 1.6, H-20a), 4.44 (1H, dd, 13.0, 3.2, H-20b), 4.59 (1H,
bdt, 11.2, 3.0, H-12), 5.01 (1H, dd, 15.8, 1.5, H-4), 5.11
(1H, dd, 15.8, 2.8, H-3), 5.15 (1H, bdd, 10.0, 3.2, H-7),
30 6.57 (1H, s, H-18).

¹³C-NMR: [100 MHz, C₆D₆, verrattu 128,00 ppm:ään, δ (m,
posn)]:

35 17.20 (q, C-24), 22.82 (q, C-21), 24.21* (q, C-23), 28.61
(t, C-10), 29.55* (q, C-22), 38.28 (t, C-9), 38.33 (s, C-
5), 41.44 (d, C-11), 41.93 (t, C-6), 43.98 (t, C-2), 75.35
(t, C-20), 85.28 (d, C-12), 86.75 (s, C-1), 108.49 (d, C-

18), 120.05 (d, C-3), 124.20 (d, C-7), 127.94 (s, C-13),
 136.22 (s, C-8), 137.45 (s, C-19), 143.74 (d, C-4) 147.96
 (s, C-14), 149.71 (s, C-15), 160.00 (s, C-17), 165.58 (s,
 5 C-16).

Esimerkki 5: Yhdisteen A' uuttaminen ja puhdistaminen

X06/15/458:n biomassa kerättiin suodattamalla, uutettiin
 seuraavaksi asetonilla (25 ml) ja uute erotettiin biomas-
 10 sasta suodattamalla. Asetoni poistettiin kierto-haihdutta-
 malla ja jäljelle jäänyt vesiliete pakastekuivattiin kumik-
 si. Kumi liuotettiin metanoliin (250 ml), suodatettiin,
 haihdutettiin sitten (150 ml). Näyte kromatografoitiin
 käänteisfaasi-HPLC:llä käyttäen 47 x 100 mm C₁₈ (oktadekyy-
 15 lipiidioksidi) Delta-Pak -panosta 15 mikronin pakkauksel-
 la. 10 ml/min virtausnopeutta käytettiin gradientin ollessa
 80 % vettä - 20 % asetonitriiliä - 20 % vettä - 80 % aseto-
 nitriiliä 30 minuutin ajan. Yhdiste A havaittiin 278 nm:s-
 sä. Aktiivinen fraktio kromatografoitiin uudelleen käyttäen
 20 samaa pylvästä ja virtausnopeutta gradientin ollessa 60 %
 vettä - 40 % asetonitriiliä - 35 % vettä - 65 % asetonit-
 riiliä 40 minuutin ajan. Aktiivinen fraktio konsentroitiin
 asetonitriilin poistamiseksi ja sitten se pakastekuivattiin
 kiinteäksi (yhdiste A, erä 1).

25

Lisäpuhdistaminen suoritettiin normaalilla faasikromatogra-
 fialla käyttäen leimahduspylvästä (30 cm x 1,4 cm), joka
 täytettiin 16 cm:n syvyyteen piidioksidigeelillä (MERCK,
 230-400 meshiä, partikkeli 0,040-0,063 mm) ja eluoitiin
 30 isokraattisesti 40 %:lla heksaania - 60 %:lla etyyliase-
 taattia - 1 %:lla etikkahappoa. Haihtuva liuotin poistet-
 tiin lasketussa paineessa värittömän öljyn saamiseksi, jäl-
 jelle jääneen liuottimen poistaminen pakastekuivaamalla
 tuotti valkean kiteisen kiintoaineen (yhdiste A, erä 3).

35

Tuotetta varastoitiin pakastimessa kuusi viikkoa. Kiinto-
 aineen käänteisfaasikromatografia suoritettiin varastoinnin
 jälkeen Prep 3000:lla käyttäen 25 x 100 mm:n panostusta
 pakattuna C₁₈-Nova-Pak HR:llä (6 mikronia). 20 ml/min vir-

tausnopeutta käytettiin gradientin ollessa 70 % vettä - 30 % asetonitriiliä - 100 % asetonitriiliä 20 minuutin ajan. Yhdisteen A lisäksi erotettiin toinen polaarisempi yhdiste ja se identifioitiin yhdisteen A 7,8 epoksidiksi, yhdisteeksi A'.
 5 Vaihtoehtoinen menetelmä yhdisteen A erottamiseksi 7,8-epoksidistaan on Delta-Propin käyttäminen gradientin ollessa 60 % vettä - 40 % asetonitriiliä - 40 % vettä - 60 % asetonitriiliä 20 minuutin ajan.

10 Yhdisteen A' identifiointi suoritettiin vertaamalla UV-, MS- ja NMR-datatietoja yhdisteestä A saatuihin vastaaviin tietoihin (katso esimerkki 2).

Yhdisteen A' fysikaaliset piirteet ovat seuraavat:

15

Molekyylikaava: $C_{22}H_{30}O_5$ Molekyyllipaino: 374

Liukenevuus: MeOH (hyvä)

20

278 (metanoli

Massaspes.:	tekniikka	m/z	intensiteetti (%)
25	CI MH^+	375	100
	MNH_4^+	392	2
	EI M^+	374	
		219	20
30		153	40
		43	100

35

I.R. (KBr): ν in cm^{-1} : 3383 br, 2959 br, 1624, 1387.

1H -N.M.R.: δ/ppm in CD_3OD : 1.13(3H,s), 1.29(3H,s),

1.39(3H,s), 1.45(1H, m), 1.49(3H,dd), 1.53(2H,m),
 1.82(1H,dd), 2.00(1H,m), 2.10(2H,m), 2.55(1H,m),
 2.75(1H,m), 2.80(1H,m), 3.00(1H,m), 3.70(1H,dd),
 5 3.75(1H,dd) 3.80(1H,dd), 5.55(2H,d).

^{13}C -N.M.R.: δ /ppm in CD_3OD : 200.7(C_{16}), 165.9(C_{14}),
 143.4(C_4), 135.0(C_{15}), 122.6(C_3), 87.6(C_1), 82.6(C_{12}),
 10 70.7(C_{18}), 63.7(C_8), 62.3(C_7), 47.6(C_{11}), 44.9(C_2), 42.1(C_{13}),
 41.4(C_6), 36.6(C_5), 36.5(C_9), 31.2(C_2), 27.4(C_{10}), 24.7(C_{20}),
 23.1(C_{19}), 17.6(C_{22}), 48.6(C_{17}) -liuottimen hämärtämä.

15 Esimerkki 6: Yhdisteen E uuttaminen ja puhdistaminen

75 ml X06/15/548:n fermentointilientä sentrifugoitiin ja
 huovasto uutettiin etyyliasetaatilla (5 x 10l). Tämä uute
 konsentroitiin kuivaksi ja liuotettiin uudelleen puhtaaseen
 metanoliin. Puhdistaminen suoritettiin käänteisfaasiprepa-
 20 ratiivisella HPLC:llä käyttämällä Waters Delta-Pak PrepPak
 3000 -panosta (C_{18} , 100 Å, 15 μm ID 47 mm, pituus 30,0 cm)
 ja 40-%:isen asetonitriilin vesiliuoksen isokraattista
 liikkuvaa faasia (40 ml/min virtausnopeus) 50 minuuttia,
 mitä seurasi asetonitriilihuuhtelu 10 minuuttia. Yhdiste,
 25 joka eluoitui 44-48 minuutin välillä, oli kohdeyhdiste E.
 Aallonpituuden havainnointi asetettiin 200 nm:ssä. Tämä
 huippu puhdistettiin edelleen käänteisfaasipuolipreparatii-
 visella HPLC:llä käyttäen Waters Delta-Pak-pylvästä (C_{18} ,
 100 Å, 15 μm , ID 10,0 mm, pituus 25,0 cm) ja 55-%:isen ase-
 30 tonitriilin vesiliuoksen isokraattista liikkuvaa faasia (15
 ml/min virtausnopeus) 28 minuuttia, mitä seurasi asetonit-
 riilihuuhtelu 10 minuuttia. Yhdiste, joka eluoitui 23-28
 minuutin välillä, oli kohdeyhdiste E. Aallonpituuden ha-
 vainnointi asetettiin 200 nm:ssä.

35

Yhdisteellä E oli seuraavat fysikaaliset piirteet:

Molekyylikaava: $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_4$

Molekyyllipaino: 370

Liukenevuus: metanoli, etyyliasettaatti

UV:	$[\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}]$	(ϵ)	liuotin]
5	213.4	24400	MeOH
	230.0 _{SH}	7500	
	277.3	9200	
10	215.6	6900	MeOH-KOH
	228.2 _{SH}	5400	
	286.1	5200	

15

Massaspes.: [m/z (intensiiteetti (%))]:

EI: 370 (M^+ , 2%), 167 (80), 166 (100)

DCI (NH_3): 371 (MH^+ , 30%), 205 (100), 167 (100), 149 (40),

20 135 (25), 123 (40), 121 (30), 109 (40)

IR (KBr): [ν in cm^{-1}]:

3333.4, 2932.2, 2862.7, 1720.7, 1622.3, 1496.9, 1381.2,

25 1329.1, 1286.7, 1167.1

^1H -NMR: [400 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6/\text{CD}_3\text{OD}$ (verrattu CD_3OD :hen 3,40 ppm:ssä) δ (m, J, posn)]:

30 0.86* (3H, s, 3H-22), 1.07* (3H, s, 3H-21), 1.26 (3H, s, 3H-20), 1.36 (1H, dd, 13.6, 11.3, H-10a), 1.62 (3H, bs, 3H-23), 1.68 (1H, m, H-10b), 1.75 (1H, m, H-6a), 2.09 (1H, dd, 9.8, 8.6, H-11), 2.21 (1H, t, 12.3, H-6b), 2.27 (1H, dd, 12.7, 7.1, H-9a), 2.34 (1H, dd, 14.5, 10.3, H-2a), 2.70 (1H, bt, 11.7, H-9b), 2.84 (1H, dt, 14.5, 2.1, H-2b), 4.81 (1H, dd, 11.4, 1.2, H-19a), 4.88 (1H, bddd, 10.2, 2.3, 1.5,

35

H-12), 5.02 (1H, ddd, 11.3, 2.5, 0.9, H-19b), 5.19 (1H, dd, 15.9, 1.7, H-4), 5.24 (1H, bddd, 11.9, 4.5, 1.2, H-7), 5.33 (1H, ddd, 15.9, 10.3, 2.4, H-3), 6.64 (1H, bs, H-17).

^{13}C -NMR: [100 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6/\text{CD}_3\text{OD}$ (verrattu CD_3OD :hen 49,00 ppm:ssä), δ (m, posn)]:

17.8 (q, C-23), 22.20 (q, C-20), 24.11^{*} (q, C-22), 29.56 (t, C-10), 30.32^{*} (q, C-21), 38.33 (s, C-5), 38.55 (t, C-9), 42.12 (t, C-6), 43.72 (d, C-11), 43.89 (t, C-2), 73.50 (t, C-19), 83.12 (d, C-12), 86.05 (s, C-1), 101.43 (d, C-17), 119.23 (s, C-13), 121.10 (d, C-3), 123.84 (d, C-7), 131.08^{**} (s, C-15), 131.08^{**} (s, C-18), 136.89 (s, C-8), 140.31 (s, C-14), 143.02 (d, C-4), 147.54 (s, C-16).

*, **: merkinnät voivat vaihdella keskenään

Esimerkki 7: Yhdisteen F valmistaminen ja identifioiminen
Esimerkissä 6 kuvatun yhdisteen liuosta metanolissa alistetaan ilmahapetukseen, jota kiihdytetään lisäämällä ylimäärä NaIO_4 :a.

Yhdisteen puhdistaminen suoritetaan käänteisfaasipreparatiivisella HPLC:llä käyttäen Waters Delta-Pak-pylvästä (C18, 100 Å, 15 µm, ID 10,0 mm, pituus 25,0 cm) porrastetun gradienttiliuottimen ollessa 25-%:inen asetonitriilin vesiliuos (12 ml/min virtausnopeus) 5 minuuttia, joka nostetaan 85-%:iseksi asetonitriilin vesiliuokseksi (12 ml/min) 35 minuutin ajan. Yhdiste, joka eluoitui 30-32 minuutin välillä, oli kohdeyhdiste F. Aallonpituuden havainnointi asetettiin 200 nm:ssä.

Yhdisteellä F oli seuraavat fysikaaliset piirteet:

Molekyylikaava: $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_4$

Molekyylipaino: 368

Liukenevuus: metanoli

UV:	$[\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}]$	(ϵ) liuotin]
	204	CH ₃ CN:H ₂ O-hplc-liuotin
5	300	
	482	

¹H-NMR: [400 MHz, CD₃/OD (verrattu CD₃OD:hen 3,40 ppm),
 10 δ (m, J)]:
 6.03 (1H, bs), 5.24 (1H, dd, J=1.8, 15.9), 5.07 (1H, bdd,
 J=3.4, 10.9), 5.00 (1H, ddd, J=2.5, 10.6, 15.9), 4.79 (1H,
 15 dd, J=1.2, 15.6), 4.65 (1H, dd, J=2.2, 15.5), 4.55 (1H, d,
 9.7), 2.63 (1H, dt, J=2.1, 14.8), 2.44 (1H, dd, J=10.5,
 14.7), 2.27 (2H, m), 2.11 (1H, dd, J=7.2, 12.9), 1.88 (1H,
 d, J=9.0), 1.77 (1H, m), 1.65 (3H, s), 1.50 (1H, bt,
 20 J=11.0), 1.27 (3H, s), 1.07 (3H, s), 1.04 (3H, s).

¹³C-NMR: [100 MHz, CD₃OD (verrattu CD₃OD:hen 49,00
 ppm:ssä), delta (m)]:
 25 124.25 (d), 120.6 (d), 114.37 (d), 88.75 (s), 81.63 (d),
 71.91 (t), 43.40 (t), 42.68 (t), 42.58 (t), 39.19 (s),
 38.96 (t), 30.52 (q), 30.22 (t), 24.50 (q), 21.90 (q),
 30 17.21 (q).

Esimerkki 8: Esillä olevien yhdisteiden testaaminen bentso-
 diatsepiinireseptoriin sitoutumistestissä

35 Reseptoriuute oli raaka synaptosomaalinen valmiste, joka
 oli eristetty härän aivokuoresta Lang et al:n menetelmällä
 (FEBS Lett., 104 149-152, 1979). Reseptoriin sitoutuminen
 määritettiin käyttämällä O'Beirne ja Williamsin kuvaamaa
 modifikaatiota (Eur.J.Biochem, 175, 413-421, 1988) Brae-

strupin ja Squiresin menetelmästä (PNAS 74 3805-3809, 1977). Reseptorivalmistetta inkuboitiin 50 mM:ssa Tris/Cl, pH 7,4, yhdisteen A ja [³H]-flunitratsepaamin (agonisti) kanssa lopullisessa konsentraatiossa 1 nM. Sitoutunut radioligandi kerättiin lasikuitusuodattimille ja mitattiin nestetuikelaskennalla. Mitään spesifistä sitoutumista ei määritetty korvaamalla ligandi Diazepamilla (1 µl).

Sitoutumistiedot kiinnitettiin yhteen tai kahteen paikka-
10 malliin painotetulla ei-lineaarisella regressioanalyysillä käyttäen tietokoneohjelmaa LIGAND (Munson and Rodbart: Analytic Biochem 107 220-239, 1980) ja EBD (McPherson-Computer Prog. in Biomed. 17 107-114, 1983).

15 Edellä kuvattu menetelmä toistettiin käyttämällä esimerkeissä 3 ja 4 vastaavasti kuvattuja yhdisteitä B ja C sekä käyttämällä myös yhdistettä D, joka on yhdisteen A natriumsuola.

20 IC-arvot määritettiin myös vastaavasti esimerkeissä 5-7 kuvatuista yhdisteistä A', E ja F.

Saadut tulokset olivat seuraavat:

Taulukko 1: Bentsodiatsepiinin bentsodiatsepiinireseptoriin sitoutumisen inhibointi esillä olevilla yhdisteillä

<u>Yhdiste</u>	<u>Konsentraatio</u>	<u>Inhibointi, %</u>	<u>IC₅₀</u>
A	93 μ M	107	40nM
	28	106	
	9	99	
	3	93	
	930nM	92	
	280	80	
	93	65	
	28	44	
	9	35	
	3	11	
B	177 μ M	78	5 μ M
	53	92	
	18	82	
	5	69	
	2	53	
	530nM	42	
	177	36	
	53	21	
	18	21	
C	242 μ M	88	20 μ M
	80	77	
	24	54	
	8	35	
	2	12	
	800nM	9	
	240	-3	
	80	9	
D	100 μ M	92	10nM
	50	103	
	10	100	
	5	98	
	1	86	
	500nM	81	
	100	65	
	50	70	
	10	45	
	5	45	

A'	2.8×10^{-5} M	104	85nM
	9.3×10^{-6}	103	
	2.8×10^{-6}	85	
	9.3×10^{-7}	83	
	2.8×10^{-7}	79	
	9.3×10^{-8}	51	
	2.8×10^{-8}	32	
	9.3×10^{-9}	19	
	2.8×10^{-9}	8	
E	9.5×10^{-5} M	104	500nM
	4.8×10^{-5}	101	
	9.5×10^{-6}	93	
	4.8×10^{-6}	88	
	9.5×10^{-7}	65	
	4.8×10^{-7}	52	
	9.5×10^{-8}	42	
	4.8×10^{-8}	37	
	9.5×10^{-9}	27	
F	2.7×10^{-4} M	94	3.0 μ M
	9.0×10^{-5}	89	
	2.7×10^{-5}	77	
	9.0×10^{-6}	65	
	2.7×10^{-6}	48	
	9.0×10^{-7}	41	
	2.7×10^{-7}	33	
	9.0×10^{-8}	27	
	2.7×10^{-8}	24	
	9.0×10^{-9}	15	

Esimerkki 9: Farmaseuttinen koostumus

Seuraavalla tavalla voidaan valmistaa tabletteja, jotka painavat kukin 0,15 g ja sisältävät 25 mg jotakin esillä olevaa yhdistettä:

5

10000:een tablettiin tarkoitettu koostumus

esillä oleva yhdiste (250 g)

laktoosi (800 g)

maissitärkkelys (415 g)

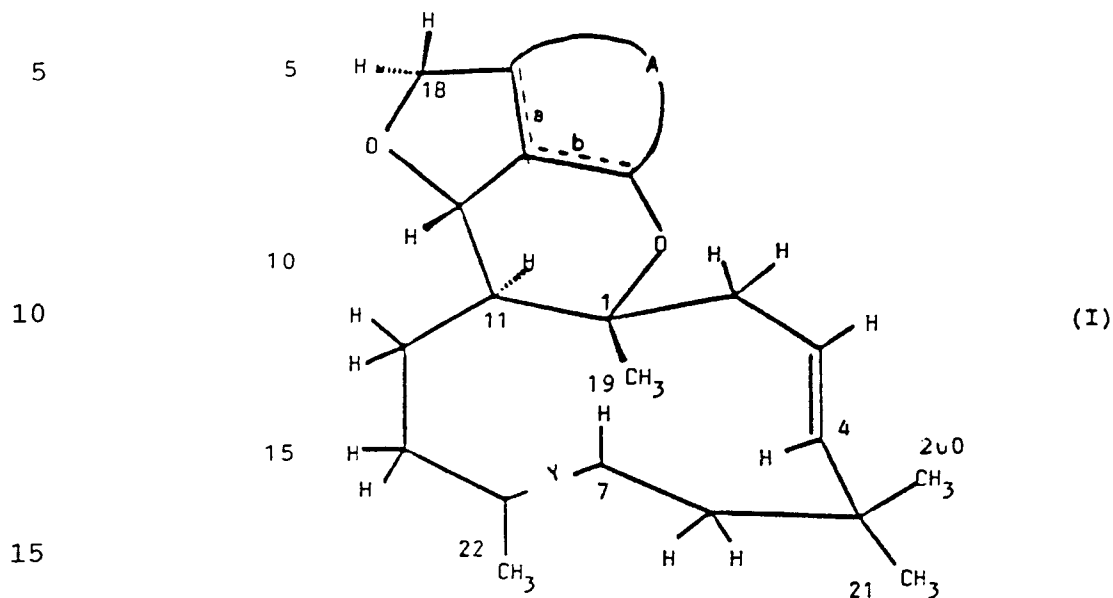
10 talkkijauhe (30 g)

magnesiumstearaatti (5 g)

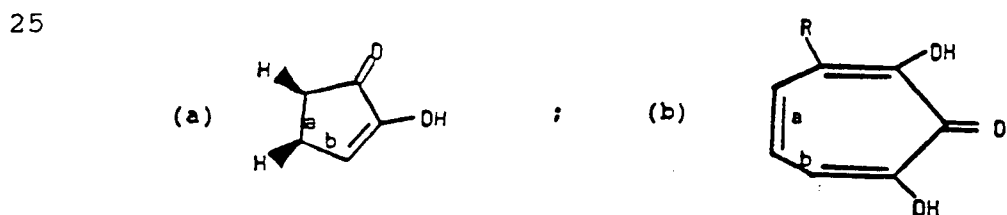
Esillä oleva yhdiste, laktoosi ja puolet maissitärkkelyksestä sekoitetaan. Sitten seos pakotetaan 0,5 mm meshin seulan läpi. Maissitärkkelystä (10 g) suspendoidaan lämpimään veteen (90 ml). Saatu tahna granuloidaan jauheeksi. Granulaatti kuivataan ja jauhetaan hienoksi 1,4 mm meshin seulalla. Jäljelle jäänyt määrä tärkkelystä, talkki ja magnesiumstearaatti lisätään, sekoitetaan varovasti ja työestetään tableteiksi.

Patenttivaatimukset

Seskviterpeenin, jolla on kaava I:

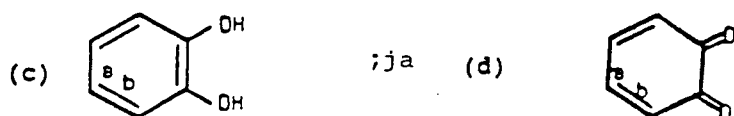


jossa sekä a että b on yksöissidos tai toinen on
 20 yksöissidos ja toinen on kaksoissidos,
 A muodostaa yhdessä a :n että b :n ja hiiliato-
 mien, joihin se on kiinnittynyt, kanssa renkaan, joka on
 valittu seuraavista:



30

jossa R on H tai OH

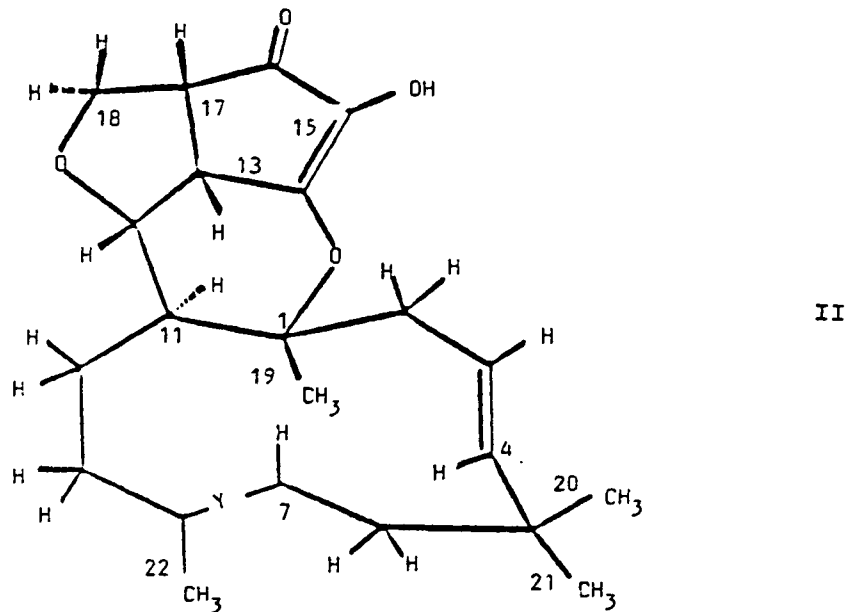


35

ja Y on kaksoissidos tai, kun A on edellä määritetty rengas
 (a), Y on joko kaksoissidos tai muodostaa yhdessä hiiliatomien,
 joihin se on kiinnittynyt, kanssa epoksidikytköksen,

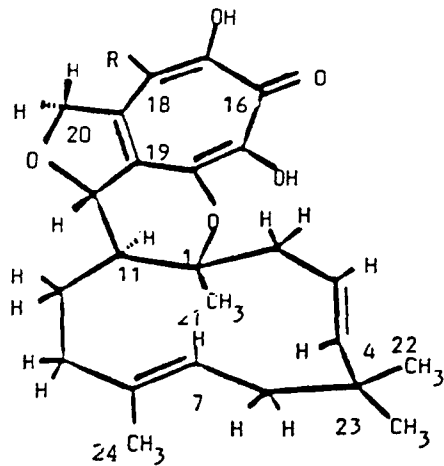
∇_o , tai sen farmaseuttisesti tai eläinlääketieteellisesti hyväksyttävän suolan valmistusmenetelmä, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää (i) X06/15/458:ksi (IMI 354451) nimetyn sienikannan tai sen mutantin, joka tuottaa kaavan (I) mukaista seskviterpeeniä, fermentoimisen hiilen, typen ja ei-orgaanisten suolojen lähteessä, (ii) mainitun seskviterpeenin eristämisen fermentointiväliaineesta, (iii) kaavan I mukaisen seskviterpeenin, jossa A on rengas (c), hapettamisen haluttaessa kaavan I mukaiseksi seskviterpeeniksi, jossa A on rengas (d) ja ja/tai (iv) mainitun seskviterpeenin muuttamisen haluttaessa farmaseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksyttäväksi suolakseen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistettavalla seskviterpeenillä on kaava II:



jossa -Y- on kaksoissidos tai muodostaa yhdessä hiiliatomien, joihin se on kiinnittynyt, kanssa epoksidikytköksen ∇_o , tai sen farmaseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksyttävä suola.

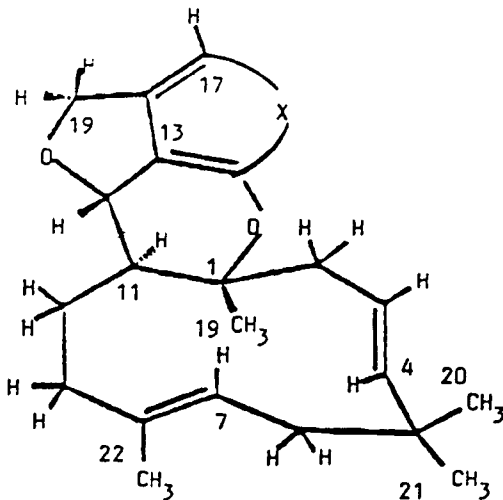
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistettavalla seskviterpeenillä on kaava III:



III

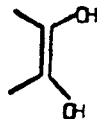
jossa R on H tai OH, tai sen farmaseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksyttävä suola.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistettavalla seskviterpeenillä on kaava IV:

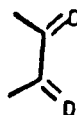


IV

jossa X on



tai



tai farmaseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksyttävä suola.

5 5. Farmaseuttisen tai eläinlääkinnällisen koostumuksen valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää farmaseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksyttävän kantoaineen tai laimentimen formuloimisen aktiivisena aineena toimivan patenttivaatimuksen 1 mukaisen yhdisteen kanssa.

10 6. Menetelmä X06/15/458:ksi (IMI354451) nimetyn Acremonium
strictum -sienikannan tai sen mutantin, joka tuottaa patent-
tivaatimuksessa 1 määritettyä kaavan I mukaista seskviter-
peeniä, fermentoimiseksi, t u n n e t t u siitä, että se
15 käsittää mainitun X06/15/458:ksi nimetyn kannan tai sen
mutantin fermentoimisen hiilen, typen ja ei-orgaanisten suo-
lojen lähteessä.