

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 921595 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 921595

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07D498/18
C07D221:00
C07D311:00
C07D273:00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 10.04.1992

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 10.04.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 18.10.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

17.04.1991 US 686728 18.02.1992 US 837048

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •American Home Products Corporation, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Kao, Wenling, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Vogel, Robert Lewis, Camden, NJ, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Musser, John Henry, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Rapamysiinikarbamaatteja

Rapamycinkarbamater

Rapamysiinikarbamaatteja

Tämä keksintö koskee rapamysiinikarbamaatteja ja menetelmää niiden käyttämiseksi siirrehyljinnän, isäntä/siirresairauden, autoimmuunisairauksien, tulehdussairauksien, kiinteiden kasvainten ja sienitartuntojen hoidossa.

Rapamysiini on makrosyklinen trieenivasta-aine, jota tuottaa Streptomyces hygroscopicus ja jolla on todettu olevan sienivastaista aktiivisuutta, erityisesti Candida albicansia vastaan sekä in vitro että in vivo (C. Vezina et al., J.Antibiot. 28 (1975) 721; S.N. Sehgal et al., J.Antibiot. 28 (1975) 727; H.A. Baker et al., J.Antibiot. 31 (1978) 539; US-patenttijulkaisu 3 929 992; ja US-patenttijulkaisu nro 3 993 749).

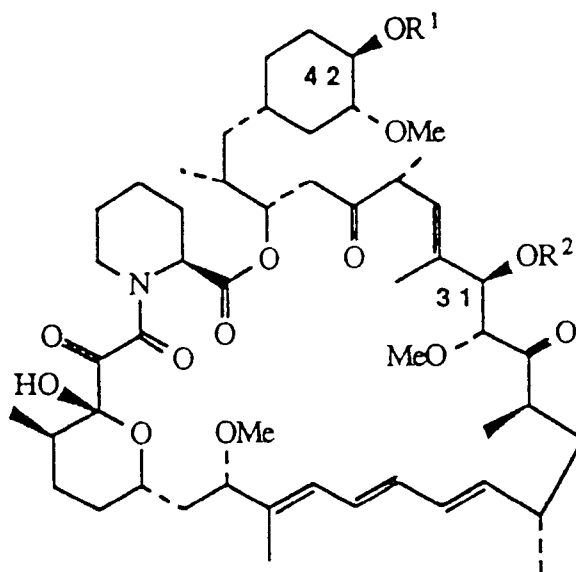
Rapamysiinillä yksinään (US-patenttijulkaisu nro 4 885 171) tai yhdistettynä pisibaniiliin (US-patenttijulkaisu nro 4 401 653) on osoitettu olevan kasvainvastaista aktiivisuutta. R. Martel et al. (Can.J.Physiol. Pharmacol. 55 (1977) 48) julkistivat, että rapamysiini on tehokas kokeellisessa allergisen aivojen tai selkäytimen tulehduksen mallissa, mallissa multippeliskleroosille; tehosteniveltulehdusmallissa, nivelreumamallissa; ja inhiboi tehokkaasti IgE-kaltaisten vasta-aineiden muodostumista.

Rapamysiinin immunosuppressiiviset vaikutukset on julkistettu julkaisussa FASEB 3 (1989) 3411. Syklosporini-A:n ja FK-506:n, muita makrosyklisiä molekyylejä, on samoin osoitettu olevan tehokkaita immunosuppressiivisina aineina ja siksi käyttökelpoisia siirrehyljinnän estämiseksi (FASEB 3 (1989) 3411; FASEB 3 (1989) 5256; ja R.Y. Calne et al., Lancet 1978 1183).

Rapamysiinin mono- ja diasyloitujen johdannaisten (esteröity asemassa 28 ja 43) on osoitettu olevan käyttökelpoisia sienivastaisina aineina (US-patenttijulkaisu 4 316 885) ja niitä on käytetty vesiliukoisten esilääkkeiden valmistamiseksi rapamysiinistä (US-patenttijulkaisu

4 650 803). Vastikään rapamysiinin numerointikäytäntöä on muutettu; tämän vuoksi Chemical Abstracts -nimikkeistön mukaan edellä kuvatut esterit olisivat asemissa 31 ja 42.

Tämä keksintö antaa käyttöön rapamysiinijohdannaisia, jotka ovat käyttökelpoisia immunosuppressiivisina, tulehdusvastaisina, sienivastaisina ja kasvainvastaisina aineina ja joiden rakenne on:



jossa R^1 ja R^2 ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety, $-\text{CONH}(\text{CR}^3\text{R}^4)_n-\text{X}$ tai $-\text{CONHSO}_2-\text{Ar}$;

R^3 ja R^4 ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety, 1 - 6 hiiliatomin alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, halogeeni tai trifluorimetyyli;

X on vety, 1 - 6 hiiliatomin alempi alkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, trifluorimetyyli, nitro, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, 2 - 7 hiiliatomin karboalkoksi, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, halogeeni, 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino, 1 - 6 hiiliatomin tioalkyyli tai Y;

Y on fenyyliiryhmä, joka voi mahdollisesti olla mono-, di- tai trisubstituoitu ryhmällä, joka on 1 - 6 hiiliatomin alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 1 - 6

hiiliatomin alkoksi, syaani, halogeeni, nitro, 2 - 7 hiiliatomin karbalkoksi, trifluorimetyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino tai 1 - 6 hiiliatomin alkyylitio;

5 Ar on fenyyli, naftyyli, pyridyyli, kinolyyli, iso-kinolyyli, kinoksalyyli, tienyyli, tionaftyyli, furyyli, bentsofuryyli, bentsodioksyyli, bentsoksatsolyyli, bentsoisoksatsolyyli tai bentsodioksolyyli; jolloin Ar-ryhmä voi mahdollisesti olla mono-, di- tai trisubstituoitu ryhmällä, joka on 1 - 6 hiiliatomim alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, syaani, halogeeni, nitro, 2 - 7 hiiliatomin karbalkoksi, trifluorimetyyli, amino, 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino, 1 - 6 hiiliatomin alkyylitio, $-SO_3H$, $-PO_3H$ tai $-CO_2H$; ja

$$n = 0 - 5;$$

edellyttäen, että R^1 ja R^2 eivät ole molemmat vetyjä ja että kun $n = 0$, X on 1 - 6 hiiliatomin alempi alkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli tai Y;

20 mukaan lukien niiden farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, kun X on 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino, kun Ar-ryhmä sisältää emäksisen typen tai kun Ar-ryhmä on substituoitu 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliaminolla, $-SO_3H$:lla, $-PO_3H$:lla tai $-CO_2H$:lla.

30 Farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja ovat suolat, jotka on saatu sellaisista epäorgaanisista kationeista, kuten natrium, kalium tai vastaavat; orgaanisista emäksistä kuten: 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden mono-, di- ja trialkyyliamiinit ja 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden mono-, di- ja trihydroksialkyyliamiinit ja vastaavat; ja orgaanisista ja epäorgaanisista hapoista, kuten: etikka-, maito-, sitruuna-, viini-, meripihka-, maleiini-, maloni-, glukoni-, kloorivety-, bromivety-, fos-

fori-, typpi-, rikki-, metaanisulfonihappo ja vastaavat tunnetut hyväksyttävät hapot, saadut suolat.

Näistä yhdisteistä edullisia jäseniä ovat ne, joissa R^2 on vety; ne, joissa R^1 on vety; ne, joissa n on 0 ja X on Y ; ne, joissa R^2 on vety, n on 0 ja X on Y ; ne, joissa n on 0, X on Y ja Y on fenyyli, 4-fluorifenyyli, 2,4-difluorifenyyli, 4-nitrofenyyli tai 4-metyylifenyyli; ja ne, joissa Ar on mahdollisesti mono-, di- tai trisubstituoitu fenyyli. Kun Ar on substituoitu 7 - 10 hiiliatomin aryylialkyyllillä, edullisesti aryylialkyyli-ryhmän aryyliosana on fenyyli-ryhmä.

Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet, jotka on karbamyloitu asemassa 42 tai sekä asemassa 31 että 42, voidaan valmistaa saattamalla rapamysiini reagoimaan isosyanaatin kanssa, jonka yleisrakenne on:



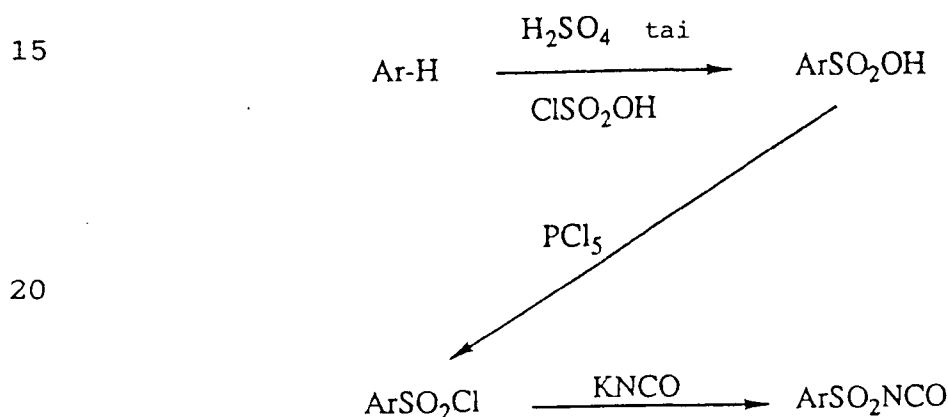
jossa Q on $-(CR^3R^4)_n-X$ tai $-SO_2-Ar$, neutraaleissa olosuhteissa tai emäksen kuten pyridiinin läsnä ollessa.

Tämän keksinnön mukaiset 31-karbamyloidut yhdisteet voidaan valmistaa suojaamalla rapamysiinin 42-alkoholi suojarahmällä, kuten tert-butyylidimetyylisilyyli-ryhmällä, minkä jälkeen 31-asema karbamyloidaan isosyanaatilla, jonka rakenne on edellä esitetyn mukainen. Poistamalla suojarahmä saadaan 31-karbamyloituja yhdisteitä. Kun kyseessä on tert-butyylidimetyylisilyylisuojarahmä, suojarahmä voidaan poistaa lievästi happamissa olosuhteissa.

Kun asema 31 on karbamyloitu ja asemasta 42 suojarahmä poistettu, 42-asema voidaan saattaa reagoimaan muun isosyanaatin kuin 31-alkoholin kanssa reagoimaan saatetun kanssa yhdisteiden saamiseksi, joissa on eri karbamaatit asemissa 31 ja 42. Vaihtoehtoisesti 42-karbamyloidut yhdisteet, jotka on valmistettu, kuten edellä kuvattiin, voidaan saattaa reagoimaan toisen isosyanaatin kanssa yh-

disteiden saamiseksi, joissa on erilaiset karbamaatit 31- ja 42-asemissa.

Keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi käytettyjä isosyanaatteja on kaupallisesti saatavana tai ne voidaan valmistaa kirjallisuudessa julkistetuilla menetelmillä. March (Advanced Organic Chemistry 3 (1985) 391, 452, 479) kuvaa yleismenetelmää aryylisulfonyyli-isosyanaattien valmistamiseksi, jota voidaan käyttää silloin, kun aryylisulfonyyli-isosyanaattia ei ole kaupallisesti saatavana. Seuraava kaavio havainnollistaa yhtä aryyli-ryhmästä liikkeelle lähtevää menetelmää. Muita menetelmiä aryylisulfonyyli-isosyanaattien valmistamiseksi tunnetaan kirjallisuudessa.



Immunosuppressiivista aktiivisuutta arvioitiin in vitro tavanomaisella farmakologisella testimenettelyllä imusolujen lisääntymisen (LAF) mittaamiseksi ja kahdella tavanomaisella farmakologisella testimenettelyllä in vivo. Ensimmäinen in vivo -menettely oli polvitaiveimusolmuke (PLN) -testimenettely, jolla mitattiin tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden vaikutusta sekaimusolureaktioon, ja toisessa in vivo -menettelyssä arvioitiin puserrusihosiirteen eloonjääntiaikaa.

Komitogeeni-indusoidun kateenkorvaimusolun lisääntymisen menettelyä (LAF) käytettiin edustavien yhdisteiden immunosuppressiivisten vaikutusten mittaamiseksi in vitro.

Suppeasti, soluja normaaliin BALB/c-hiirten kateenkorvasta viljellään 72 tunnin ajan PHA:lla ja IL-1:llä ja niitä sykäytetään tritioidulla tymidiinillä viimeisten 6 tunnin aikana. Soluja viljellään ilman ja eri pitoisuuksilla rapamysiiniä, syklosporiini-A:ta tai testiyhdistettä. Solut otetaan talteen ja siirtynyt radioaktiivisuus määritetään. Imusolulisaantumisen inhibitio määritetään prosentuaalisena muutoksena tuikkeissa minuuttia kohden lääkkeellä ei-käsiteltyihin verrokkeihin nähden. Tulokset ilmaistaan seuraavana suhteena tai IC_{50} -arvona.

$$\frac{{}^3\text{H-verrokkikateenkorvasolut} - {}^3\text{H-rapamysiinillä käsitellyt kateenkorvasolut}}{{}^3\text{H-verrokkikateenkorvasolut} - {}^3\text{H-testiyhdisteellä käsitellyt solut}}$$

15

Sekaimusolureaktio (MLR) tapahtuu, kun imusolmuke-soluja geneettisesti erilaisista eläimistä yhdistetään kudosisviljelmässä. Kumpikin stimuloi toista emosolutransformaatioon, jonka seurauksena DNA-synteesi lisääntyy, mikä voidaan kvantifioida tritioidun tymidiinin siirtymisestä. Koska MLR:n stimulointi on pääasiallisten kudosisyhteensopivuusantigeenien erilaisuuden funktio, polvitaiveimusolmuke (PLN) -testimenettely in vivo korreloi hyvin isäntä/siirresairauteen. Suppeasti, säteilytettyjä pernasoluja BALB/c-luovuttajista ruiskutetaan vastaanottavien C3H-hiirten oikean takakäpälän jalkatyynyyn. Lääke annetaan päivittäin p.o. päivästä 0 päivään 4. Päivänä 3 ja päivänä 4 tritioitua tymidiiniä annetaan i.p., b.i.d. Päivänä 5 takaraajojen polvitaiveimusolmukkeet poistetaan ja liuotetaan ja radioaktiivisuus lasketaan. Vastaava vasen PLN toimii verrokkina ruiskeen vastaanottaneen takaraajan PLN:lle. Prosentuaalinen suppressio lasketaan käyttäen lääkkeellä ei-käsiteltyjä eläimiä saman lajin verrokkina. Rapamysiinillä annoksena 6 mg/kg p.o. saatiin 86 %:n suppressio, kun taas syklosporiini-A:lla samana annoksena saa-

tiin 43 %:n suppressio. Tulokset ilmaistaan seuraavana suhteena:

$$\frac{{}^3\text{H-PLN-solut verrokki-C3H-hiirestä} - {}^3\text{H-PLN-solut rapamysiinillä käsitellystä C3H-hiirestä}}{{}^3\text{H-PLN-solut verrokki-C3H-hiirestä} - {}^3\text{H-PLN-solut testiyhdisteellä käsitellystä C3H-hiirestä}}$$

Toisella in vivo -testimenettelyllä on tarkoitus määrittää urospuolisista DBA/2-luovuttajista urospuolisiin BALB/c-vastaanottajiin siirretyn puserrusihosiirteen eloonjääntiaika. Menetelmä on sovellutus Billinghamin, R.E., ja Medawarin, P.B., J.Exp.Biol. 28 (1951) 385 - 402, menetelmästä. Suppeasti, puserrusihosiirre luovuttajasta siirretään vastaanottajan selkään samasta lajista peräisin olevana kudossiirteenä ja yksilön omasta elimistöstä saatua kudossiirrettä samalla alueella käytetään verrokkina. Vastaanottajia käsitellään joko vaihtelevilla pitoisuuksilla syklosporiini-A:ta testiverrokkina tai testiyhdisteellä vatsaontelon sisäisesti. Ei-käsiteltyt vastaanottajat toimivat hylkimisverrokkina. Siirrettä tarkkaillaan päivittäin ja havaintoja rekisteröidään, kunnes siirre kuivaa ja muodostaa mustuneen ruven. Tämä ajankohta katsotaan hylkimispäiväksi. Keskimääräistä siirteen eloonjääntiaikaa (päivien lukumäärä $\pm$ standardipoikkeama, S.D.) lääkkeellä käsitellyssä ryhmässä verrataan verrokkiryhmään.

Seuraavaan taulukkoon on koottu yhteenvedoksi tulokset tämän keksinnön mukaisilla edustavilla yhdisteillä näissä kolmessa tavanomaisessa testimenettelyssä.

Taulukko 1

		LAF	PLN	Ihosiirre
	Yhdiste	IC ₅₀ (nM)	(suhde)	(päiviä ± S.D.)
5	Esimerkki 1	8,6	0,71	8,5 ± 1,6
	Esimerkki 2	3,9	0,47	8,5 ± 1,2
	Esimerkki 3	> 1 000	+	+
	Esimerkki 4	57,9	0,90	+
	Esimerkki 5	3 % ^{**}	+	+
10	Esimerkki 6	10,4	0,25	8,3 ± 1,0
	Esimerkki 7	+	+	+
	Esimerkki 8	7,4	+	8,8 ± 1,3
	Esimerkki 9	8,7	0,72	8,0 ± 1,7
	Esimerkki 10	> 1 000	+	+
15	Esimerkki 11	> 1 000	+	+
	Esimerkki 12	> 1 000	+	+
	Esimerkki 14	> 1 000	+	+
	Esimerkki 15	> 1 000	+	+
	Esimerkki 16	0,91 (suhde)	0,84 (<u>p.o.</u>) 1,03 (<u>i.p.</u>)	11,2 ± 0,4
20	Esimerkki 18	0,74 (suhde)	0,47	+
	Esimerkki 19	0,10 (suhde)	+	+
	Rapamysiini	3,2 - 9,4	1,00	12,0 ± 1,7

* Ei määritetty

** Prosentuaalinen inhibitio pitoisuudella 100 nM

25

30

Näiden tavanomaisten farmakologisten testimenet-
 lyjen tulokset osoittavat tämän keksinnön mukaisten yh-
 disteiden immunosuppressiivisen aktiivisuuden sekä in vit-
ro että in vivo. Positiiviset suhteet LAF- ja PLN-testime-
 nettelyissä osoittavat T-solulisääntymisen suppression.
 Koska siirretty puserrusihoosiirteet tulevat tyypillisesti
 hyljityiksi 6 - 7 päivän kuluessa ellei immunosuppressii-
 vista ainetta käytetä, ihosiirteiden pidentynyt eloonjäänti-

aika tämän keksinnön mukaisilla yhdisteillä käsiteltynä osoittaa edelleen yhdisteiden käyttökelpoisuuden immuno-suppressiivisina aineina.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden kyky estää hylkimistä tai hoitaa siirrettä osoitettiin tavanomaisessa farmakologisessa testimenettelyssä, jossa käytetään heterotrooppista toisesta saman lajin yksilöstä saatua sydän-siirrettä ja joka jäljittelee ihmisissä tapahtuvaa siirrehyljintää. Seuraavassa kuvataan suppeasti käytettyä menettelyä. Urospuoliset vastasyntyneet (ikä alle 5 päivää) BN-rottaluovuttajat uhrattiin inhimillisellä tavalla ja kaateenkorva leikattiin irti sydäimestä. Kaikki yhteydet rintaonteloon katkaistiin ja sydän poistettiin rintakehästä ja sijoitettiin jäähdytettyyn RPMI-kasvualustaan, jossa kaikki kiinni olevat rasva ja sidekudoskalvot poistettiin. Sydän leikattiin kahtia keskiviivaa pitkin kärjestä aortan juureen, jolloin saatiin kaksi suunnilleen samanlaista puolikasta, joista kumpikin sisälsi eteis- ja kammiokudosta. Urospuoliset vastaanottaja-Lewis-rotat nukutettiin fenobarbitolilla (50 mg/ml; i.p.), vasen sisäkorva pyyhittiin povidiiinjodiin kastetulla tupolla ja 1 ml RPMI:tä ruiskutettiin ihonalaisesti rustolevyn yläpuolelle, jolloin saatiin nesteellä täytetty pussi. Pussiin tehtiin pistoviilto, johon insertoitiin yksi yksittäinen puolikas-sydänpalanen. Tasku suljettiin yhdellä tipalla Vet-Seal-tuotetta (3M Animal Care Products). Vastaanottajat jaettiin käsittelyryhmiin, joissa oli 10 rottaa kussakin, ja arvioitavia yhdisteitä annettiin annostuksena 225 µg/päivä siirto-operaation jälkeen, kunnes tapahtui siirteen toiminnan pettäminen. Lääkkeenanto tapahtui i.p. joko käsin ruiskuttamalla tai käyttäen Azlet-osmoosipumppua, joka kiinnitettiin vastaanottavan rotan vatsakalvoon. Siirteitä tarkkailtiin sydämfunktioaktiivisuuden menetyksen suhteen

päivänä 7 siirron jälkeen ja sen jälkeen joka 2. päivä. Siirteen eloonjääntiajaksi määritellään aika siihen siirron jälkeiseen päivään, jona sydänsiirre on menettänyt kaiken supistusaktiivisuuden visuaalisesti ja/tai sydänmonitoria käyttäen tarkasteltuna. Yksittäisistä hyljintä-
 5 ajoista laskettiin keskiarvo keskimääräisen eloonjääntiajan saamiseksi kullekin käsitellylle ryhmälle. Seuraavassa taulukossa on esitetty tulokset, jotka saatiin tämän keksinnön mukaiselle edustavalle yhdisteelle. Verrokkiryhmä edustaa rottia, jotka saivat saman lajin toisesta yksilöstä peräisin olevan siirteen mutta eivät testiyhdistetä. Rapamysiini arvioitiin vertailun vuoksi.

Taulukko 2

15	Käsittelyryhmä	Keskimääräinen eloonjääntiaika (päiviä)
	Verrokki	11,5
	Esimerkki 16	34,4
	Rapamysiini	38

20

Kuten esitetään taulukossa 2, käsittely tämän keksinnön mukaisella edustavalla yhdisteellä pidensi merkitsevästi ($p < 0,05$) siirretyn toisesta saman lajin yksilöstä peräisin olevan siirteen eloonjääntiaikaa. Ei-käsitelty toisesta saman lajin yksilöstä peräisin oleva siirre tuli hyljityksi 11,5 päivässä, kun taas käsittely tämän keksinnön mukaisella edustavalla yhdisteellä esti hylkimisen päivään 34,4. Sellaisenaan tämän tavanomaisen farmakologisen testimenettelyn tulokset osoittavat, että tämän
 25 keksinnön mukaiset yhdisteet ovat käyttökelpoisia siirrehyljinnän estämiseksi tai hoitamiseksi.

30

Koska tämän keksinnön mukaiset yhdisteet ovat rakenteellisesti samankaltaisia kuin rapamysiini ja niillä

on rapamysiiniin nähden samanlainen aktiivisuusprofiili, tämän keksinnön mukaisilla yhdisteillä katsotaan niin ikään olevan kasvainvastaisia ja sienivastaisia aktiivisuuksia.

5 Näiden tavanomaisten farmakologisten testimenet-
lyjen tulosten nojalla nämä yhdisteet ovat käyttökelpoisia
siirteiden, kuten sydän-, munuais-, maksa-, luuydin- ja
ihosiirteiden, hyljinnän hoitamiseksi; autoimmuunisairauk-
sissa, kuten lupus, nivelreuma, sokeritauti, vakava lihas-
10 heikkous ja multippeliskleroosi; sekä tulehdussairauksis-
sa, kuten ihon hilsetystauti, ihotulehdus, ihottuma, tali-
rauhanen lisääntynyt erityys, tulehduksellinen suolisairaus
ja silmän keskikalvon tulehdus; kiinteiden kasvainten hoi-
dossa; ja sienitartunnoissa.

15 Koska esimerkin 18 yhdiste valmistettiin sen 42-
silyloidun välituotteen (esimerkki 17) kautta, esimerkin
17 yhdiste on siten käyttökelpoinen tämän keksinnön mu-
kaisten yhdisteiden välituotteena.

Yhdisteitä voidaan antaa sellaisenaan tai farma-
20 seuttisen kantajan kanssa niitä tarvitsevalle nisäkkäälle.
Farmaseuttinen kantaja voi olla kiinteä tai nestemäinen.

Kiinteä kantaja voi käsittää yhden tai useamman
aineen, joka voi niin ikään toimia flavoriaineena, voite-
luaineena, liuottavana aineena, suspendoimisaineena, täy-
25 teaineena, liukastavana aineena, tabletointiapuaineena,
sideaineena tai tablettia hajottavana aineena; se voi myös
olla kapselointimateriaali. Jauheissa kantaja on hienoja-
koinen kiinteä aine, joka on sekoitettu hienoksi jauhet-
tuun vaikuttavaan ainesosaan. Tableteissa vaikuttava ai-
30 nesosa on sekoitettu kantajaan, jolla on tarvittavat tab-
letointiominaisuudet, sopivissa suhteissa ja puristettu
haluttuun muotoon ja kokoon. Jauheet ja tabletit sisältä-
vät edullisesti aina 99 % vaikuttavaa ainesosaa. Sopivia

kiinteitä kantajia ovat esimerkiksi kalsiumfosfaatti, magnesiumstearaatti, talkki, sokerit, laktoosi, dekstriini, tärkkelys, gelatiini, selluloosa, metyyli-selluloosa, natriumkarboksime-tyyli-selluloosa, polyvinyylipyrrolidoni, vahat, joiden sulamispiste on alhainen, sekä ioninvaihtohartsit.

Nestemäisiä kantajia käytetään liuosten, suspensioiden, emulsioiden, siirappien, eliksiirien ja paineistettujen koostumusten valmistamiseksi. Vaikuttava ainesosa voidaan liuottaa tai liettää farmaseuttisesti hyväksyttävään nestemäiseen kantajaan kuten veteen, orgaaniseen liuottimeen, näiden molempien seokseen tai farmaseuttisesti hyväksyttäviin öljyihin tai rasvoihin. Nestemäinen kantaja voi sisältää muita sopivia farmaseuttisia lisäaineita, kuten liuottavia aineita, emulgaattoreita, puskureita, säilytysaineita, makeutusaineita, flavoriaineita, suspendoimisaineita, paksuntimia, värejä, viskositeettia säätäviä aineita, stabiloimisaineita tai osmoottista painetta sääteleviä aineita. Sopivia esimerkkejä nestemäisistä kantajista suun kautta tai ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tapahtuvaan lääkkeenantoon ovat vesi (joka sisältää osittain edeltävän kaltaisia lisäaineita, esim. selluloosajohdannaisia, edullisesti käytetään natriumkarboksime-tyyli-selluloosaliuosta), alkoholit (mukaan lukien monohydriset alkoholit ja polyhydriset alkoholit, esim. glykolit) ja niiden johdannaiset, sekä öljyt (esim. fraktioitu kookosöljy ja maapähkinäöljy). Ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tapahtuvaan lääkkeenantoon kantaja voi samoin olla öljyesteri, kuten etyylioleaatti tai isopropyylimyristaatti. Steriilit nestemäiset kantajat ovat käyttökelpoisia steriileissä nestemuotoisissa koostumuksissa ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tapahtuvaan lääkkeenantoon. Nestemäinen kantaja paineistettuihin koostumuksiin voi olla

halogenoitu hiilivety tai muu farmaseuttisesti hyväksyttävä ponneaine.

5 Nestemäisiä farmaseuttisia koostumuksia, jotka ovat steriilejä liuoksia tai suspensioita, voidaan käyttää esimerkiksi lihaksensisäisenä, vatsaontelon sisäisenä tai ihonlaisena ruiskeena. Steriilejä liuoksia voidaan niin ikään antaa laskimonsisäisesti. Yhdiste voidaan myös antaa suun kautta joko nestemäisessä tai kiinteässä koostumus-

10 Edullisesti farmaseuttinen koostumus on yksikköannostusmuodossa, esim. tabletteina tai kapseleina. Tällaisessa muodossa koostumus on jaettu yksikköannoksiksi, jotka sisältävät tarkoituksenmukaiset määrät vaikuttavaa ainesosaa; yksikköannostusmuodot voivat olla pakattuja koostumuksia, esimerkiksi pakattuja jauheita, pieniä pulloja, 15 ampulleja, esitäytettyjä ruiskuja tai sasetteja, jotka sisältävät nesteitä. Yksikköannostusmuoto voi olla esimerkiksi kapseli tai tabletti sinänsä, tai se voi olla tarkoituksenmukainen kappalemäärä mitä tahansa tällaisia 20 koostumuksia pakatussa muodossa. Hoitavan lääkärin on harkintansa mukaan määrättävä hoidossa käytettävä annostus.

Lisäksi tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää liuoksena, voiteena tai huuhteena koostamalla ne 25 farmaseuttisesti hyväksyttäviin kantoaineisiin, jotka sisältävät 0,1 - 5 %, edullisesti 2 %, vaikuttavaa yhdistettä, jota liuosta, voidetta tai huuhdetta voidaan sitten käyttää sienitartunnan saaneella alueella.

30 Seuraavat esimerkit havainnollistavat tämän keksinnön mukaisten edustavien yhdisteiden valmistusta.

Esimerkki 1

Rapamysiinin 42-esteri (4-fluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa

Liuokseen, jossa oli 70 mg rapamysiiniä 1 ml:ssa pyridiiniä, lisättiin 0 °C:ssa vedettömissä olosuhteissa 50 mg parafluorifenyyli-isosyanaattia 1,5 ml:ssa pyridiiniä. Seosta sekoitettiin 0 °C:ssa 5 tunnin ajan, minkä jälkeen reaktioseosta laimennettiin lisäämällä 20 ml 2 N HCl:ää 0 °C:ssa ja sitä uutettiin etyyliasetaatilla. Etyyliasetattiute pestiin suolaliuoksella, kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä. Eluoimalla 30-%:isella etyyliasetaattiliuoksella bentseenissä saatiin 15 mg otsikkoyhdistettä valkeana kiinteänä aineena; sp. 99 - 103 °C.

IR = KBr maks. 3440 (OH), 1740 (C=O), 1625 (amidi-C=O), 1460, 1855, 1200, 1070, 990 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ 7,38 (t, 2H, aromaattisia protoneja, orto-asemassa fluoriin nähden), 7,00 (t, 2H, aromaattisia protoneja meta-asemassa fluoriin nähden), 3,39 (s, 3H, CH₃O), 3,33 (s, 3H, CH₃O); 3,14 (s, 3H, CH₃O). MS (neg. ioni FAB) 1050 (M⁻), 590, 458, 167.

Esimerkki 2

Rapamysiinin 42-esteri fenyylikarbamiinihapon kanssa

Liuokseen, jossa oli 100 mg rapamysiiniä 0,8 ml:ssa pyridiiniä, lisättiin 0 °C:ssa vedettömissä olosuhteissa 60 mg fenyyli-isosyanaattia 0,5 ml:ssa pyridiiniä. Seosta sekoitettiin 0 °C:ssa vedettömissä olosuhteissa 5 tunnin ajan, minkä jälkeen reaktioseosta laimennettiin lisäämällä 20 ml 2 N HCl:ää 0 °C:ssa ja sitä uutettiin etyyliasetaatilla. Etyyliasetattiute pestiin suolaliuoksella, kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin.

Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä. Eluoimalla 25-%:isella etyyliasetaattiliuoksella bentseenissä saatiin 65 mg otsikkoyhdistettä valkeana kiinteänä aineena; sp. 106 - 109 °C.

5 IR = KBr maks. 3400 (OH), 1725 (C=O), 1645 (amidi-C=O), 1600 (aromaattinen), 1540, 1440, 1315, 1080, 990 ja 750 (aromaattinen). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ 7,40 (t, 2H, aromaattinen, orto-asemassa NH:hon nähden), 7,32 (t, 2H, aromaattinen, 3,34 (s, 3H, CH₃O), 3,14 (s, 3H, CH₃O). MS
10 (neg. ioni FAB) 1032 (M⁻), 590, 321, 167.

Esimerkki 3

Rapamysiinin 31,42-diesteri [4-(trifluorimetyyli)-fenyyli]karbamiinihapon kanssa

Liuos, jossa oli 0,45 g 4-(trifluorimetyyli)fenyyli-isosyanaattia 5 ml:ssa kuivaa pyridiiniä, lisättiin
15 liuokseen, jossa oli 1,00 g rapamysiiniä 10 ml:ssa kuivaa pyridiiniä, 0 °C:ssa ja saatua liuosta sekoitettiin 0 - 5 °C:ssa 3,5 tunnin ajan. Kylmää 2 N HCl:ää (75 ml) lisättiin ja tuote uutettiin etyyliasetattiin, minkä jälkeen
20 saatu uute pestiin suolaliuoksella, kuivattiin magnesiumsulfaattilla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä. Eluoimalla 10-%:isella etyyliasetaattiliuoksella metyleenikloridissa saatiin 0,63 g 31,42-diesteriä valkeana kiinteänä aineena;
25 sp. 147 - 195 °C.

IR (KBr): 3400 (OH), 1730 (C=O), 1615, 1530, 1320, 1210, 1110, 1060 ja 840 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7,46 - 7,57 (kompleksi, 8H, aromaattinen), 3,38 (s, 3H, OCH₃), 3,36 (s, 3H, OCH₃), 3,16 (s, 3H, OCH₃), MS (neg. ioni FAB): 1287
30 (M⁻), 1081, 894, 590, 321.

Seuraavat edustavat yhdisteet voidaan valmistaa rapamysiinistä ja tarkoituksenmukaisesta isosyanaatista

käyttämällä otsikkoyhdisteen valmistamiseksi esimerkissä 3 käytettyä menetelmää.

Rapamysiini-31,42-diesteri(fenyyylimetyyli)karbamiinihapon kanssa

5 Rapamysiini-31,42-diesteri sykloheksyylikarbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-31,42-diesteri metyylikarbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-31,42-diesteri 2-propyylikarbamiinihapon kanssa

10 Rapamysiini-31,42-diesteritrifluorimetyylikarbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-31,42-diesteri 2-nitroetyylikarbamiinihapon kanssa

15 Rapamysiini-31,42-diesteri[4-(N,N-dimetyyli)butyyli]karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-31,42-diesteri [2-(karbometoksi)etyyli]karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-31,42-diesteri [4-(metyylitio)butyyli]karbamiinihapon kanssa

20 Rapamysiini-31,42-diesteri[3-etyyli-4-(4-nitrofenyyli)butyylikarbamiinihapon kanssa

Esimerkki 4

Rapamysiinin 42-esteri [4-(trifluorimetyyli)fenyyli]karbamiinihapon kanssa

25 Eluoimalla edelleen esimerkissä 3 kuvattua jäännöstä 30-%:isella etyyliasetaattiliuoksella metyleenikloridissa saatiin 0,20 g 42-monoesteriä valkeana kiinteänä aineena; sp. 144 - 172 °C.

IR (KBr): 3450 (OH), 1730 (C=O), 1650, 1615, 1535, 1445, 30 1315, 1210, 1110, 1050, 980 ja 835 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,55 (d, 2H, aromaattinen), 7,50 (d, 2H, aromaattinen), 3,39 (s, 3H, OCH₃), 3,34 (s, 3H, OCH₃), 3,14

(s, 3H, OCH₃). MS (neg. ioni FAB): 1100 (M⁻), 590, 321, 160.

Seuraavat edustavat yhdisteet voidaan valmistaa rapamysiinistä ja tarkoituksenmukaisesta isosyanaatista käyttämällä otsikkoyhdisteen valmistamiseksi esimerkissä 4 käytettyä menetelmää.

Rapamysiini-42-esteri (fenyyylimetyyli)karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-esteri sykloheksyylikarbamiinihapon kanssa

10 Rapamysiini-42-esteri metyylikarbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-esteri 2-propyylikarbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-esteri trifluorimetyylikarbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-esteri 2-nitroetyylikarbamiinihapon kanssa

15 Rapamysiini-42-esteri [4-(N,N-dimetyyli)butyyli]karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-esteri [2-(karbometoksi)etyyli]karbamiinihapon kanssa

20 Rapamysiini-42-esteri[4-(metyylitio)butyyli]karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-esteri[3-etyyli-4-(4-nitrofenyyli)butyyli]karbamiinihapon kanssa

Esimerkki 5

25 **Rapamysiinin 31,42-diesteri (4-nitrofenyyli)karbamiinihapon kanssa**

30 Liuos, jossa oli 0,38 g 4-nitrofenyyli-isosyanaattia 4 ml:ssa pyridiiniä, lisättiin liuokseen, jossa oli 1,16 g rapamysiiniä 11 ml:ssa pyridiiniä, 0 °C:ssa ja sekoitettiin 0 °C:ssa 15 minuutin ajan, minkä jälkeen seos lämmitettiin 20 °C:seen 15 minuutissa ja sekoitettiin 20 °C:ssa 1,5 tunnin ajan. Lisättiin kylmää 2 N HCl:ää (75 ml), tuotteet uutettiin etyyliasetaattiin, pestiin suolaliuoksella, kuivattiin magnesiumsulfaattilla ja haih-

duutettiin kuiviin. Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä; eluoimalla 10-%:isella etyyliasettaattiliuoksella metyleenikloridissa saatiin 160 mg diesteriä keltaisena kiinteänä aineena; sp. 164 - 171 °C.

5 IR (KBr): 3380 (OH), 2910, 1725 (C=O), 1635, 1590, 1500, 1320, 1200 ja 850 cm^{-1} . ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8,20 (d, 4H, aromaattisia), 7,57 (d, 2H, aromaattisia), 7,53 (d, 2H, aromaattisia), 3,38 (s, 3H, OCH_3), 3,37 (s, 3H, OCH_3), 3,16 (s, 3H, OCH_3). MS (neg. ioni FAB): 1241 (M^-), 1058, 590.

Esimerkki 6

Rapamysiinin 42-esteri (4-nitrofenyyli)karbamiinihapon kanssa

15 Eluoimalla edelleen esimerkissä 5 kuvattua jäännöstä 30-%:isella etyyliasettaattiliuoksella metyleenikloridissa saatiin 380 mg 42-monoesteriä keltaisena kiinteänä aineena; sp. 137 - 144 °C.

20 IR (KBr): 3420 (OH), 2910, 1725 (C=O), 1500, 1320, 1205 ja 840 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8,20 (d, 2H, aromaattinen), 7,56 (d, 2H, aromaattinen), 3,39 (s, 3H, OCH_3), 3,34 (s, 3H, OCH_3), 3,14 (s, 3H, OCH_3). MS (neg. ioni FAB): 1077 (M^-), 590, 321.

Esimerkki 7

Rapamysiinin 31,42-diesteri (4-metyylifenyyli)karbamiinihapon kanssa

25 Liuos, jossa oli 1,04 g 4-metyylifenyyli-isosyanaattia 3 ml:ssa pyridiiniä, lisättiin liuokseen, jossa oli 2,20 g rapamysiiniä 8 ml:ssa pyridiiniä, 0 °C:ssa ja sekoitettiin 0 °C:ssa 3,5 tunnin ajan. Lisättiin kylmää 30 2 N HCl:ää (180 ml), tuotteet uutettiin etyyliasetattiin, pestiin suolaliuoksella, kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä; eluoimalla 10-%:isella

etyyliasetatiliuoksella metyleenikloridissa saatiin 300 mg 31,42-diesteriä keltaisena kiinteänä aineena; sp. 129 - 145 °C.

IR (KBr): 3400 (OH), 2920, 1725 (C=O), 1645, 1520, 1450, 1215, 1200 ja 812 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7,27 (kompleksi, 4H, aromaattinen), 7,10 (kompleksi, 4H, aromaattinen), 3,38 (s, 3H, OCH_3), 3,35 (s, 3H, OCH_3), 3,16 (s, 3H, OCH_3), 2,30 (s, 3H, ArCH_3), 2,28 (s, 3H, ArCH_3). MS (neg. ioni FAB): 1179 (M^-), 1027.

10 Esimerkki 8

Rapamysiinin 42-esteri (4-metyylifenyyli)karbamiinihapon kanssa

Eluoimalla edelleen esimerkissä 7 kuvattua jäänöstä 30-%:isella etyyliasetatiliuoksella metyleenikloridissa saatiin 200 mg 42-monoesteriä keltaisena kiinteänä aineena; sp. 123 - 135 °C.

IR (KBr): 3420 (OH), 2930, 1720 (C=O), 1640, 1520, 1440, 1220, 1203 ja 1055 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7,27 (d, 2H, aromaattinen), 7,10 (d, 2H, aromaattinen), 3,40 (s, 3H, OCH_3), 3,34 (s, 3H, OCH_3), 3,14 (s, 3H, OCH_3), 2,30 (s, 3H, ArCH_3). MS (neg. ioni FAB): 1046 (M^-), 590, 321.

Esimerkki 9

Rapamysiinin 42-esteri (2,4-difluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa

25 Liuosta, jossa oli 0,24 g rapamysiiniä ja 0,10 g 2,4-difluorifenyyli-isosyanaattia 6 ml:ssa pyridiiniä, sekoitettiin 45 minuutin ajan 0 °C:ssa. Kylmää 2 N HCl:ää (50 ml) lisättiin, tuote uutettiin etyyliasetattiin, pestiin suolaliuoksella, kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja 30 haihdutettiin kuiviin. Suorittamalla kromatografia-ajo silikageelissä käyttäen eluenttina 25-%:ista etyyliasetatiliuosta metyleenikloridissa saatiin 69 mg 42-esteriä valkeana kiinteänä aineena; sp. 109 - 114 °C.

IR (KBr): 3420 (OH), 2910, 1720 (C=O), 1635, 1520, 1215, 1085 ja 975 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6,84 (kompleksi, 2H, aromaattinen), 6,69 (kompleksi, 1H, aromaattinen), 3,39 (s, 3H, OCH_3), 3,33 (s, 3H, OCH_3), 3,14 (s, 3H, OCH_3).
 5 MS (neg. ioni FAB): 1068 (M^-), 590, 321.

Esimerkki 10

Rapamysiinin 31,42-diesteri (2,4-difluorifenyyli)- karbamiinihapon kanssa

Liuosta, jossa oli 0,20 g rapamysiiniä ja 0,14 g
 10 2,4-difluorifenyyli-isosyanaattia 10 ml:ssa pyridiiniä, sekoitettiin 5 tunnin ajan 20 °C:ssa. Kylmää 2 N HCl:ää (50 ml) lisättiin, tuote uutettiin etyyliasetaattiin, pestiin suolaliuoksella ja kuivattiin magnesiumsulfaattilla. Liuotin haihdutettiin eroon ja jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä käyttäen eluenttina
 15 10-%:ista etyyliasetaattiliuosta metyleenikloridissa, jolloin saatiin 0,20 g otsikkoyhdistettä vaaleankeltaisena kiinteänä aineena; sp. 115 - 123 °C.

IR (KBr): 3420 (OH), 2910, 1725 (C=O), 1638, 1523, 1212,
 20 1090 ja 835 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6,85 (kompleksi, 4H, aromaattinen), 6,70 (kompleksi, 2H, aromaattinen), 3,39 (s, 3H, OCH_3), 3,36 (s, 3H, OCH_3), 3,15 (s, 3H, OCH_3).
 MS (neg. ioni FAB): 1223 (M^-), 1049, 590, 321.

Esimerkki 11

Rapamysiinin 31,42-diesteri fenyylikarbamiinihapon kanssa

Liuosta, jossa oli 0,50 g rapamysiiniä ja 0,19 g
 fenyyli-isosyanaattia 10 ml:ssa pyridiiniä, sekoitettiin
 16 tunnin ajan 20 °C:ssa. Kylmää 2 N HCl:ää (100 ml) lisät-
 30 tiin ja tuote uutettiin etyyliasetaattiin, pestiin suola-
 liuoksella ja kuivattiin magnesiumsulfaattilla. Liuotin
 haihdutettiin eroon ja jäännöksellä suoritettiin kromato-
 grafia-ajo silikageelissä käyttäen eluenttina 10-%:ista

etyyliasetaattiliuosta metyleenikloridissa, jolloin saatiin 0,32 g otsikkoyhdistettä valkeana kiinteänä aineena; sp. 139 - 148 °C.

IR (KBr): 3330 (OH), 2920, 1720 (C=O), 1670, 1590, 1520, 1430, 1205, 745 ja 685 cm⁻¹. NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,27 - 7,40 (kompleksi, 8H, aromaattinen), 7,06 (kompleksi, 2H, aromaattinen), 3,39 (s, 3H, OCH₃), 3,37 (s, 3H, OCH₃), 3,16 (s, 3H, OCH₃). MS (neg. ioni FAB): 1151 (M⁻), 1013, 590, 321.

10 **Esimerkki 12**

Rapamysiinin 31,42-diesteri (4-fluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa

Liuosta, jossa oli 1,54 g rapamysiiniä ja 0,68 g 4-fluorifenyyli-isosyanaattia 10 ml:ssa pyridiiniä, sekoitettiin 0 °C:ssa 4,5 tunnin ajan. Kylmää 2 N HCl:ää (100 ml) lisättiin, tuote uutettiin etyyliasetaattiin, pestiin suolaliuoksella, kuivattiin magnesiumsulfaatilla, haihdutettiin kuiviin ja jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä käyttäen eluenttina 10-%:ista etyyliasetaattiliuosta metyleenikloridissa, jolloin saatiin 0,65 g lopputuotetta valkeana kiinteänä aineena; sp. 129 - 140 °C.

IR (KBr): 3430 (OH), 2920, 1725 (C=O), 1640, 1505, 1200 ja 825 cm⁻¹. NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,33 (kompleksi, 4H, aromaattinen), 6,99 (t, 4H, aromaattinen), 3,38 (s, 3H, OCH₃), 3,35 (s, 3H, OCH₃), 3,16 (s, 3H, OCH₃). MS (neg. ioni FAB): 1187 (M⁻), 1031, 590, 321.

Esimerkki 13

Rapamysiinin 42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri

30 Rapamysiiniä (0,914 g) lisättiin liuokseen, jossa oli 0,204 g imidatsolia ja 0,165 g tert-butyylidimetyylisilylikloridia 4 ml:ssa dimetyyliformamidia, 0 °C:ssa ja seosta sekoitettiin typpisuojaakaasussa 16 tunnin ajan

20 °C:ssa. Suolaliuosta (100 ml) lisättiin, tuote uutettiin
 eetteriin, pestiin suolaliuoksella, kuivattiin MgSO_4 :llä ja
 haihdutettiin kuiviin. Suorittamalla jäännöksellä kromato-
 grafia-ajo silikageelissä saatiin 0,65 g otsikkoyhdistettä
 5 valkeana kiinteänä aineena.

IR (KBr): 3430 (OH), 2920, 1715 (C=O), 1645, 1105, 985,
 870, 842 ja 775 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3,41 (s, 3H,
 OCH_3), 3,34 (s, 3H, OCH_3), 3,14 (s, 3H, OCH_3), 0,886 (s, 9H,
 t-Bu), 0,074 (s, 3H, SiCH_3), 0,059 (s, 3H, SiCH_3). MS (neg.
 10 ioni FAB): 1027 (M^-), 590, 435.

Esimerkki 14

**Rapamysiinin 42-tert-butyylidimetyylisilyylieette-
 ri-31-esteri (2,4-difluorifenyyli)karbamiinihapon
 kanssa**

15 Liuosta, jossa oli 0,38 g rapamysiini-42-tert-bu-
 tyylidimetyylisilyylieetteriä ja (2,4-difluorifenyyli)iso-
 syanaattia 6 ml:ssa pyridiiniä, sekoitettiin 16 tunnin
 ajan 20 °C:ssa. Kylmää 2 N HCl:ää (75 ml) lisättiin, tuote
 uutettiin etyyliasetaattiin, pestiin suolaliuoksella, kui-
 20 vattiin magnesiumsulfaatilla, haihdutettiin kuiviin ja
 jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä
 käyttäen eluenttina 2-%:ista etyyliasetaattiliuosta mety-
 leenikloridissa, jolloin saatiin 150 mg otsikkoyhdistettä
 valkeana kiinteänä aineena; sp. 112 - 122 °C.

25 IR (KBr): 3440 (OH), 2910, 1745 (C=O), 1640, 1520, 1090,
 840 ja 765 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6,84 (kompleksi,
 3H, aromaattinen), 3,41 (s, 3H, OCH_3), 3,36 (s, 3H, OCH_3),
 3,15 (s, 3H, OCH_3), 0,88 (pH, t-butyylili), 0,075 (3H,
 SiCH_3), 0,061 (3H, SiCH_3). MS (neg. ioni FAB): 1182 (M^-),
 30 1027, 1008, 590, 435.

Seuraavat edustavat yhdisteet voidaan valmistaa
 rapamysiinistä ja tarkoituksenmukaisesta isosyanaatista

käyttämällä otsikkoyhdisteen valmistamiseksi esimerkissä 14 käytettyä menetelmää.

Rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteri (fenyylimetyyli)karbamiinihapon kanssa

5 Rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteri heksyylikarbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteri difluorimetyylkarbamiinihapon kanssa

10 Rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteri [4-(N,N-dimetyyli)butyyli]karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteri [4-(karbometoksi)butyyli]karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteri [2-(fenyylimetyyli)butyyli]karbamiinihapon kanssa

15 **Esimerkki 15**

Rapamysiinin 31-esteri (2,4-difluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa

Rapamysiinin 42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteriä (2,4-difluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa
 20 (0,60 g) sekoitettiin 16 tunnin ajan 20 °C:ssa liuoksessa, jossa oli 4 ml tetrahydrofuraania, 4 ml vettä ja 12 ml etikkahappoa. Seosta laimennettiin lisäämällä 100 ml vettä, minkä jälkeen tuote uutettiin metyleenikloridiin, pestiin suolaliuoksella, kuivattiin MgSO_4 :llä ja haihdutettiin
 25 öljyksi, jolla suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä käyttäen eluenttina 30-%:ista etyyliasetaattiliuosta metyleenikloridissa, jolloin saatiin 220 mg otsikkoyhdistettä valkeana kiinteänä aineena; sp. 103 - 117 °C.

IR (KBr): 3440, 2920, 1735 (C=O), 1640, 1525, 1090 ja 840
 30 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6,85 (kompleksi, 3H, aromaattinen), 3,40 (s, 3H, OCH_3), 3,36 (s, 3H, OCH_3), 3,15 (s, 3H, OCH_3). MS (neg. ioni FAB): 1068 (M^-), 894, 590, 128.

Seuraavat edustavat yhdisteet voidaan valmistaa rapamysiinistä ja tarkoituksenmukaisesta isosyanaatista käyttämällä otsikkoyhdisteen valmistamiseksi esimerkissä 15 käytettyä menetelmää.

5 Rapamysiini-31-esteri (fenyyylimetyyli)karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-31-esteri heksyylikarbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-31-esteri difluorimetyylikarbamiinihapon kanssa

10 Rapamysiini-31-esteri [4-(N,N-dimetyyli)butyyli]karbamiinihapon kanssa

Rapamysiini-31-esteri[4-(karbometoksi)butyyli]karbamiinihapon kanssa

15 Rapamysiini-31-esteri[2-(fenyyylimetyyli)butyyli]karbamiinihapon kanssa

Esimerkki 16

Rapamysiinin 42-esteri fenyyლისulfonylikarbamiinihapon kanssa

20 Liuokseen, jossa oli 192 mg rapamysiiniä 1 ml:ssa tolueenia, lisättiin 0 °C:ssa typpisuoja-
 bentseenisulfonyyli-isosyanaattia 1 ml:ssa tolueenia. Reaktioseosta sekoitettiin 0 °C:ssa typpisuoja-
 25 100 ml etyyliasetaattia ja se pestiin suolaliuoksella (3 x 20 ml). Etyyliasetaattiliuos kuivattiin magnesiumsulfaattilla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-
 ajo silikageelissä. Eluoimalla etyyliase-
 30 taatti/heksaanilla (1:1) saatiin 36 mg otsikkoyhdistettä valkeana vaahtona.

IR (KBr) 3440 (OH), 2910, 1735 & 1710 (C=O), 1635 (aromaattinen), 1440, 1160, 1080 ja 980 cm⁻¹. NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8,04 (m, 2H, aromaattinen), 7,65 (m, 1H, aromaattinen), 7,56 (m, 2H, aromaattinen), 3,41 (s, 3H, OCH₃),

3,34 (s, 3H, OCH₃), 3,13 (s, 3H, OCH₃). MS (neg. ioni FAB): 1095 (M⁻), 590, 321.

Esimerkki 17

5 **Rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteri fenyyli-sulfonylikarbamiinihapon kanssa**

10 Rapamysiiniä (0,914 g) lisättiin liuokseen, jossa oli 0,204 g imidatsolia ja 0,165 g tert-butyylidimetyylisilyylikloridia 4 ml:ssa dimetyyli-formamidia, 0 °C:ssa ja seosta sekoitettiin typpisuo-jakaasussa 16 tunnin ajan 20 °C:ssa. Suolaliuosta (100 ml) lisättiin, tuote uutettiin eetteriin, pestiin suolaliuoksella, kuivattiin MgSO₄:llä ja haihdutettiin kuiviin. Suorittamalla jäännöksellä kromatografia-ajo silikageelissä saatiin 0,65 g rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteriä valkeana kiinteänä aineena.

15 Liuokseen, jossa oli 308 mg rapamysiini-42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteriä 1 ml:ssa tolueenia, lisättiin 0 °C:ssa typpisuo-jakaasussa 109 mg bentseenisulfonyyli-isosyanaattia 1 ml:ssa tolueenia. Reaktioseosta 20 sekoitettiin 0 °C:ssa typpisuo-jakaasussa 3 tunnin ajan, minkä jälkeen sitä laimennettiin lisäämällä 100 ml etyyliasetaatia ja se pestiin suolaliuoksella (2 x 20 ml). Etyyliasetaatiliuos kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo 25 silikageelissä. Eluoimalla etyyliasetatti/heksaanilla (1:1) saatiin 310 mg otsikkoyhdistettä valkeana vaahtona.

IR (KBr): 3400 ja 3240 (OH), 2915, 1740 ja 1710 (C=O), 1640, 1440, 1160, 1080 cm⁻¹. NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8,00 30 (m, 2H, aromaattinen), 7,55 (m, 3H, aromaattinen), 3,45 (s, 3H, OCH₃), 3,27 (s, 3H, OCH₃), 3,13 (s, 3H, OCH₃). MS (neg. ioni FAB): 1209 (M⁻), 590, 156.

Esimerkki 18**Rapamysiinin 31-esteri fenyyლისulfonylikarbamiinihapon kanssa**

5 Liuokseen, jossa oli 250 mg rapamysiinin 42-tert-butyylidimetyylisilyylieetteri-31-esteriäfenyyლისulfonylikarbamiinihapon kanssa 2 ml:ssa tetrahydrofuraania, lisättiin 2 ml vettä ja 6 ml etikkahappoa. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpisuoja-
 10 etyyliasetaattia ja se pestiin suolaliuoksella (2 x 20 ml). Etyyliasetaattiliuos kuivatettiin magnesiumsulfaattilla ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin 208 mg otsikkoyhdistettä valkeana vaahtona.

IR (KBr): 3400 (OH), 2930, 1730 (C=O), 1640 (aromaattinen), 1440, 1340, 1160, 1085 cm^{-1} . NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8,0 (m, 2H, aromaattinen), 7,59 (m, 3H, aromaattinen), 3,41 (s, 3H, OCH_3), 3,26 (s, 3H, OCH_3), 3,14 (s, 3H, OCH_3). MS (neg. ioni FAB): 1095 (M^-), 589, 321.

Esimerkki 19**Rapamysiinin 42-esteri (4-kloorifenyyლისulfonyyli)-karbamiinihapon kanssa**

20 Liuokseen, jossa oli 400 mg rapamysiiniä 10 ml:ssa eetteri/tolueenia (1:4), lisättiin -10 °C:ssa typpisuoja-
 25 kaasussa 100 mg 4-klooribentseenisulfonyyli-isosyanaattia 1 ml:ssa tolueenia. Seosta sekoitettiin 0 °C:ssa typpisuoja-
 30 jakaasussa 3,5 tunnin ajan, sitä laimennettiin lisäämällä 120 ml etyyliasetaattia, se pestiin kyllästetyllä natriumbikarbonaattiliuoksella ja sitten vedellä ja kuivatettiin magnesiumsulfaattilla. Etyyliasetaattiliuos haihdutettiin
 kuiviin ja jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä. Eluoimalla etyyliasetaatilla saatiin 100 mg otsikkoyhdistettä valkeana kiinteänä aineena; sp. 142 - 146 °C. Otsikkoyhdiste eristettiin trihydraattina.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), δ 8,0 (d, $J=13$ t/sek, 2H, aromaattisia protoneja meta-asemassa sulfonyyliryhmään nähden), 7,53 (d, $J=13$ t/sek, 2H, aromaattisia protoneja orto-asemassa sulfonyyliryhmään nähden), 3,30 (s, 3H, OCH_3), 3,20 (s, 3H, OCH_3), 3,13 (s, 3H, OCH_3) miljoonaa. MS (neg. ioni FAB): 1129 (MH^-). IR KBr maks. 3430 (OH), 2930, 1740, 1730 (molemmat C=O), 1640 (amidi-C=O), 1450, 1350 ($-\text{SO}_2-$), 1160 ($-\text{SO}_2-$), 1090, 985 cm^{-1} .
 Koostumusanalyysi: $\text{C}_{58}\text{H}_{83}\text{ClN}_2\text{O}_{16}\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$:lle laskettu C, 58,74; H, 7,56; N, 2,35; todettu C, 58,92; H, 7,99; N, 2,17.

Esimerkki 20

Rapamysiinin 42-esteri (3-metyylifenyyლისulfonyyli)karbamiinihapon kanssa

Liuokseen, jossa oli 400 mg rapamysiiniä 10 ml:ssa etyyliasetaatti/eetteriä (1:4), lisättiin -10°C :ssa typpisuojakaasussa 127 mg 3-metyylifenyyლისulfonyyli-isosyanaattia 2 ml:ssa eetteriä. Seosta sekoitettiin 0°C :ssa typpisuojakaasussa 4,5 tunnin ajan, sitä laimennettiin lisäämällä 120 ml etyyliasetaattia, se pestiin kyllästetyllä natriumbikarbonaattiliuoksella ja kuivatettiin magnesiumsulfaattilla. Etyyliasetaattiliuos haihdutettiin kuiviin ja jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo sili-kageelissä. Eluoimalla etyyliasetaatti/n-heksaanilla (1:1) saatiin 270 mg otsikkoyhdistettä valkeana jauheena; sp. 116 - 120°C .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), δ 8,13 (d, $J=13$ t/sek, 1H, aromaattinen protoni orto-asemassa sulfonyyliryhmään nähden), 7,53 (m, 1H, aromaattinen protoni, para-asemassa sulfonyyliryhmään nähden), 7,39 (m, 1H, aromaattisia protoneja para-asemassa metyyliiryhmään nähden), 7,33 (d, $J=13$ t/sek, 1H, aromaattinen orto-asemassa metyyliiryhmään nähden), 3,23 (s, 3H, OCH_3), 3,18 (s, 3H, OCH_3), 3,14 (s, 3H, OCH_3), 2,67 (2, 3H, aromaattinen metyyli) miljoonaa. MS (neg.

ioni FAB): 1109 (MH^+). IR KBr maks. 3450 (OH), 2940, 1740, 1720 (C=O), 1640 (amidi- C=O), 1450, 1340 ($-\text{SO}_2-$), 1160 ($-\text{SO}_2-$), 990 cm^{-1} .

Esimerkki 21

5 Rapamysiinin 31,42-diesteri fenyyli-sulfonylikarbamiinihapon kanssa

Liuokseen, jossa oli 200 mg rapamysiinin 42-esteriä fenyyli-sulfonylikarbamiinihapon kanssa 3 ml:ssa etyyliasetaatteja/eetteriä (1:1), lisättiin 0 °C:ssa typpisuo-
 10 jakaasussa 200 mg bentseenisulfonyyli-isosyanaattia 0,5 ml:ssa eetteriä. Reaktioseosta sekoitettiin 0 °C:ssa typpisuo-
 jakaasussa 18 tunnin ajan ja 22 °C:ssa 3 tunnin ajan, minkä jälkeen sitä laimennettiin lisäämällä 120 ml etyyliasetaatteja, se pestiin kyllästetyllä natriumbikarbonaattiliuoksella ja sitten suolaliuoksella. Etyyliasetaattiliuos
 15 kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelissä. Eluoimalla etyyliasetaatilla saatiin 75 mg otsikkoyhdistettä valkeana vaahtona; sp. 104 - 108 °C.

20 NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8,03 (m, 2H, aromaattinen), 7,55 (m, 3H, aromaattinen), 3,26 (s, 3H, OCH_3), 3,22 (s, 3H, OCH_3), 3,13 (s, 3H, OCH_3) miljoonaa. MS (neg. ioni FAB): 1278 (MH^+). IR (KBr): 3340 (OH), 2930, 1730 & 1715 (C=O), 1630 (aromaattinen), 1445, 1290, 1160, 1095, 990 cm^{-1} .

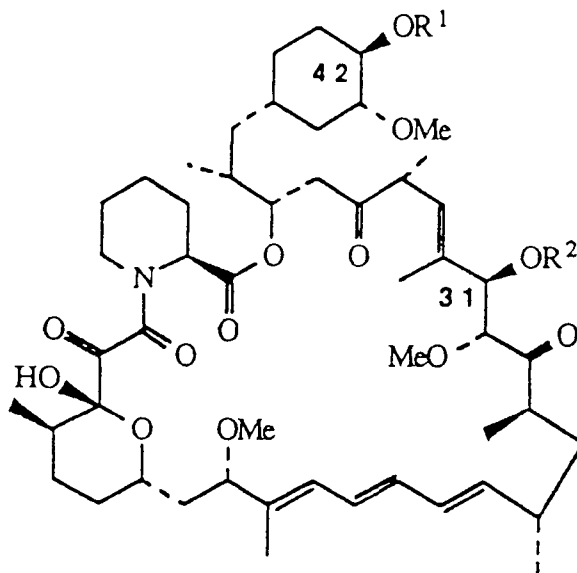
Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä 42-karbamyloidun tai 31,42-biskarba-
myloidun rapamysiinin valmistamiseksi, jonka kaava on:

5

10

15



20

jossa R^1 on $-\text{CONH}(\text{CR}^3\text{R}^4)_n-\text{X}$ tai $-\text{CONHSO}_2-\text{Ar}$ ja R^2 on
vety tai sekä R^1 että R^2 ovat kumpikin $-\text{CONH}(\text{CR}^3\text{R}^4)_n-\text{X}$ tai
 $-\text{CONHSO}_2-\text{Ar}$;

R^3 ja R^4 ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety,
1 - 6 hiiliatomin alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli,
3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, halogeeni tai trifluorimetyyli;

25

X on vety, 1 - 6 hiiliatomin alempi alkyyli, 3 - 8
hiiliatomin sykloalkyyli, trifluorimetyyli, nitro, 1 - 6
hiiliatomin alkoksi, 2 - 7 hiiliatomin karboalkoksi, 7 -
10 hiiliatomin aralkyyli, halogeeni, 1 - 6 hiiliatomin al-
kyyliyhä kohden dialkyyliamino, 1 - 6 hiiliatomin tio-
alkyyli tai Y;

30

Y on fenyyliyhä, joka voi mahdollisesti olla mo-
no-, di- tai trisubstituoitu ryhmällä, joka on 1 - 6 hii-
liatomin alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 1 - 6

hiiliatomin alkoksi, syaani, halogeeni, nitro, 2 - 7 hiiliatomin karbalkoksi, trifluorimetyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino tai 1 - 6 hiiliatomin alkyylitio;

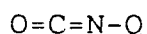
5 Ar on fenyyli, naftyyli, pyridyyli, kinolyyli, isokinolyyli, kinoksalyyli, tienyyli, tionaftyyli, furyyli, bentsofuryyli, bentsodioksyli, bentsoksatsolyyli, bentsoisoksatsolyyli tai bentsodioksolyyli; jolloin Ar-ryhmä voi mahdollisesti olla mono-, di- tai trisubstituoitu ryhmällä, joka on 1 - 6 hiiliatomim alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, syaani, halogeeni, nitro, 2 - 7 hiiliatomin karbalkoksi, trifluorimetyyli, amino, 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino, 1 - 6 hiiliatomin alkyylitio, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}$ tai $-\text{CO}_2\text{H}$; ja

$$n = 0 - 5;$$

edellyttäen, että valmistettaessa 31,42-biskarbamyloitu rapamysiini R^1 ja R^2 ovat identtiset ja $n = 0$, X on 1 - 6 hiiliatomin alempi alkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli tai Y;

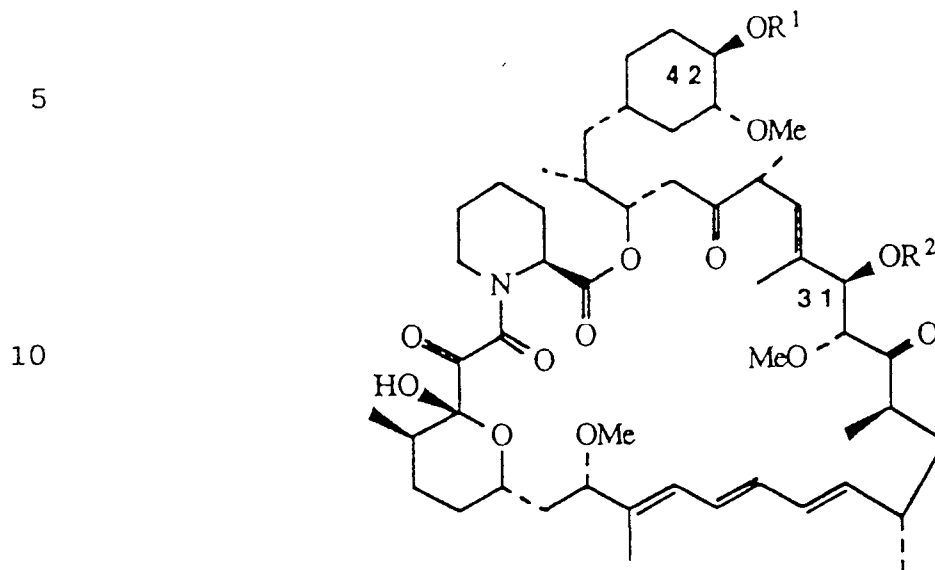
20 tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, kun X on 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino, kun Ar-ryhmä sisältää emäksisen typen tai kun Ar-ryhmä on substituoitu 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliaminolla, $-\text{SO}_3\text{H}$:lla, $-\text{PO}_3\text{H}$:lla tai $-\text{CO}_2\text{H}$:lla, t u n n e t t u siitä, että rapamysiiniä käsitellään mahdollisesti emäksen läsnä ollessa isosyanaatilla, jonka rakenne on

30



jossa Q on $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_n-\text{X}$ tai $-\text{SO}_2-\text{Ar}$, joissa R^3 , R^4 , n, X ja Ar määritellään kuten edellä.

2. Menetelmä 31-karbamyloidun rapamysiinin valmistamiseksi, jonka kaava on:



jossa R² on -CONH(CR³R⁴)_n-X tai -CONHSO₂-Ar ja R¹ on vety;

R³ ja R⁴ ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety, 1 - 6 hiiliatomin alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, halogeeni tai trifluorimetyyli;

X on vety, 1 - 6 hiiliatomin alempi alkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, trifluorimetyyli, nitro, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, 2 - 7 hiiliatomin karboalkoksi, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, halogeeni, 1 - 6 hiiliatomin alkyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino, 1 - 6 hiiliatomin tioalkyyli tai Y;

Y on fenyyliiryhmä, joka voi mahdollisesti olla mono-, di- tai trisubstituoitu ryhmällä, joka on 1 - 6 hiiliatomin alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, syaani, halogeeni, nitro, 2 - 7 hiiliatomin karbalkoksi, trifluorimetyyli, 1 - 6 hiiliatomin

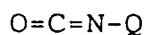
alkyyyliryhmää kohden dialkyyliamino tai 1 - 6 hiiliatomin alkyyylitio;

Ar on fenyyli, naftyyli, pyridyyli, kinolyyli, isokinolyyli, kinoksalyyli, tienyyli, tionaftyyli, furyyli, bentsofuryyli, bentsodioksyyli, bentsoksatsolyyli, bentsoisoksatsolyyli tai bentsodioksolyyli; jolloin Ar-ryhmä voi mahdollisesti olla mono-, di- tai trisubstituoitu ryhmällä, joka on 1 - 6 hiiliatomim alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, syaani, halogeeni, nitro, 2 - 7 hiiliatomin karbalkoksi, trifluorimetyyli, amino, 1 - 6 hiiliatomin alkyyyliryhmää kohden dialkyyliamino, 1 - 6 hiiliatomin alkyyylitio, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}$ tai $-\text{CO}_2\text{H}$; ja

$n = 0 - 5$;

edellyttäen, että kun $n = 0$, X on 1 - 6 hiiliatomin alempi alkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli tai Y;

tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, kun X on 1 - 6 hiiliatomin alkyyyliryhmää kohden dialkyyliamino, kun Ar-ryhmä sisältää emäksisen typen tai kun Ar-ryhmä on substituoitu 1 - 6 hiiliatomin alkyyyliryhmää kohden dialkyyliaminolla, $-\text{SO}_3\text{H}$:lla, $-\text{PO}_3\text{H}$:lla tai $-\text{CO}_2\text{H}$:lla, t u n n e t t u siitä, että rapamysiiniä käsitellään silyylihalogenidilla 42-O-silyyli-
rapamysiinin saamiseksi; 42-O-silyylirapamysiiniä käsitellään mahdollisesti emäksen läsnä ollessa isosyanaatilla, jonka rakenne on



jossa Q on $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_n-\text{X}$ tai $-\text{SO}_2-\text{Ar}$, joissa R^3 , R^4 , n, X ja Ar määritellään kuten edellä, 42-O-silyyli-31-karbamyloidun rapamysiinin saamiseksi; ja 42-O-silyyliryhmä

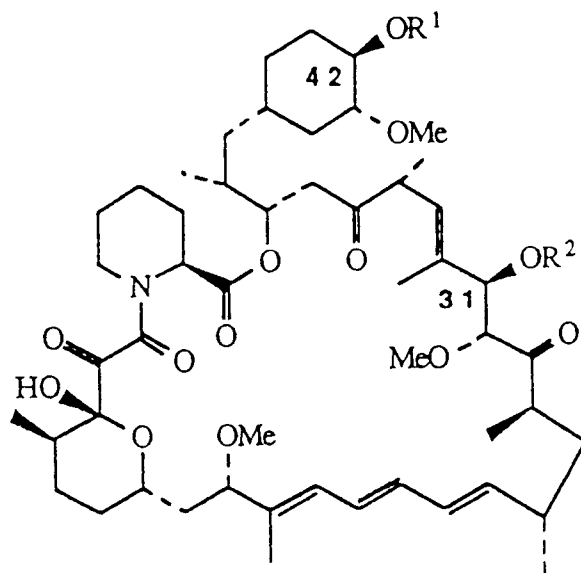
poistetaan hydrolyysissä 31-karbamyloidun rapamysiinin saamiseksi.

3. Menetelmä 31,42-biskarbamyloidun rapamysiinin valmistamiseksi, jonka kaava on:

5

10

15



jossa R^1 ja R^2 ovat toisistaan riippumatta kumpikin $-\text{CONH}(\text{CR}^3\text{R}^4)_n-\text{X}$ tai $-\text{CONHSO}_2-\text{Ar}$;

20

R^3 ja R^4 ovat kumpikin toisistaan riippumatta vety, 1 - 6 hiiliatomin alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, halogeeni tai trifluorimetyyli;

25

X on vety, 1 - 6 hiiliatomin alempi alkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, trifluorimetyyli, nitro, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, 2 - 7 hiiliatomin karboalkoksi, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, halogeeni, 1 - 6 hiiliatomin alkyyli-ryhmää kohden dialkyyliamino, 1 - 6 hiiliatomin tioalkyyli tai Y;

30

Y on fenyyli-ryhmä, joka voi mahdollisesti olla mono-, di- tai trisubstituoitu ryhmällä, joka on 1 - 6 hiiliatomin alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, syaani, halogeeni, nitro, 2 - 7 hii-

liiatomin karbalkoksi, trifluorimetyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino tai 1 - 6 hiiliatomin alkyylitio;

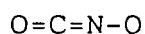
Ar on fenyyli, naftyyli, pyridyyli, kinolyyli, iso-kinolyyli, kinoksalyyli, tienyyli, tionaftyyli, furyyli, bentsofuryyli, bentsodioksyyli, bentsoksatsolyyli, bentsoisoksatsolyyli tai bentsodioksolyyli; jolloin Ar-ryhmä voi mahdollisesti olla mono-, di- tai trisubstituoitu ryhmällä, joka on 1 - 6 hiiliatomim alkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli, 1 - 6 hiiliatomin alkoksi, syaani, halogeeni, nitro, 2 - 7 hiiliatomin karbalkoksi, trifluorimetyyli, amino, 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino, 1 - 6 hiiliatomin alkyylitio, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}$ tai $-\text{CO}_2\text{H}$; ja

$n = 0 - 5$;

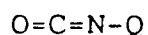
edellyttäen, että R^1 ja R^2 eivät ole identtiset ja että kun $n = 0$, X on 1 - 6 hiiliatomin alempi alkyyli, 3 - 8 hiiliatomin sykloalkyyli, 7 - 10 hiiliatomin aralkyyli tai Y;

tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, kun X on 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliamino, kun Ar-ryhmä sisältää emäksisen typen tai kun Ar-ryhmä on substituoitu 1 - 6 hiiliatomin alkyyliryhmää kohden dialkyyliaminolla, $-\text{SO}_3\text{H}$:lla, $-\text{PO}_3\text{H}$:lla tai $-\text{CO}_2\text{H}$:lla, t u n n e t t u siitä, että rapamysiiniä käsitellään silyylihalogenidilla 42-O-silyyli-
rapamysiinin saamiseksi; 42-O-silyylirapamysiiniä käsitellään mahdollisesti emäksen läsnä ollessa ensimmäisellä isosyanaatilla, jonka rakenne on

30



jossa Q on $-(CR^3R^4)_n-X$ tai $-SO_2-Ar$, joissa R^3 , R^4 , n , X ja Ar määritellään kuten edellä, 42-O-silyyli-31-karbamyloidun rapamysiinin saamiseksi; 42-O-silyyliryhmä poistetaan hydrolyysissä 31-karbamyloidun rapamysiinin saamiseksi; ja 31-karbamyloitua rapamysiiniä käsitellään mahdollisesti emäksen läsnä ollessa toisella isosyanaatilla, jonka rakenne on



10

jossa Q on $-(CR^3R^4)_n-X$ tai $-SO_2-Ar$, joissa R^3 , R^4 , n , X ja Ar määritellään kuten edellä, edellyttäen, että ainakin jokin suure R^3 , R^4 , n , X tai Ar poikkeaa Q:ssa toisessa isosyanaaatissa suureesta R^3 , R^4 , n , X tai Ar Q:ssa ensimmäisessä isosyanaaatissa, 31,42-biskarbamyloidun rapamysiinin saamiseksi.

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mahdollisesti läsnä oleva emäs on pyridiini.

20 5. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmä suoritetaan lisäksi vedettömissä olosuhteissa.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^1 on vety.

25 7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^2 on vety.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että n on 0 ja X on Y.

30 9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^2 on vety, n on 0 ja X on Y.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että n on 0, X on Y ja Y

on fenyyli, 4-fluorifenyyli, 2,4-difluorifenyyli, 4-nitro-fenyyli tai 4-metyylifenyyli.

11. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Ar on fenyyli; jolloin fenyyli-ryhmä on mahdollisesti mono-, di- tai trisubstituoitu, tai kyseisen yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri (4-fluorifenyyli)-karbamiinihapon kanssa.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri fenyylikarbamiinihapon kanssa.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 31,42-biskarbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 31,42-diesteri [4-(trifluorimetyyli)fenyyli]karbamiinihapon kanssa.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri [4-(trifluorimetyyli)fenyyli]karbamiinihapon kanssa.

16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 31,42-biskarbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 31,42-diesteri (4-nitro-fenyyli)karbamiinihapon kanssa.

17. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri (4-nitrofenyyli)-karbamiinihapon kanssa.

18. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 31,42-biskarbamy-

loitu rapamysiini on rapamysiinin 31,42-diesteri (4-metyylifenyyli)karbamiinihapon kanssa.

19. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri (4-metyylifenyyli)-karbamiinihapon kanssa.

20. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri (2,4-difluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa.

21. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 31,42-biskarbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 31,42-diesteri (2,4-difluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa.

22. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 31,42-biskarbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 31,42-diesteri fenyylikarbamiinihapon kanssa.

23. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 31,42-biskarbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 31,42-diesteri (4-fluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa.

24. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 31-karbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 31-esteri (2,4-difluorifenyyli)karbamiinihapon kanssa.

25. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri fenyyli-sulfonylikarbamiinihapon kanssa.

26. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistettu 31-karbamyloitu

rapamysiini on rapamysiinin 31-esteri fenyylisulfonyyli-karbamiinihapon kanssa.

27. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu
5 rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri (4-kloorifenyyli-
sulfonyyli)karbamiinihapon kanssa.

28. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että valmistettu 42-karbamyloitu
rapamysiini on rapamysiinin 42-esteri (3-metyylifenyyli-
10 sulfonyyli)karbamiinihapon kanssa.

29. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että silyylihalogenidi on tert-
butyylidimetyylisilyylikloridi.

30. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä,
15 t u n n e t t u siitä, että 42-O-silyyli-31-karbamyloitu
rapamysiini on rapamysiinin 42-tert-butyylidimetyylisilyy-
lieetteri-31-esteri fenyylisulfonyylikarbamiinihapon kans-
sa.

31. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että 42-O-silyyli-31-karbamyloitu
rapamysiini on rapamysiinin 42-tert-butyylidimetyylisilyy-
lieetteri-31-esteri (2,4-difluorifenyyli)karbamiinihapon
kanssa.