

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 922441 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 922441

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07H 17/04

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 27.05.1992

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 27.05.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 01.12.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

30.05.1991 US 707471

(71) Hakija - Sökande - Applicant

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

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Toda, Soichiro, Japan, JAPAN, (JP)

2 • Yamashita, Haruhiro, Japan, JAPAN, (JP)

3 • Naito, Takayuki, Japan, JAPAN, (JP)

4 • Nishiyama, Yuji, Japan, JAPAN, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Elsamisiini-A:n kemiallinen modifiointi 3'- ja/tai 4'-OH-ryhmissä

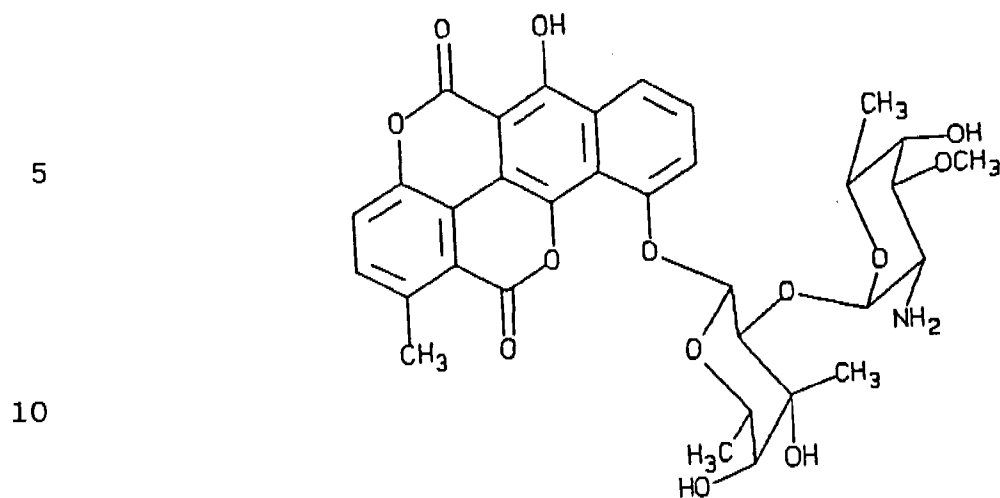
Kemisk modifiering av elsamicin A i 3'- och/eller 4'-OH-grupper

Elsamisiini-A:n kemiallinen modifiointi 3'- ja/tai 4'-OH-ryhmissä

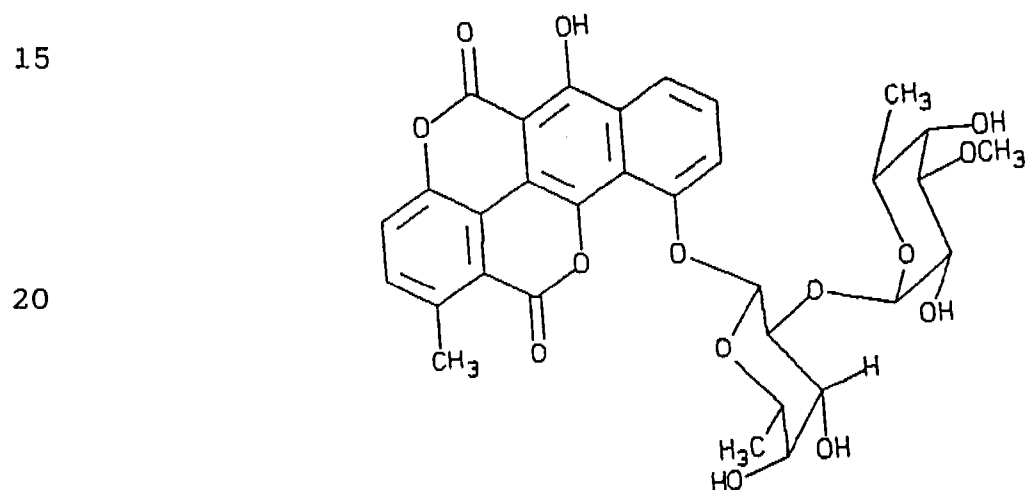
5 Tämä keksintö koskee uusia elsamisiini-A-johdannaisia, joilla on aiempaa parempaa kasvainvastaista aktiivisuutta, niiden valmistusta, niitä vaikuttavana ainesosana sisältäviä koostumuksia ja terapiamenetelmää, jossa käytetään mainittuja koostumuksia.

10 Elsamisiini-A on kasvainvastainen antibiootti, jota tuotetaan viljelemällä elsamisiini-A:ta tuottavaa Actinomyces-kantaa nimeltä kanta J907-21 (ATCC 39417) tai tämän mutanttia. Elsamisiini-A osoittaa bakteerivastaista aktiivisuutta aerobisia gram-positiivisia bakteereja sekä anaerobisia bakteereja vastaan. Se osoittaa samoin aktiivisuutta vastaan erilaisia hiirikasvainsoluja mukaan lukien leukemia-P388, imukudosleukemia-L1210 ja tummavärinen melanooma-B16 in vitro ja in vivo; Konishi et al., "Elsamicins, New Antitumor Antibiotics Related to Chartreusin. I. Production, Isolation, Characterization and Antitumor Activity" (suom. "Elsamisiinit, uusia kasvainvastaisia kartreusiinia muistuttavia antibiootteja. I. Tuotanto, eristys, karakterisointi ja kasvainvastainen aktiivisuus"), J. Antibiotics 39 (1986) 784 - 791; US-patenttijulkaisu 4 518 589 Konishille et al., joka julkaisiin 21. toukokuuta 1985.

25 Elsamisiini-A:n (kaava I, alla) rakenne on määritetty ja sen on osoitettu likeisesti muistuttavan kartreusiinia (kaava II, alla); Sugawara et al., "Elsamicins A and B, New Antitumor Antibiotics Related to Chartreusin. II. Structures of Elsamicins A and B" (suom. "Elsamisiinit A ja B, uusia kasvainvastaisia kartreusiinia muistuttavia antibiootteja. II. Elsamisiinien A ja B rakenteet"), J. Org. Chem. 52 (1987) 996 - 1001.



Kaava I



Kaava II

Sekä elsamisiini-A:ssa että kartreusiinissa on sama aglykoni, kartariini, mutta antibioottien disakkaridiosat ovat erilaiset; Leach et al., "Chartreusin, A New Antibiotic Produced by Streptomyces chartreusis, A New Species" (suom. "Kartreusiini, uusi antibiootti, jota tuottaa Streptomyces chartreusis, uusi laji"), J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 4011 - 4012; Beisler, J.A., "Chartreusin, A Glycosidic Antitumor Antibiotic for Streptomyces" (suom. "Kartreusiini, kasvainvastainen glykosidiantibiootti

Streptomycestä") kirjassa "In Progress in Medicinal Chemistry", toim. G.P. Ellis ja G.B. West, osa 19, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982, ss. 247 - 268; Simo-
 5 nitsch et al. "Ueber die Struktur des Chartreusins I" (suom. "Kartreusiinien rakenne I"), Helv. Chim. Acta 47 (1964) 1459 - 1475; Eisenhuth et al. "Ueber die Struktur des Chartreusins II" ("Kartreusiinien rakenne II"), Helv.-Chim. Acta 47 (1964) 1475 - 1484. Kummankaan yhdisteen
 10 muuttamisesta toiseksi yhdisteeksi kemiallisella menetelmällä ei ole koskaan raportoitu.

Kemiallisesti elsamisiini-A:ta modifioidessamme totesimme, että alkylideeniryhmän liittäminen 3'- ja 4'-OH-ryhmiin tai tetrahydropyranyyliryhmään 4'-OH-ryhmässä johti elsamisiini-A:n kasvainvastaisen aktiivisuuden ko-
 15 hoamiseen.

Esillä oleva keksintö antaa käyttöön uusia elsamisiini-A-johdannaisia, jotka osoittavat aiempaa parempaa kasvainvastaista aktiivisuutta. Tarkemmin ottaen esillä oleva keksintö kuvaa elsamisiini-A:n kemiallista modifiointia 3'- ja/tai 4'-OH-ryhmissä.
 20

Tämä keksintö antaa edelleen käyttöön kasvainvastaisen koostumuksen, joka käsittää vaikuttavana ainesosana ainakin yhden jäsenen ryhmästä, jonka muodostaa esillä olevan keksinnön mukainen elsamisiini-A-johdannainen.

25 Tämä keksintö antaa edelleen käyttöön menetelmän syöpäterapiaan, jossa käytetään edeltävää kasvainvastaista koostumusta.

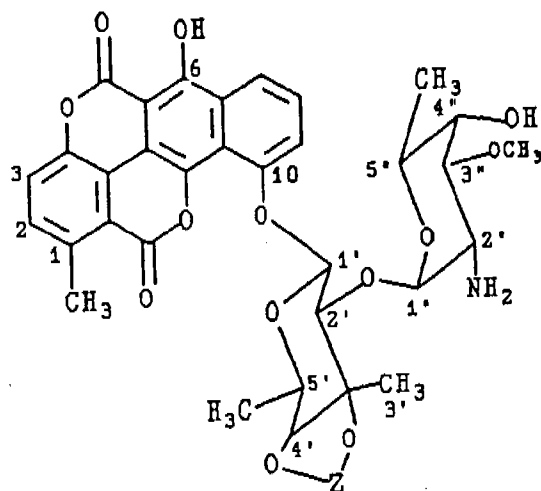
Edelleen annetaan käyttöön menetelmä edellä mainitun elsamisiini-A-johdannaisen tuottamiseksi.

30 US-patenttijulkaisussa nro 4 518 589, jonka patentin omistavat Konishi et al., julkistetaan elsamisiini-A:ksi (kaava I edellä) nimetyn kasvainvastaisen aineen tuotanto ja eristys. Edellä mainittu elsamisiini-A-yhdiste on pääasiallinen tuote fermentoitaessa elsamisiini-A:ta

tuottavaa Actinomycetes-kantaa nimeltä kanta J907-21 (ATCC 39417).

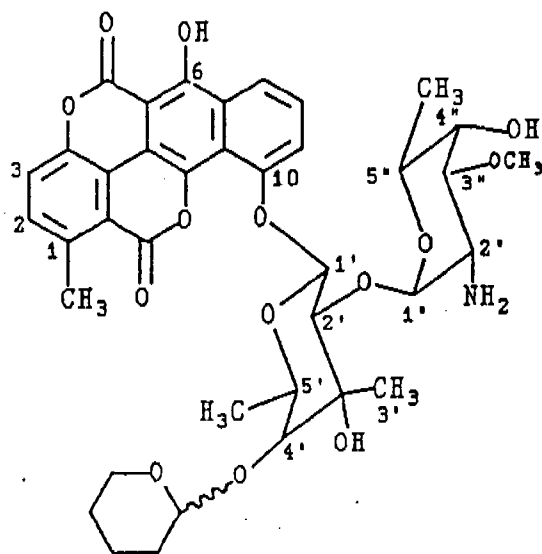
Nyt esillä olevan keksinnön mukaan on todettu, että elsamisiini-A:n 3'- ja/tai 4'-OH-ryhmien kemiallinen modifiointi johtaa uusiin johdannaisiin, joilla on aiempaa parempaa kasvainvastaista aktiivisuutta.

Esillä olevan keksinnön mukaisten elsamisiini-A-johdannaisten yleiset kaavat ovat seuraavat kaavat III ja IV:



Kaava III

jossa Z on alkylideeni, sykloalkylideeni, aryyli-alkylideeni tai alkoksialkylideeni.



Kaava IV

Kuten esitetään kaaviossa 1, elsamisiini-A:n (1) 3',4'-O-alkylidenaatio suoritettiin käsittelemällä 2"-N-suojattua elsamisiini-A:ta (3 tai 4) tarkoituksenmukaisen ketonin tai aldehydin dimetyyliasetaaaleilla happokataly-
 5 saattorien läsnä ollessa, jolloin saatiin välituotteet, 5 ja 7, minkä jälkeen suojaryhmät poistamalla saatiin 3',4'-O-alkylideenijohdannaiset (6a - 6d). Isopropylideeni (6a) ja bentsylideeni (6c) valmistettiin myös N-suojaamattomas-
 10 ta elsamisiini-A:sta. Kuten esitetään kaaviossa 2, yhdis- teen 1 reaktiossa dihydropyraanin kanssa happokatalysaat- torin läsnä ollessa saatiin seos per-tetrahydropyranyyli- (THP-) johdannaisia, jota seosta käsiteltiin p-tolueeni- sulfonihapolla (TsOH) metanolissa, jolloin saatiin mono-O- THP-johdannainen (8).

15 Massaspektrin nojalla yhdisteen 8 rakenne määri- tettiin 4'-O-THP-johdannaiseksi.

Taulukossa 1 on esitetty esillä olevan patenttiha- kemuksen mukaiset yhdisteet ja niitä vastaavat järjestys- numerot.

20

Taulukko 1

Esillä olevan keksinnön mukaiset yhdisteet ja niitä vastaavat järjestysnumerot

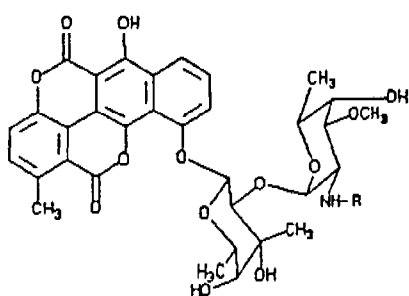
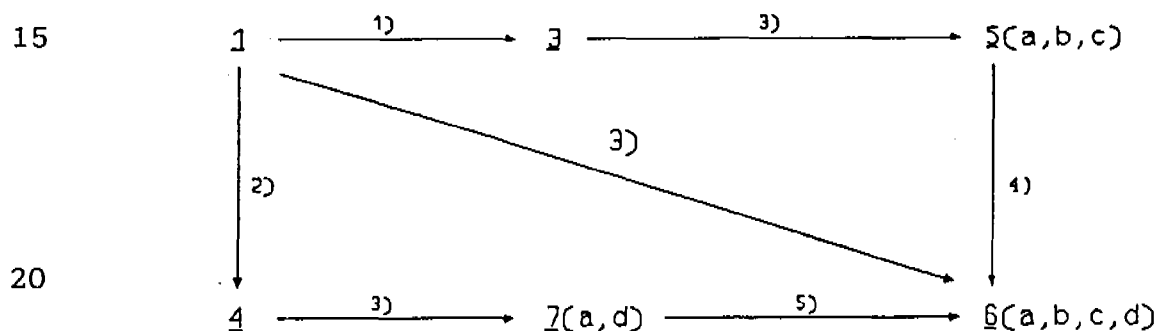
	Yhdiste nro	Nimi
	<u>1</u>	elsamisiini-A
25	<u>2</u>	kartreusiini
	<u>3</u>	2"-N-t-butoksikarbonyylielsamisiini-A
	<u>4</u>	2"-N-bentsyylioksikarbonyyli- elsamisiini-A
30	<u>5a</u>	2"-N-t-butoksikarbonyyli-3',4'-O- isopropylideenielsamisiini-A
	<u>5b</u>	2"-N-t-butoksikarbonyyli-3',4'-O- sykloheksylideenielsamisiini-A
	<u>5c</u>	3',4'-O-bentsylideeni-2"-N-t- butoksikarbonyylielsamisiini-A
35	<u>6a</u>	3',4'-O-isopropylideenielsamisiini-A

- 6b 3',4'-O-sykloheksylideenielsamisiini-A
6c 3',4'-O-bentsylideenielsamisiini-A
6d 3',4'-O-metoksimetylideeni-
 elsamisiini-A
 5 7a 2"-N-bentsyylioksikarbonyyli-3',4'-O-
 isopropylideenielsamisiini-A
7d 2"-N-bentsyylioksikarbonyyli-3',4'-O-
 metoksimetylideenielsamisiini-A
8 4'-O-tetrahydropyranyylielsamisiini-A

10

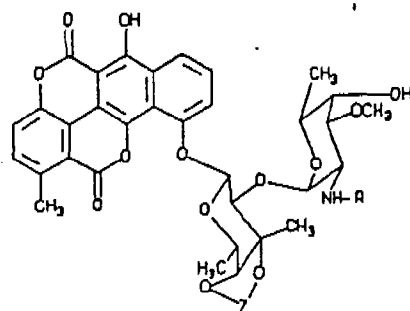
Kaavio 1

Synteesireitti elsamisiini-A:n 3',4'-O-alkylidee-
 nijohdannaisille



3 R = t-BOC

4 R = Cbz



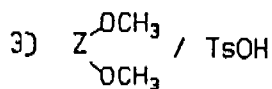
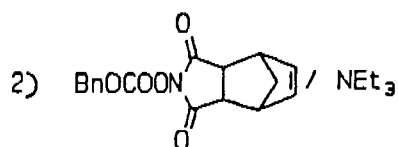
5 R = t-BOC

6 R = H

7 R = Cbz

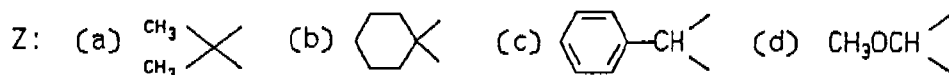
35

1) (t-BOC)₂O/NEt₃



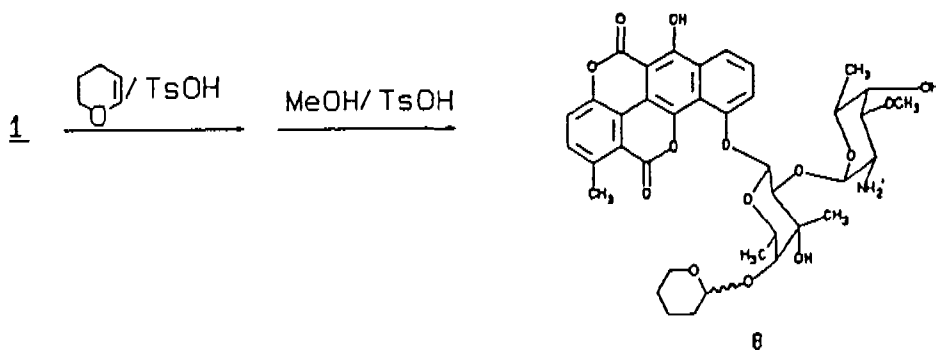
4) TsOH or TFA

5) H₂/Pd-C



Kaavio 2

4'-O-tetrahydropyranyylielsamisiini-A:n valmistus



3'- ja/tai 4'-O-modifioitujen elsamisiini-A-johdannaisten kasvainvastainen aktiivisuus

Viisi 3'- ja/tai 4'-O-modifioitua elsamisiini-A-johdannaista syntetisoitiin ja suoritettiin kasvainvastaisten aktiivisuuksien in vitro ja in vivo testaus kantayhdisteeseen verrattuna.

Sytotoksisuuskoetta in vitro silmällä pitäen hii-rimelanooma-B16-F10-soluja kasvatettiin ja ylläpidettiin

Eaglen minimivaatimuskasvualustassa (Nissui), joka sisältää kanamysiiniä (60 µg/ml), ja jota oli täydennetty lämmöllä inaktivoidulla vasikansikiöseerumilla (10 %) ja ei-välttämättömillä aminohapoilla (0,6 %), 37 °C:ssa kostutetussa ilmakehässä 5 % CO₂:ta käsittävässä inkubaattorissa. Eksponentiaalisesti kasvavat B16-F10-solut otettiin talteen, laskettiin ja lietettiin kasvualustaan pitoisuudeksi $2,0 \times 10^4$ solua/ml. Soluliete (180 µl) maljoitettiin 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn kuoppiin ja inkuboitiin 24 tunnin ajan. Testiyhdiste (20 µl) lisättiin kuoppiin ja levyjä inkuboitiin edelleen 72 tunnin ajan. Sytotoksinen aktiivisuus määritettiin kolorimetrisesti 540 nm:ssä, kun elävät solut oli ensin värjätty neutraalipunaliuoksella. Kaikki testatut 3'- ja/tai 4'-O-modifioidut elsamisiini-A-johdannaiset osoittivat varsin voimakasta sytotoksisuutta B16-F10-soluja vastaan IC₅₀-arvojen ollessa 0,025 - n. 0,07 µg/ml (taulukko 2).

Edeltävien 5 johdannaisen kasvainvastainen aktiivisuus in vivo testattiin imukudosleukemia-P388- ja melanooma-B16-systeemeissä. Naaraspuolisiin CDF₁- (P388:lle) ja urospuolisiin BDF₁- (B16:lle) hiiriin siirrostettiin i.p.-ruiskeella 10^6 P388-solua ja vastaavasti 0,5 ml 10-%:ista B16-puuroa hiirtä kohden (päivä 0). Testiyhdisteitä annettiin vatsaontelon sisäisesti hiirille kerran päivässä päivinä 1 - 3 (Q1Dx3) P388-systeemissä tai kerran päivässä päivinä 1, 5 ja 9 (Q4Dx3) B16-systeemissä ja eläimiä tarkkailtiin 45 päivän ajan.

Prosentuaalinen kasvu keskimääräisessä eloonjääntiajassa (MST) käsitellyillä eläimillä verrattuna ei-käsiteltyihin verrokkieläimiin määritettiin ja ilmaistiin T/C % -arvona. Yhdisteillä, joiden T/C % -arvot ovat 125 tai enemmän, katsotaan olevan merkittävää kasvainvastaista aktiivisuutta. Kuten esitetään taulukossa 2, edeltävistä 5 johdannaisesta 4'-O-tetrahydropyranyylielsamisiini-A (8) oli kiinnostavin yhdiste P388-systeemissä. Se osoitti 3

kertaa tehokkaampaa pienintä tehokasta annosta (MED) kun
elsamisiini-A ja sen T/C % -arvot olivat korkeat. 3',4'-O-
isopropylideenielsamisiini-A (6a), 3',4'-O-bentsylidee-
nielsamisiini-A (6c) ja 3',4'-O-metoksimetylideenielsami-
siini-A (6d) olivat yhtä aktiivisia kuin kantayhdisteet
5 MED-arvon osalta. B16-systeemissä kaikki testatut 5 joh-
dannaista osoittivat hyvää kasvainvastetta (taulukko 3).
Samoin kuin tuloksissa P388-systeemistä yhdiste 8 oli pa-
rempi kuin elsamisiini-A (1) MED- ja T/C % -arvojen osal-
10 ta. Joitakin eloonjääneitä tarkkailtiin päivänä 50 ryhmis-
sä, joita testattiin annoksella 3 - n. 20 mg/kg/päivä tätä
yhdistettä. Yhdisteelle 6d niinikään saatiin äärimmäisen
tehokas terapeuttiivinen aktiivisuus, jolloin T/C % -arvot
annoksilla 3 ja 10 mg/kg/päivä olivat korkeammat kuin el-
15 samisiini-A:lla (1).

Taulukko 2

Sytotoksisuus in vitro vastaan B16-melanoomaa ja kasvainvastainen aktiivisuus in vivo vastaan P388-leukemiaa hiirissä

Yhdiste	Z	Syto- toksisuus IC ₅₀ (µg/ml)	T/C %			MST ^{*1} :ssä		
			20 ^{*2}	10	3	1	0.3	0.1
6a		0.025			210	170	140	120
6b		0.04		165	175	140	120	
6c		0.07	Tox	180	165	150	130	110
6d		0.05	Tox	224	167	167	137	124
g		0.04	Tox	225	190	168	145	130
Elsamisiini-A (1)		0.03	Tox	190	180	155	140	123

*1 Keskimääräinen eloonjääntiaika päivissä

*2 Annos, mk/kg/päivä, Q1D x 3 i.p

Taulukko 3
Kasvainvastainen aktiivisuus in vivo vastaan B16-
melanoomaa hiirissä

5	Yhdiste	T/C %					MST*1: ssä	
		20*2	10	3	1	0.3	0.1	
	<u>6a</u>		82	192	166	116	105	
	<u>6b</u>		200	175	132	111		
	<u>6c</u>		186	179	136	114	121	
10	<u>6d</u>		≥333 (3/4)*3	283	167	137	120	
	<u>8</u>	≥370 (3/4)	≥330 (2/4)	≥281 (1/4)	248	159	133	
	<u>1</u>		≥298 (2/12)	≥216 (2/12)	179	139	116	

- 15 *1 Keskimääräinen eloonjääntiaika päivissä
 *2 Annos mg/kg/päivä, Q4D x 3 i.p.
 *3 Kpl eloonjääneitä/kpl testattuja päivänä 50

20 Esillä olevan keksinnön piiriin kuuluu menetelmä
 esillä olevan keksinnön mukaisten elsamisiini-A-johdan-
 naisten tuottamiseksi.

25 Keksinnön seuraavana näkökohtana annetaan käyttöön
 farmaseuttisia koostumuksia, jotka käsittävät tehokkaan
 kasvaimia inhiboivan määrän kaavan III tai IV mukaista
 yhdistettä yhdistettynä inerttiin farmaseuttisesti hyväk-
 syttävään kantajaan tai laimentimeen.

30 Keksinnön seuraavan näkökohdan mukaan annetaan
 käyttöön menetelmä kasvainta potevan eläin-, edullisesti
 nisäkäs-, isännän terapeuttiseksi hoitamiseksi, jonka me-
 netelmän mukaan tällaiselle isännälle annetaan tehokas
 kasvainta inhiboiva annos kaavan III tai IV mukaista an-
 tibioottiyhdistettä.

35 Esimerkkejä sopivista koostumuksista ovat kiinteät
 koostumukset suun kautta annettaviksi kuten tabletit,
 kapselit, pillerit, jauheet ja rakeet, nestemäiset koos-

tumukset suun kautta annettaviksi kuten liuokset, suspensiot, siirapit ja eliksiirit, sekä ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti annettavat valmisteet kuten steriilit liuokset, suspensiot tai emulsiot. Koostumukset voidaan

5 niinikään valmistaa steriilien kiinteiden koostumusten muotoon, jotka voidaan liuottaa välittömästi ennen käyttöä steriiliin veteen, fysiologiseen suolaliuokseen tai johonkin muuhun steriiliin väliaineeseen, jota voidaan antaa ruiskeena.

10 Huomattakoon, että esillä olevan keksinnön mukaisen elsamisiini-A-johdannaisen tosiasialliset edulliset annostukset vaihtelevat käytetyn nimenomaisen yhdisteen, koostetun nimenomaisen koostumuksen, käytettävän ja hoidettavan nimenomaisen kohdan, isännän ja sairauden mukaan. Alan

15 ammattilaiset ottavat huomioon monta lääkkeen vaikutusta modifioivaa tekijää, esim. ikä, ruumiinpaino, sukupuoli, ruokavalio, annon ajankohta, erityisnopeus, isännän kunto, lääkeyhdistelmät, reaktioherkkyydet ja sairauden vakavuus. Anto voidaan suorittaa jatkuvana tai ajoittaisena siedetyn

20 maksimiannoksen puitteissa. Alan ammattilaiset kykenevät vaikeuksitta varmistamaan optimaaliset käyttönopeudet tietyissä olosuhteissa käyttämällä tavanomaisia annostusmääritystestejä.

Esillä olevaa keksintöä havainnollistetaan seuraavilla esimerkeillä, joita ei ole tarkoitus mieltää keksinnön kattavuutta rajoittaviksi.

25

Välituotteiden 3 - 5c, 7a ja 7d spesifiset synteesiesimerkit selostetaan seuraavassa, jolloin näistä välituotteista syntetisoidaan tämän keksinnön mukaiset yhdisteet 6a - 6d ja 8 edeltävällä menetelmällä.

30

Esimerkki 1

2"-N-t-butoksikarbonyylielsamisiini-A:n (3) synteesi

Seosta, jossa oli elsamisiini-A:ta (653 mg, 1 mmol), di-t-butyylidikarbonaattia (348 mg, 1,6 mmol) ja

35

trietyyliamiinia (0,14 ml, 1 mmol) dioksaanissa (10 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseos haihdutettiin tyhjössä kuiviin, jolloin saatiin puoliki-
teinen jäännös, joka CH_2Cl_2 /eetteristä uudelleenkiteyttä-
mällä saatiin 768 mg (100 %) yhdistettä 3 kellertävänä
kiteisenä jauheena.

sp. 183 - 184 °C. IR $\nu_{\text{maks.}}$ (KBr) cm^{-1} 3410, 1700, 1505, 1370, 1255, 1120, 1065, 875, 780. UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH nm (eeta) 236 (38300), 266 (37800), 333 (6180), 380 (8770), 400 (14500), 423 (15900). ^1H -nmr (CDCl_3) delta 0,73 (9H, leveä s); 1,31 (3H, d, $J=7\text{Hz}$); 1,36 (3H, s); 1,39 (3H, d, $J=6\text{Hz}$); 2,68 (3H, s); 3,35 (3H, s); 5,37 (1H, d, $J=8,0\text{Hz}$); 4,66 (1H, d, $J=4\text{Hz}$); 8,18 (1H, kaksois-d, $J=8,0$ & 1,5Hz); 11,59 (1H, s).

Koostumusanalyysi: $\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{NO}_{15} \cdot \text{H}_2\text{O}$:lle laskettu C, 59,14; H, 5,88; N, 1,81; todettu C, 59,12; H, 6,06; N, 2,27.

Esimerkki 2

2"-N-bentsyylioksikarbonyylielsamisiini-A:n (4)
synteesi

Sekoitettuun lietteeseen, jossa oli elsamisiini-A:ta (653 mg), NEt_3 :ea (0,14 ml) dioksaanissa (10 ml), lisättiin N-bentsyylioksikarbonyylioksi-5-norborneeni-2,3-dikarboksimidä (334 mg). Reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen se haihdutettiin tyhjössä kuiviin. Jäännös liuotettiin CH_2Cl_2 :een ja liuos pestiin peräkkäin NaHCO_3 :en laimealla vesiliuoksella, vedellä ja NaCl :n kyllästetyllä vesiliuoksella, kuivattiin MgSO_4 :llä ja haihdutettiin alipaineessa kuiviin, jolloin saatiin keltainen massa. Jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelikolonnissa (Wakogel C-200, 21 x 80 mm) käyttäen eluenttina 2 % $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$:ea, jolloin saatiin 772 mg (98 %) otsikkoyhdistettä.

sp. 166 - 167 °C. IR $\nu_{\text{maks.}}$ (KBr) cm^{-1} 1730, 1695, 1510, 1380, 1260, 1240, 1150, 1070, 785. UV $\lambda_{\text{maks.}}$

(MeOH nm (eeta) 236 (38900), 266 (38500), 335 (6480), 381 (9190), 401 (15300), 423 (16600). ^1H -nmr (CDCl_3) delta 1,32 (3H, d, $J=6\text{Hz}$); 1,38 (3H, s); 2,74 (3H, s); 3,36 (3H, s); 5,39 (1H, d, $J=8\text{Hz}$); 5,74 (1H, d, $J=4\text{Hz}$); 8,08 (1H, kaksois-d, $J=8$ & $1,5\text{Hz}$); 11,41 (1H, s).

Koostumusanalyysi $\text{C}_{41}\text{H}_{41}\text{NO}_{15} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$:lle laskettu: C, 61,80; H, 5,31; N, 1,76; todettu C, 61,92; H, 5,14; N, 2,23.

Esimerkki 3

10 2"-N-t-butoksikarbonyyli-3',4'-O-isopropylideeni-elsamisiini-A:n (5a) synteesi

15 Liuokseen, jossa oli yhdistettä 3 (200 mg) ja 2,2-dimetoksipropania (1,2 ml) kuivassa CH_2Cl_2 :ssa (4 ml), lisättiin TsOH:ta (5 mg) ja seosta pidettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseokseen lisättiin NaHCO_3 :n kyllästettyä vesiliuosta ja orgaaninen faasi erotettiin, kuivattiin MgSO_4 :llä ja haihdutettiin tyhjiössä kuiviin, jolloin saatiin 190 mg (90 %) otsikkoyhdistettä keltaisena kiinteänä aineena.

20 sp. 168 - 169 °C. IR $\nu_{\text{maks.}}$ (KBr) cm^{-1} 3420, 1740, 1690, 1505, 1375, 1250, 1065, 780. UV $\lambda_{\text{maks.}}$

(MeOH nm (eeta) 236 (40600), 266 (39100), 333 (6370), 380 (8850), 399 (14200), 422 (15500). ^1H -nmr (CDCl_3) delta 1,34 (3H, d, $J=6\text{Hz}$); 1,37 (3H, d, $J=7\text{Hz}$); 1,37 (3H, s); 1,42 (3H, s); 1,68 (3H, s); 3,35 (3H, s); 5,23 (1H, d, $J=8\text{Hz}$); 5,8 (1H, d, $J=4\text{Hz}$); 8,33 (1H, kaksois-d, $J=8$ & $1,5\text{Hz}$); 11,63 (1H, leveä).

25 Koostumusanalyysi $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{NO}_{15} \cdot \text{H}_2\text{O}$:lle laskettu C, 60,66; H, 6,08; N, 1,73; todettu C, 60,92; H, 6,03; N, 2,00.

Esimerkki 4

30 2"-N-bentsyylioksikarbonyyli-3',4'-O-isopropylideeni-elsamisiini-A:n (7a) synteesi

35 Liuokseen, jossa oli yhdistettä 4 (507 mg) ja 2,2-dimetoksipropania (2,9 ml) kuivassa dikloorimetaanissa

(10 ml), lisättiin p-tolueenisulfonihappoa (10 mg) ja seosta pidettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktio-
seokseen lisättiin NaHCO_3 :n kyllästettyä vesiliuosta
(10 ml) ja orgaaninen faasi erotettiin, kuivattiin
5 MgSO_4 :llä ja haihdutettiin alipaineessa kuiviin. Jäännöstä
trituroitiin CH_2Cl_2 /eetteri/n-heksaani-seoksessa, jolloin
saatiin 540 mg (100 %) otsikkoyhdistettä.

sp. 160 - 162 °C. IR $\nu_{\text{maks.}}$ (KBr) 1730, 1690, 1500,
1375, 1250, 1140, 1065, 780. UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH nm (eeta))
10 236 (39100), 267 (37600), 333 (6440), 380 (9020), 400
(14400), 422 (15500). ^1H -nmr (CDCl_3) delta 1,28 (3H, d,
J=6Hz); 1,40 (3H, d, J=7Hz); 1,41 (3H, s); 1,47 (3H, s);
1,70 (3H, s); 2,88 (3H, s); 3,45 (3H, s); 5,28 (1H, d,
J=8Hz); 5,66 (1H, d, J=4Hz); 8,32 (1H, kaksois-d, J=8 &
15 2Hz); 11,53 (1H, leveä).

Koostumusanalyysi $\text{C}_{44}\text{H}_{45}\text{NO}_{15}$:lle laskettu C, 63,84;
H, 5,48; N, 1,69; todettu C, 63,59; H, 5,64; N, 1,63.

Esimerkki 5

3',4'-O-isopropylideenielsamisiini-A:n (6a) syn-
20 teesi

Menetelmä A

Liuosta, jossa oli yhdistettä 7a (67 mg) tetrahyd-
rofuraanin 80-%:isessä vesiliuoksessa (2,5 ml), hydrattiin
katalysaattorin 10 % Pd/C (30 mg) läsnä ollessa 1,5 tunnin
25 ajan. Reaktioseos suodatettiin katalysaattorin poistami-
seksi, minkä jälkeen se haihdutettiin kuiviin. Jäännöstä
puhdistettiin kolonnikromatografisesti käyttäen eluenttina
5 % MeOH/ CHCl_3 :ea, jolloin saatiin 47 mg (83 %) otsikkoyh-
distettä.

30 sp. 189 - 191 °C (haj.). IR $\nu_{\text{maks.}}$ (KBr) cm^{-1} 1710,
1610, 1370, 1250, 1070, 780. UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH nm (eeta))
236 (34500), 266 (29700), 332 (4980), 399 (10600), 420
(11300). ^1H -nmr (CDCl_3 + CD_3OD) delta 1,18 (3H, d, J=6Hz);
1,29 (3H, d, J=7Hz); 1,39 (3H, s); 1,46 (3H, s); 1,67 (3H,

s); 2,87 (3H, s); 3,52 (3H, s); 5,22 (1H, d, J=8Hz); 6,02 (1H, leveä).

Koostumusanalyysi $C_{36}H_{39}NO_{13} \cdot 3/2H_2O$:lle: laskettu
C, 59,99; H, 5,87; N, 1,94; todettu C, 60,09; H, 5,76;
5 N, 2,13.

ms (SIMS) m/z 695 (M + H)⁺, 360, 334, 160.

Menetelmä B

Liuosta, jossa oli yhdistettä 5a (238 mg) ja p-to-
luuenisulfonihappomonohydraattia (TsOH) (285 mg) asetonis-
10 sa (5 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 tunnin ajan,
minkä jälkeen se haihdutettiin tyhjössä kuiviin. Jäännös
liuotettiin metanolin ja kloroformin seokseen (1:10,
40 ml). Liuos pestiin peräkkäin $NaHCO_3$:n 10-%:isella vesi-
liuoksella, vedellä ja suolaliuoksella, ja kuivattiin
15 $MgSO_4$:llä sekä haihdutettiin tyhjössä kuiviin. Jäännöstä
puhdistettiin kolonnikromatografisesti silikageelissä,
jolloin saatiin 142 mg (68 %) otaikkoyhdistettä. sp. 189 -
191 °C. Yhdisteelle 6a tässä saadut spektri- ja HPLC-tie-
dot olivat täysin identtiset menetelmässä A saatuihin näh-
20 den.

Menetelmä C

Seosta, jossa oli yhdistettä 1 (262 mg), TsOH:ta
(80 mg) ja 2,2-dimetoksipropaania (1 ml) kuivassa
 CH_2Cl_2 :ssa (5 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 17
25 tunnin ajan. Reaktioseokseen lisättiin $NaHCO_3$:n kylläs-
tettua vesiliuosta ja orgaaninen faasi erotettiin, kui-
vattiin Na_2SO_4 :llä ja haihdutettiin kuiviin. Keltaista
jäännöstä eetterissä trituroimalla saatiin 280 mg (100 %)
yhdistettä 6a. sp. 189 - 191 °C. Yhdisteelle 6a tässä
30 saadut spektri- ja HPLC-tiedot olivat täysin identtiset
menetelmässä A saatuihin nähden.

Esimerkki 6

2"-N-t-butoksikarbonyyli-3',4'-O-sykloheksylideenielsamisiini-A:n (5b) synteesi

Liuosta, jossa oli yhdistettä 3 (151 mg), 1,1-dimetoksisykloheksaania (1,2 ml) ja vedetöntä p-tolueenisulfonihappoa (3 mg) kuivassa CH₂Cl₂:ssa (3 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 tunnin ajan. Reaktioseosta laimennettiin lisäämällä CH₂Cl₂:ta, se pestiin NaHCO₃:n kyllästetyllä vesiliuoksella, kuivattiin MgSO₄:llä ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin kiteinen jäännös, joka eetterillä pesemällä saatiin 165 mg (100 %) yhdistettä 5b.

sp. 173 - 175 °C. IR nu_{maks.} (KBr) cm⁻¹ 2910, 1730, 1710, 1680 (sh), 1500. UV lambda_{maks.} (MeOH nm (eeta) 236 (35300), 266 (34200), 333 (4660), 379 (7820), 399 (12500), 422 (13700). ¹H-nmr (CDCl₃) delta 0,69 (9H, s); 1,10 - 2,5 (19H, m); 2,90 (3H, s); 3,36 (3H, s); 5,22 (1H, d, J=8Hz); 5,83 (1H, d, J=4Hz); 11,69 (1H, s).

Koostumusanalyysi C₄₄H₅₁NO₁₅:lle laskettu: C, 63,38; H, 6,16; N, 1,68; todettu C, 64,38; H, 6,63; N, 1,60.

Esimerkki 7

3',4'-O-sykloheksylideenielsamisiini-A:n (6b) synteesi

Liuosta, jossa oli yhdistettä 5b (83,3 mg) ja TsOH:ta (95 mg) sykloheksanonissa (1,6 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseokseen lisättiin NaHCO₃:n 10-%:ista vesiliuosta (5 ml) ja CHCl₃:ea (10 ml), ja orgaaninen faasi erotettiin, pestiin suolaliuoksella (5 ml), kuivattiin MgSO₄:llä ja haihdutettiin tyhjiössä kuiviin. Raskasliikkeistä jäännöstä trituroitiin isopropyylieetterissä, minkä jälkeen se eroon suodattamalla saatiin 32 mg (44 %) yhdistettä 6b.

sp. 182 - 190 °C (haj.). IR nu_{maks.} (KBr) cm⁻¹ 3400, 1605, 1445, 1370, 1230, 1170, 1070. UV lambda_{maks.} (MeOH nm (eeta) 236 (33000), 266 (28900), 331 (5340), 399 (10100),

420 (10500). ^1H -nmr ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) delta 1,1 - 1,2 (19H, m); 2,87 (3H, s); 3,45 (3H, s); 5,23 (1H, d, $J=8\text{Hz}$); 5,94 (1H, d, $J=4\text{Hz}$).

Koostumusanalyysi $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{NO}_{13} \cdot \text{H}_2\text{O}$:lle: laskettu
 5 C, 62,31; H, 6,03; N, 1,86; todettu C, 62,23; H, 5,92; N, 1,83.

Esimerkki 8

3',4'-O-bentsylideeni-2"-N-t-butoksikarbonyyliel-samisiini-A:n (5c) synteesi

10 Liuokseen, jossa oli yhdistettä 3 (77 mg) ja bentsaldehydidimetyyliasetaalaa (0,5 ml) CH_2Cl_2 :ssa (2 ml), lisättiin TsOH:ta (5 mg) ja seosta pidettiin huoneenlämpötilassa 2 päivän ajan. Reaktioseokseen lisättiin
 15 NaHCO_3 :n kyllästettyä vesiliuosta (noin 10 ml) ja seosta uutettiin CHCl_3 :lla. Saatu uute pestiin vedellä, kuivattiin Na_2SO_4 :llä ja haihdutettiin tyhjössä kuiviin, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine, jota puhdistettiin silikagee-likolonnikromatografisesti käyttäen eluenttina MeOH:ta CHCl_3 :ssa (1 - 3 %), jolloin saatiin 70 mg (81 %) otsik-
 20 koyhdistettä.

sp. 168 - 170 °C. IR $\nu_{\text{maks.}}$ (KBr) cm^{-1} 1735 sh, 1695, 1505, 1375, 1255, 1235, 1145, 1070, 780. UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH nm (eeta) 235 (40600), 266 (39300), 332 (6410), 379 (8690), 399 (13900), 421 (15000). ^1H -nmr (CDCl_3) delta 0,71
 25 (9H, s); 1,35 (3H, d, $J=6\text{Hz}$); 1,58 (3H, s); 2,91 (3H, s); 3,40 (3H, s); 5,32 (1H, d, $J=8\text{Hz}$); 5,69 (1H, d, $J=4\text{Hz}$); 5,98 (1H, s).

Koostumusanalyysi $\text{C}_{45}\text{H}_{47}\text{NO}_{15} \cdot \text{H}_2\text{O}$:lle: laskettu
 30 C, 62,86; H, 5,74; N, 1,63; todettu C, 63,17; H, 5,42; N, 1,53.

Esimerkki 9

3',4'-O-bentsylideenielsamisiini-A:n (6c) synteesi

Menetelmä A

35 Yhdistettä 5c (60 mg) liuotettiin TFA:han (0,3 ml), ja seos haihdutettiin välittömästi tyhjössä kuiviin. Jään-

nös liuotettiin NaHCO_3 :n kyllästetyn vesiliuoksen ja CHCl_3 :n seokseen. Orgaaninen faasi erotettiin, pestiin vedellä ja haihdutettiin tyhjössä kuiviin. Keltaisella jäännöksellä suoritettiin kromatografia-ajo silikageelikolonnissa, jolloin saatiin 24 mg (45 %) yhdistettä 6c.

sp. 183 - 189 °C. IR $\nu_{\text{maks.}}$ (KBr) cm^{-1} 1710, 1610, 1510, 1375, 1250, 1235, 1070, 780. UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH nm (eeta) 236 (40700), 266 (34400), 331 (5890), 379 (8180), 398 (12200), 420 (13000). ^1H -nmr (CDCl_3 + CD_3OD) delta 0,82 (1,5H, d, J=6Hz); 1,22 (3H, d, J=6Hz); 1,36 (1,5H, d, J=6Hz); 1,58 (1,5H, s); 1,61 (1,5H, s); 2,92 (3H, s); 3,53 (3H, s); 5,29 (1H, d, J=8Hz); 5,95 (0,5H, s); 6,01 (0,5H, leveä); 6,11 (0,5H, leveä); 6,28 (0,5H, s).

ms (SIMS) m/z 742 (M + H)⁺, 408, 334, 160.

Menetelmä B

Seosta, jossa oli elsamisiini-A:ta (66 mg), bentsaldehydidimetyyliasetaaliala (185 mg) ja TsOH:ta (25 mg) CH_2Cl_2 :ssa (5 ml), pidettiin huoneenlämpötilassa 2 tunnin ajan. Reaktioseokseen lisättiin NaHCO_3 :n kyllästettyä vesiliuosta (noin 10 ml) ja CH_2Cl_2 :ta (10 ml). Orgaaninen faasi erotettiin ja haihdutettiin alipaineessa kuiviin, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine, jota puhdistettiin silikageelikolonnikromatografisesti käyttäen eluenttina MeOH:ta CHCl_3 :ssa, jolloin saatiin 45 mg (60 %) yhdistettä 6c. Tässä yhdisteelle 6c saatuja HPLC- ja spektritietoja ei pystytty erottamaan menetelmässä A saaduista.

Esimerkki 10

2"-N-bentsyylioksikarbonyyli-3',4'-O-metoksimetylidenielsamisiini-A:n (7d) synteesi

Liuosta, jossa oli yhdistettä 4 (62 mg), orto-muuraishappotrimetyyliesteriä (0,2 ml) ja p-tolueenisulfoonihappoa (5 mg) CH_2Cl_2 :ssa (3 ml), sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2 tunnin ajan, minkä jälkeen reaktioseosta laimennettiin lisäämällä CH_2Cl_2 :ta (10 ml), se pestiin NaHCO_3 :n kyllästetyllä vesiliuoksella, kuivattiin

Na₂SO₄:llä ja haihdutettiin tyhjöissä kuiviin, jolloin saatiin 65 mg (100 %) yhdistettä 7d.

sp. 139 - 141 °C. IR nu_{maks.} (KBr) cm⁻¹ 3400, 1725, 1510, 1375, 1255, 1240, 1070. UV lambda_{maks.} (MeOH nm (eeta)) 236 (35700), 267 (34000), 333 (5800), 380 (8090), 399 (13000), 422 (13900). ¹H-nmr (CDCl₃ + D₂O) delta 1,32 (3H, d, J=6Hz); 1,39 (3H, d, J=6,5Hz); 1,56 (3H, s); 2,88 (3H, s); 3,92 (3H, s); 3,96 (3H, s); 6,25 (1H, d, J=8Hz); 5,65 (1H, d, J=4Hz); 5,93 (2H, s).

10 Esimerkki 11

3',4'-O-metoksimetylideenielsamisiini-A:n (6d) synteesi

15 Liuosta, jossa oli yhdistettä 7d (57 mg) tetrahydrofuraanin 75-%:isessä vesiliuoksessa (4 ml), hydrattiin katalysaattorin 10 % Pd/C (30 mg) läsnä ollessa 1,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Reaktioseos suodatettiin eroon ja suodos haihdutettiin kuiviin. Jäännöstä puhdistettiin kolonnikromatografisesti silikageelissä, jolloin saatiin 35,5 mg (73 %) yhdistettä 6d.

20 sp. 209 - 211 °C (haj). IR nu_{maks.} (KBr) cm⁻¹ 3400, 1720, 1680, 1375, 1255, 1205, 1120, 1075. UV lambda_{maks.} (MeOH nm (eeta)) 236 (33900), 266 (30800), 331 (5200), 398 (10800), 419 (11200). ¹H-nmr (CDCl₃ + CD₃OD) delta 1,0 - 1,4 (6H, m); 1,57 (3H, s); 2,62 (3H, s); 3,38 (3H, s); 3,50 (3H, s); 5,44 (1H, d, J=8Hz); 5,87 (2H, m).

ms (SIMS) m/z 697 (M + 2H)⁺, 363, 334, 202, 160.

Esimerkki 12

4'-O-tetrahydropyranyylielsamisiini-A:n (8) synteesi

30 Liuos, jossa oli elsamisiini-A:ta (110 mg) ja dihydropyraania (0,5 ml) dimetyyliformamidissa (5 ml), tehtiin happamaksi lisäämällä pieni mooliekvivalenttiylimäärä TsOH:ta, minkä jälkeen sitä pidettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseokseen lisättiin NaHCO₃:n kyllästettyä vesiliuosta (20 ml) ja seos panostettiin Diaion HP-20 (n.

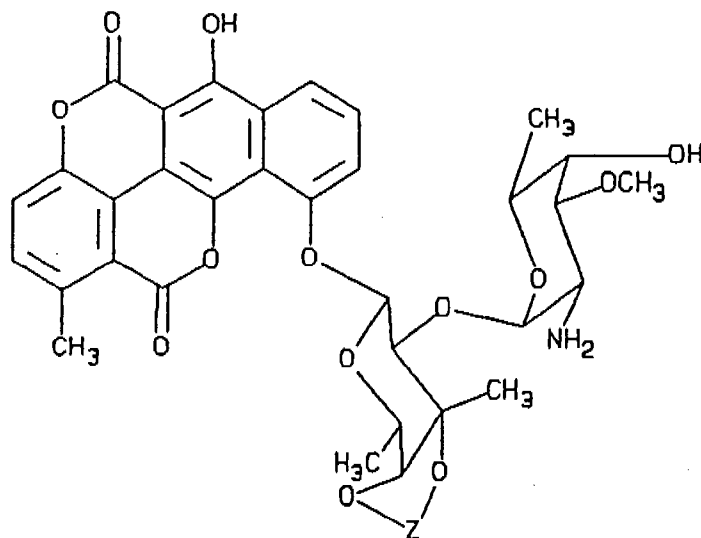
100 ml) -kolonniin. Kolonni pestiin vedellä, minkä jälkeen sitä eluoitiin CH_3CN :n vesiliuoksella. Eluaatin kellertävät fraktiot yhdistettiin pooliksi ja haihdutettiin tyhjössä kuiviin, jolloin saatiin keltainen amorfinen kiinteä aine, joka liuotettiin 0,05 N TsOH-liuokseen MeOH:ssa (5 ml). Tunnin kuluttua NaHCO_3 :ea lisättiin reaktioseokseen ja seos suodatettiin. Suodos haihdutettiin kuiviin ja jäännöstä puhdistettiin preparatiivisella TLC:llä, jolloin saatiin 16 mg (13 %) otsikkoyhdistettä.

10 sp. 202 - 205 °C. IR $\nu_{\text{maks.}}$ (KBr) cm^{-1} 1695, 1610, 1375, 1255, 1075, 780. UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH nm (eeta) 236 (34000), 266 (29500), 333 (5250), 379 (6850), 399 (10500), 421 (11300). ^1H -nmr (CDCl_3 + CD_3OD) delta 1,44 (3H, s); 2,73 (3H, s); 3,48 (2H, s); 5,62 (1H, d, $J=8\text{Hz}$); 5,93 (1H, d, $J=4\text{Hz}$).

15 ms (SIMS) m/z 738 ($M + H$) $^+$, 404, 334, 160, 85.

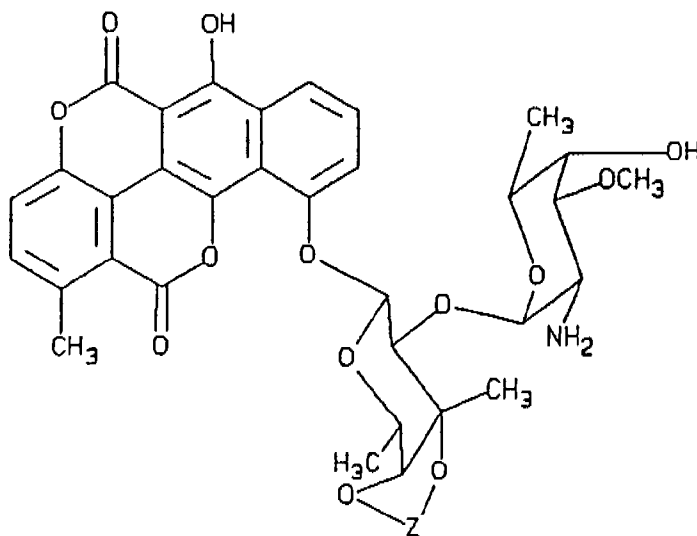
Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jonka kaava on:



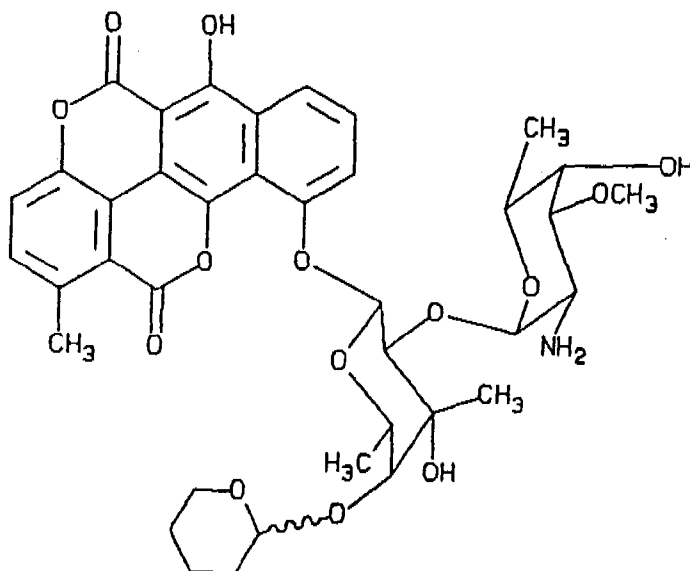
jossa Z on alkylideeni, sykloalkylideeni, aryyli-alkylideeni tai alkoksialkylideeni, joka menetelmä on tunnettu siitä, että 2"-N-suojattua elsamisiini-A:ta käsitellään dimetyyliasetaeilla happokatalysaattorin läsnä ollessa, minkä jälkeen suojaryhmä/-t poistetaan.

2. Menetelmä yhdisteiden valmistamiseksi, joiden kaava on:



joka menetelmä on tunnettu siitä, että elsamisiini-A:ta käsitellään dimetyyliasetaeilla happokatalyysaattorin läsnä ollessa.

3. Menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jonka kaava on:



joka menetelmä on tunnettu siitä, että elsamisiini-A:ta käsitellään dihydropyraanilla happokatalyysaattorin läsnä ollessa, minkä jälkeen käsitellään p-tolueenisulfonihapolla metanolissa.

4. Yhdiste, joka on valmistettu jommankumman patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisella menetelmällä, tunnettu siitä, että se on

3',4'-O-isopropylideenielsamisiini-A;

3',4'-O-sykloheksylideenielsamisiini-A;

3',4'-O-bentsylideenielsamisiini-A; tai

3',4'-O-metoksimetyylideenielsamisiini-A.