



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen



F10000952688

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

95268

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 01 1996

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 07H 11/04 // C 07F 9/24

(21) Patentihakemus - Patentansökning	903123
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	20.06.90
(24) Alkuperäisyys - Löpdrag	19.10.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	20.06.90
(44) Nähtävöskipsanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.09.95
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/EP89/01251
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
20.10.88 DE 3835772 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, Im Neuenheimer Feld 280,
6900 Heidelberg, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Wiessler, Manfred, Konstanzer Strasse 21, 6900 Heidelberg, Germany, (DE)
2. Dickes, Michael, Keltenweg 15, 6901 Dossenheim, Germany, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Ruska & Co Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä glykokonjugaattien valmistamiseksi
Förfarande för framställning av glykokonjugat

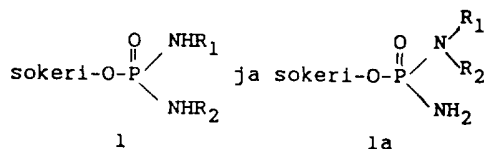
(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DD C 122386 (C 07H 17/00),
(A) Chemical Abstracts, vol. 69 (1968), 77679k: Zh. Obshch. Khim. 1968, 38(6), 1340-4,
(B) Chemical Abstracts, vol. 81 (1974), 25895f: Zh. Obshch. Khim. 1974, 44(4), 896-9

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

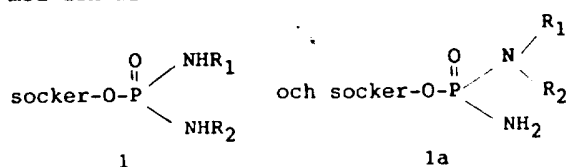
Keksinnön kohteena on menetelmä fosforiamidi-
dien yleisten kaavojen

Edelleen keksintö koskee D-glukopyranosyy-
li-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodi-
amideja ja yhdisteiden käyttöä antituumori-
aineina.



mukaisten glykokonjugaattien valmistamiseksi, jolloin sokerin liittäminen tapahtuu fosforiamidi-hukkafunktion tai vast. ifosfamidihukkafunktion kanssa, etenkin 1-asemassa ja R₁ ja R₂ voivat olla samanlaisia tai erilaisia ja ne voivat merkitä vetyä, alempi-C₁-C₄-alkyyliä tai C₁-C₆-halogeenialkyyliä, ja sokereina voivat esiintyä mono-, di- tai polysakkaridit kaikissa olemassa olevissa isomeerisissä tai enantiomeerisissä muodoissa, jossa menetelmässä suojatut bromisokerit konjugoidaan sinänsä tunnetulla tavalla vastaavien fosforiyhdisteiden kanssa ja vapautetaan suojaryhmistä.

Uppfinningen avser ett förfarande för tillverkning av glykokonjugat av fosforamider med den allmänna formeln



varvid anslutningen av sockret sker med fosforamid-överloppsfunktionen eller resp. ifosfamid-överloppsfunktionen, speciellt i läget 1, och R_1 och R_2 kan vara likadana eller olika och kan avse vete, en lägre- C_1 - C_4 -alkyl eller en C_1 - C_6 -halogenalkyl, och som socker kan förekomma mono-, di- eller polysackarider i alla befintliga isomera eller enantiomera former, vid vilket förfarande skyddade bromsocker konjugeras på ett i och för sig känt sätt med motsvarande fosforföreningar och befrias från skyddsgrupperna. Vidare avser uppfinningen D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrdiamider och användningen av föreningarna som antitumörämnen.

Menetelmä glykokonjugaattien valmistamiseksi

Syöpäsairaudet ovat Saksan Liittotasavallassa toisella sijalla kuolleisuustilastoissa sydän-verisuonitautien jälkeen. Syöpäsairauksien nykyisiin terapioihin kuuluvat leikkauksen ja sädehoidon lisäksi myös antineoplastinen kemoterapia.

Huolimatta erinomaisesta leikkaustekniikasta, parantuneesta sädehoidosta ja useista uusista kemoterapeuttisista aineista pahanlaatuistan tuumoreiden parantumismäärää ei olla kuitenkaan lisäämään viime vuosina, vaikkakin yksittäisissä tuumorilajeissa, kuten esim. Hodgkinin taudissa on saatu aikaan erittäin hyviä tuloksia.

On siis edelleen olemassa tarve mahdollistaa myös kemoterapiassa perustavanluonteisia parannuksia, jotka perustuvat jatkuvasti kasvaviin tietoihin tuumorisolun biokemiasta.

Päämääränä antineoplastisesti vaikuttavien kemoterapeuttisten aineiden uuskehittelyssä on selektiivisyyden parantaminen ja siten ei-toivottujen sivuvaikutuksien vähentäminen.

Tosin tunnetaan tällä välin useita biokemiallisia eroja tuumorisolun ja normaalin solun välillä, mutta nämä erot eivät ole kuitenkaan kovin merkittäviä.

Useilla nykyisin käytetyillä aineilla on tästä syystä jo määrätty selektiivisyys ja siten käyttökelpoinen terapeuttinen indeksi, mutta absoluuttinen selektiivisyys on kuitenkin vielä hyvin kaukana.

Eräs mahdollisuus tämän päämäärän saavuttamiseksi on "pro-drug"-tuotteiden, s.o. lääkeaineiden käyttö, jotka aktivoituvat erityisesti kohdesolussa tai jotka detoksikoituvat

(muuttuvat myrkyttömiksi) erittäin voimakkaasti ei-kohdesoluissa. Erään toisen yrityksen mukaisesti pyritään lääkeaine kuljettamaan kohdesoluun tai ainakin rikastamaan se siellä ("drug targeting").

Useat "drug targeting"-konseptit perustuvat lääkeaineen spesifiseen sitoutumiseen kohdesolussa tai ei-kohdesolun ja kohdesolun välisiin erilaisiin vastaanottomekanismeihin. Tällöin voidaan käyttää hyväksi myös kvantitatiivisia eroja.

Siten on mahdollista valmistaa esim. hybridisointitekniikan avulla (Köhler ja Milstein, 1975, Nature 256, 495) valmistaa määrätietoisesti monoklonaalisia vasta-aineita (MAB) ja tunnistaa niiden avulla tuumori-assosioituneet antigeenit (TAA).

Valmistettavat glykosidiesterit voidaan valmistaa sinänsä tunnettujen menetelmien mukaisesti, etenkin edelleenkehitetyn Koenigs-Knorr-reaktion tai imidaatti-menetelmän avulla.

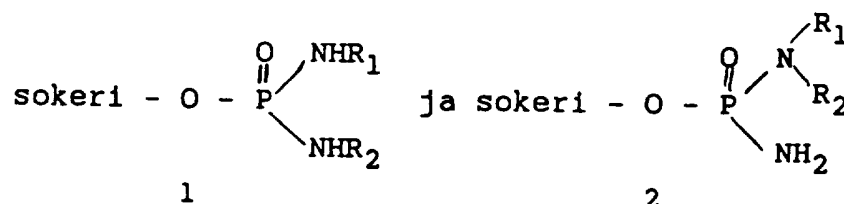
Yhteenveto näistä menetelmistä sekä stereoselektiivisistä glykosyloinnista, joita varten on nykyisin käytössä liitännän halutun stereokemian mukaisesti kolme perustavanluonteista menetelmää, on esitetty etenkin julkaisussa Paulsen, 1984, Chem. Soc. Rev. 13, 15.

On kuitenkin tunnettua, että huolimatta useista käytössä olevista glykosylointimenetelmistä kuitenkin jokaista haluttua liitännää ei voida muodostaa stereoselektiivisesti riittävinä saantoina. Jokainen glykosyylisiirto muodostaa oman ongelmansa ja useinkaan ei ole olemassa yleispäteviä reaktio-olosuhteita (Schmidt 1986, Angew. Chem. 98, 213).

Siten keksinnön kohteena ovat määrättyjen tehokkaasti vaikuttavien antituumoriaineiden glykokonjugaatit, joita voidaan käyttää antineoplastisina aineina säilyttämällä pitkäl-

ti niiden aktiivisuus, mutta vähentämällä kuitenkin voimakkaasti niiden toksisuutta. Keksintö on täsmällisesti määritelty patenttivaatimuksessa.

Tyypillisinä esimerkkeinä muodostettiin esitetyllä tavalla seuraavien yleisten kaavojen mukaiset konjugaatit.



jolloin sokerin liitântä tapahtuu fosforiamidi-hukkafunktion kanssa, etenkin 1-asemassa. Tärkeimpinä sokereina mainittakoon: galaktoosi, mannoosi, glukoosi, mannaani, galaktaani, glukaani sekä myös haarautuneet sokerit, etenkin 3- ja 6-asemassa, jolloin periaatteessa voidaan kuitenkin käyttää kaikkia sokereita, siis mono-, di- tai polysakkarideja kaikissa olemassa olevissa isomeerisissä ja enantiomeerisissä muodoissa.

R_1 ja R_2 voivat olla samanlaisia tai erilaisia ja niillä on seuraavat merkitykset: vety, alempi- C_1 - C_4 -alkyyli, C_1 - C_6 -halogeenialkyyli, etenkin C_1 - C_4 -halogeenialkyyli ja etenkin C_2 -halogeenialkyyli. Ainakin yksi substituentaista R_1 ja R_2 on C_1 - C_6 -halogeenialkyyli.

Suojaryhminä voidaan käyttää kaikkia OH-funktioille yleisesti tavanomaisia suojaryhmiä, esim. bentsyyli-, asetyyli-, trityyliryhmiä, ja lohkaus tapahtuu samoin sinänsä tunnetulla tavalla entsyymaattisesti, hydraamalla, happamasti tai alkalisesti.

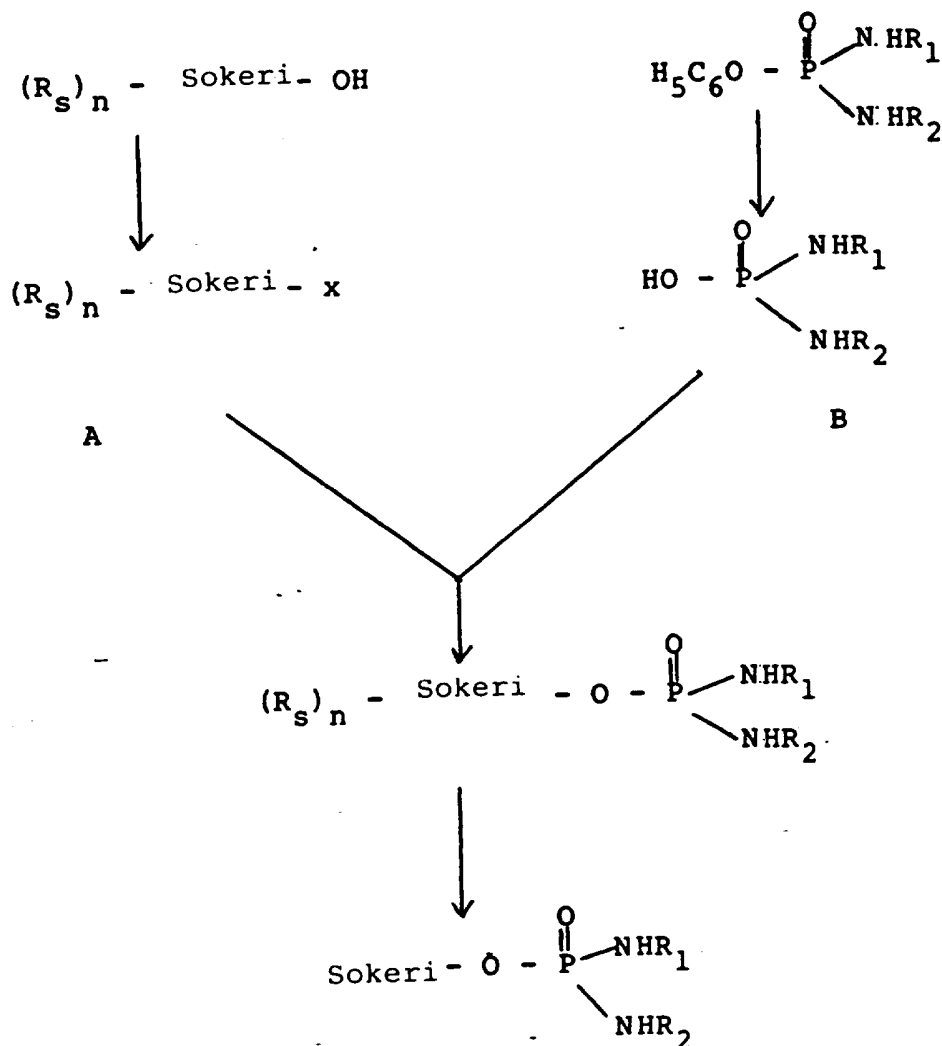
Aivan yleisesti keksinnön mukaisesti etsityt ja käytetyt glykosyyllisesti kytketyt fosfamidi-mustard ja ifosfamidi-mustard voidaan muodostaa seuraavasti:

Kytkevät yksiköt, fosforiyhdisteet voidaan valmistaa Lorenzin ja Wiesslerin julkaisussa Arch. Pharm. 318, 577, 1985 esittämän työtavan mukaisesti.

Nämä molemmat yhdisteet voidaan saada kulloinkin suojattujen bromisakkaridien kanssa yhdisteen 28 β , glukoosi- β -IPM:n tai vast. disakkaridiyhdisteen 50 ja 51 esimerkissä oheisten kuvien 1 ja 2 mukaisesti esitetyllä työtavalla.

Suojattu sokeri A saatetaan reagoimaan fosforihappoyhdisteen B kanssa siten, että molempien annetaan vaikuttaa toisiinsa liuottimessa, etenkin polaarissa liuottimessa, esim. asetonitrilissä, CH_2Cl_2 :ssa tai tolueenissa 20 - 120°C:ssa 1 - 48 tunnin ajan lisäämällä apuainetta, esim. Et_3N :ää, $\text{Et}(\text{i-prop})_2\text{N}$:ää. Yleinen menetelmän ohje voidaan esittää seuraavalla kaavakaaviolla.

...



Reaktio ifosfamidin kanssa tapahtui vastaavalla tavalla. R_s = suojaryhmä, esim. bentsyyli, x = reaktiivinen ryhmä, esim. bromi.

Lähdettäessä glukoosin, galaktoosin ja mannoosin 1-O-metyylipyranosideista voidaan valmistaa vastaavat 2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-alfa-D-glukopyranosyylibromidit kuvion 1 mukaisesti.

Bentsylointi tapahtuu sinänsä tunnetulla tavalla, esim. dioksaanissa bentsyylikloridilla KOH:n läsnäollessa metyyli-

alfa-D-gluko- tai vast. -galaktopyranosidin suhteen, kun taas metyyli-alfa-D-mannopyranosidi saatetaan reagoimaan esim. bentsyylikloridin ja NaH:n seoksessa. Bentsyloidut metyyliglykosidit 10, 11 ja 12 hydrolysoidaan tämän jälkeen esim. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HOAc}$:llä yhdisteeksi 13 tai vast. HCl/HOAc :llä yhdisteiksi 14 ja 15. Yhdiste 13 ja isomeerinen mannoosi 15 voidaan muodostaa sitten esim. p-nitrobentsyylikloridilla dikloorimetaani/pyridiinissä vastaaviksi 2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-1-O-p-nitrobentsyyli-D-glukopyranooseiksi 16 ja 18, jotka molemmat voidaan puhdistaa sopivasti kiteyttämällä uudelleen. Koska tämä ei ole niin hyvin mahdollista 2,3,4,6-tetra-O-bentsyyligalaktoosin p-nitrobentsoaatin kohdalla, pidetään tällöin parempana derivointia fenyyli-isosyanaatilla pyridiinissä kiteytyväksi 2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-1-O-(N-fenyyli-karbamoyyli)-D-galaktopyranoosiksi 17 (Kronzer ja Schuerch, 1974, Carboh. Res. 33, 273).

Bentsyyli-suojatut alfa-bromihalogenoosit 19, 20 ja 21 muodostetaan esim. käsittelemällä HBr :llä CH_2Cl_2 :ssa ja tavanomaisten loppuvaiheiden suorittamisen, nimittäin p-nitrosobentsoehapon tai vast. aniliniumbromidin poissuodattamisen ja ylimääräisen HBr :n poistamisen jälkeen ne käytetään taroituksenmukaisesti suoraan ilman lisäpuhdistusta seuraavissa glykosylointireaktioissa.

Bentsyyli-suojatuissa glykosyyli-donoreissa ei ole substituenttia C2-atomissa, jolla voisi olla ohjaava vaikutus glykosylointiin. Bentsyyli-suojaryhmillä varustettujen bromattujen sokereiden reaktio fosforiamidin tai vast. ifosfamidin kanssa tapahtui dikloorimetaani/trietyyliamiinissa. Yhdisteiden 16, 17 ja 18 - 22, 23 ja 24 reaktion saanto on esitetty taulukossa 1 samoin kuin anomeerisuhde ja eluointiaine SC:ssä. erotus onnistuu esim. pylväskromatografialla.

Taulukko 1

	Saanto (%)	$\alpha:\beta$	EE:PE
<u>22</u>	68	56:44	60:40
<u>23</u>	65	50:50	60:40
<u>24</u>	47	55:45	80:20

HPLC-analyysissä on havaittavissa retentioaikojen hyvin suuri konsentraatioriippuvaisuus samoin kuin konjugaattien voimakas tailing (hännänmuodostus). Rakenteen ja stereokemian varmistus tapahtui ^1H - ja ^{13}C -NMR-spektroskopiolla.

Suurempien määrien valmistamiseksi käytettiin työtapaa, jossa stereoselektiivisen synteessin avulla muodostuu edullisesti toinen anomeeri ja siten voidaan luopua HPLC-puhdistuksesta.

Julkaisun Schmidt 1986, Angew. Chem. 98, 213 mukaisesti bentsyyli-suojattuja O-glykosyyli-triklooriasetimidaatteja voidaan käyttää stereoselektiivisten synteessien glykosyyli-donoreina. Triklooriasetimidaattien synteesi tapahtui kirjallisuudessa esitettyjen menetelmien mukaisesti lähtemällä tetra-O-bentsyyli-glukooseista 13, 14 ja 15.

Käyttämällä kaliumkarbonaattia emäksenä kineettisesti ohjatussa reaktiossa yhdisteestä 13 saadaan β -imidaatti 25 β , NaH:lla saadaan nopea anomerisointi termodynaamisesti stabiilimmaksi yhdisteeksi 25 α . Vastaavasti saadaan yhdisteestä 14 galaktosyyli-imidaatti 26 α , yhdisteestä 15 mannosyyli-imidaatti 27 α . Näillä imidaateilla on bromi-aktivoituihin bentsyyli-glukooseihin verrattuna suurempi stabiilisuus. Ne voidaan eristää hyvin ja ne ovat varastointikelpoisia.

Siten imidaatit saatettiin reagoimaan erilaisissa reaktioolosuhteissa IMP 4b:n kanssa. Liuottimina käytettiin esim.

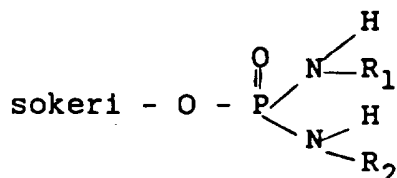
dikloorimetaania tai asetonitriiliä, katalysaattoreina esim. BF_3 ·dietyylieetteriä tai HCl :ää dikloorimetaanissa.

Reaktio tapahtui nopeammin CH_3CN :ssä kuin CH_2Cl_2 :ssa. Mannosyyli-imidaatti 27a reagoi 4b:n kanssa selektiivisesti mannosidi 24a:ksi.

Suojatut glykosidit voidaan vapauttaa esim. hydraamalla katalyyttisesti Pd/aktiivihilellä huoneen lämpötilassa. Hydrauksen kulkua voidaan valvoa DC:llä. Osoitus voi tapahtua metanolisella rikkihapolla, mutta osoitus 4-(p-nitrobentsyyli)-pyridiini-reagenssilla (NBP) on herkempi.

Reaktion päätyttyä katalysaattori suodatetaan pois, suodos kiertohaihdutetaan ja kuivatetaan suurtyhjössä. Käytettäessä anomeeripuhdaita glykosideja 22, 23 ja 24 saatiin vastaavat glykosidit 28, 29 ja 30 samoin anomeeripuhdaita (kuv. 2).

Vastaavat fosforiamidi-konjugaatit sekä kaavan



mukaisten johdannaisten konjugaatit voidaan valmistaa vastaavalla tavalla.

Kirkkaina, värittöminä, erittäin viskooseina öljyinä saatavien tuotteiden puhdistus ei ole tarpeen. Jos hydrauksessa kuitenkin muodostuisi sivutuotteita, nämä voidaan erottaa lyhyellä SC :llä piihappogeelissä (asetonitriili/metanoli-seokset).

HPLC-analyysi mahdollistaa anomeerisuhteiden selvittämisen glukosidin 28 ja mannosidin 30 kohdalla.

Taulukko 2: Triklooriasetimidaattien reaktio IPM:n kanssa

Edukti	Liuotin	Reaktio- olosuhteet	Tuote	Saanto	$\alpha:\beta$
<u>25α</u>	CH ₂ Cl ₂	HL, 1 pv.	<u>22</u>	-	
		HL, 6 tuntia		56 %	1:6
	CH ₃ CN	HL, 1 pv.		vähäinen	
		HL, 6 tuntia		42 %	1:20
<u>25β</u>	CH ₂ Cl ₂	HL, 4 tuntia		51 %	2:3
	CH ₃ CN	HL, 6 tuntia		45 %	1:1,1
<u>26α</u>	CH ₂ Cl ₂	HL, 4 tuntia	<u>23</u>	-	
		HL, 8 tuntia		48 %	2:5
	CH ₃ CN	HL, 6 tuntia		42 %	1:3
<u>27α</u>	CH ₂ Cl ₂	HL, 4 tuntia	<u>24</u>	-	
		HL, 4 tuntia		48 %	
	CH ₃ CN	HL, 6 tuntia		47 %	vain α

HL = huoneen lämpötila

Yhdisteiden identiteettiä voitiin varmistaa FAB-MS- ja ¹H-NMR-spektroskopiolla. Sokeritähteiden konfiguraatio vahvistettiin tämän lisäksi entsymaattisilla reaktioilla. Esimerkkinä kuviossa 3 on esitetty Glc- β -IPM 28 β :n FAB-spektri (negatiivinen).

Käyttämällä glyserolia matriisinä sekä negatiiviset että positiiviset FAB-spektrit tuottivat olennaista informaatiota. Kaikista 6 yhdisteestä olivat nähtävissä negatiivisten molekyyli- $(M-H)^-$ tai vast. positiivisten molekyyli-

piikki-ionien $(M+H)^+$ signaalit. Kulloinkin 3 piikkiä esiintyi tunnusomaisessa suhteessa, ilmiö, joka muodostuu siten, että molekyyli sisältää kaksi klooriatomia, mutta kloori ei esiinny kuitenkaan luonnossa isotooppipuhtaasti, vaan suhteessa $^{35}\text{Cl}:^{37}\text{Cl} = 3:1$, mikä edellyttää isotooppipiikkien suhdetta n. 9:6:1. Siten ioneille $(M+H)^+$ havaitaan odotetut arvot $m/e = 383, 385, 387$, ioneille $(M-H)^-$ vastaavasti $m/e = 381, 383$ ja 385 . Tunnusomainen pilkkoutuminen, nimittäin alkylöivän aglykonin IPM pilkkoutuminen osoitettiin selvästi signaaleilla $m/e = 221, 223, 225$ ioneille $(IPM+H)^+$ sekä $m/e = 219, 221$ ja 223 ioneille $(IPM-H)^-$. Myös tässä esiintyy isotooppipiikkien tyypillinen jakautuma. Kuviossa 3 on havaittavissa selvästi Glc- β -IPM 28 β :n ionien $(M-H)^-$ ja $(IPM-H)^-$ molemmat tripletit. Signaalit $m/e = 91$ ja 183 ovat peräisin käytetystä glyserolimatriisista.

Konfiguraation järjestys anomeerisessä keskuksessa onnistui $^1\text{H-NMR}$:llä kuten suojatuissa edukteissa protonin H-1 ja sen kemiallisen siirtymän tyypillisten kytkentöjen kautta. Nämä parametrit on esitetty taulukossa 3.

IPM:n suhteen isomeerinen PM 4a reagoi 2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-alfa-D-glukopyranosidin 19 ja vastaavan mannosyylidonorin 21 kanssa dikloorimetaani/trietyyliamiinissa muodostaen 2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-D-glukopyranosyyli-N,N-bis-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidin 31 tai vast. 2-epimeerisen yhdisteen 32 (kuv. 4).

Taulukko 3: Suojasta vapautettujen monosakkaridi-IPM-konjugaattien anomeerisen protonin kemialliset siirtymät ja kyt-kennät

	$\delta(H-1)$	$J_{1,2}$	$J_{1,P}$
<u>28α</u>	5,605	3,4	7,8
<u>28β</u>	5,004	8,0	8,0
<u>29α</u>	5,642	3,1	7,8
<u>29β</u>	4,950	8,0	8,0
<u>30α</u>	5,564	2,0	8,0
<u>30β</u>	5,282	1,1	8,6

Glykosyyli-PM-konjugaattien 5 tai 31 valmistamiseksi voidaan käyttää myös muita synteesiteitä, kuten on esitetty kuviossa 5.

Vastaavalla tavalla (esimerkit 1 ja 2) saatiin hepta-O-bent-syyli-glukoosien 43 ja 44 kautta

	R_1	R_2
<u>43</u>	OBn	H
<u>44</u>	H	OBn

disakkaridi-IPM-konjugaatit 50 ja 51

	R_1	R_2
<u>50</u>	OH	H
<u>51</u>	H	OH

Taulukko 4 esittää suojasta vapautettujen disakkaridi-konjugaattien $^1\text{H-NMR}$ -arvot.

	$\delta(\text{H-1})$	$J_{1,2}$	$J_{1,P}$	$\delta(\text{H-1}')$	$J_{1',2'}$
<u>50α</u>	5,623	3,6	7,8	4,478	8,0
<u>50β</u>	5,049	8,0	8,0	4,473	8,0
<u>51α</u>	5,622	3,6	7,8	4,537	7,9
<u>51β</u>	5,044	8,0	8,0	4,532	8,0

Myös tässä kaikkien neljän diastereomeerisen yhdisteen identiteetti varmistettiin 2D-NMR-COSY:llä. Kuviot 6a/6b esittävät suojasta vapautettujen sellobioosi-IPM-konjugaattien 51 α ja 51 β 2D-spektriä.

Myös tässä varmistettiin sokeritähteiden rakenne entsymaattisilla reaktioilla, siis laktoosi tai vast. sellobioosi.

Muodostettaessa disakkaridi-kytkettyjä IPM-konjugaatteja luonnossa esiintyvien disakkaridien, kuten laktoosin tai sellobioosin käytöllä eduktina on se etu verrattuna konjugaattimuodostukseen monosokereista, että sokerien välinen glykosidinen sidos on määrätty ennalta ja siten stereoselektiivinen synteesivaihe voidaan säästää. Siten edellä esitetyjä synteesimenetelmiä sovellettiin myös disakkaridi-kytkettyjen IPM-konjugaattien valmistukseen. Ensiksi tarvittiin siis bentsyyli-suojattu disakkaridi, jonka 1-O-asema voitiin aktivoida joko bromivedyllä tai triklooriasetonitriilillä. Siten syntetisoitiin laktoosista ja sellobioosista S. Koton menetelmän mukaisesti (Koto et al., 1982, Nihon-Kagakkai: Nihon-Kagaku-Kaishi (J. Chem. Soc. Jpn.) 10, 1651) disakkaridi-rakenteet 2,3,6-2',3',4',6'-hepta-O-bentsyyli-laktoosi ja isomeerinen sellobioosijohdannainen 44 (kuvio 7).

Jos glykosidejä inkuboitiin HEPES:issä tai vedessä vastaavien glykosidaasien kanssa, niin voitiin havaita glykosidisen sidoksen nopea lohkaus.

Konjugaatit Lac-IPM 50 ja Cel-IPM 51 osoittautuivat metanolisessa liuoksessa samoin kuin monosakkaridikonjugaatit 28 - 30 huoneen lämpötilassa stabiileiksi (DC-analyysi). Koska yhdisteissä 50 ja 51 esiintyy kulloinkin 2 glykosidistä sidosta, joilla on sama (51 β) tai erilainen konfiguraatio (esim. 50 α), käytettiin IPM:n entsymaattisen vapautumisen tarkastukseen yksittäisten glykosidaasien lisäksi myös entsyymiseoksia. Anomeeripuhtaiden konjugaattien 50 ja 51 entsymaattista lohkaista seurattiin ohutkerroskromatografisesti. NBP:n lisäksi osoitettiin joko intaktit konjugaatit tai lohkaistuotteet 28 α , 28 β tai IPM.

Vastaavien glykosidaasien avulla lohkaistiin kaikki konjugaatit nopeasti ja voidaan vapauttaa esim. yleisen kaavan 1 tai vast. 1a mukaiset metaboliitit.

Disakkaridi-konjugaattien 50 ja 51 α kohdalla tarvittiin IPM:n vapauttamiseksi kahden erilaisen glykosidisen sidoksen lohkaista. Ainoastaan 51 β , jossa on kaksi samanlaisen konfiguraation omaavaa sidosta, voitiin lohkaista kokonaan yhdellä ainoalla entsyymillä, nimittäin β -glukosidaasilla.

Tämä vahvistettiin mittaamalla biologinen vaikutus, nimittäin sytotoksinen aktiivisuus in vitro tutkimalla hiiren retikuloendoteelisyöpää ja rotan nisäntuumorisolukantaa sekä Eb/ESb-solukantaa.

In vivo-tutkimukset suoritettiin hiiren P388-leukemialla ja rotan 1C32-tuumorilla. In vitro- ja in vivo-tutkimusten tulokset on esitetty kuvioissa 8 - 13.

Toksisuusmittaus osoitti, että annettaessa i.p. 100 mg/kg tai vast. 1000 mg/kg Glc- β -IPM:ää koiraspuolisille CD₂F₁-

hiirille ei voitu havaita mitään akuuttia toksisuutta. Eläinten sektio 28 päivän kuluttua jäi ilman löydöstä. Myöskään BD6-rotissa, joihin oli istutettu 1C32-tuumori ja jotka oli käsitelty Gal-IPM:llä (5 - 122,5 tai vast. 5 - 245 mg/kg), ei voitu havaita toksisuutta. Sektiotulos (mm. maksa, munuaiset, perna, aivot, luuydin) 15. päivänä käsittelyn alkamisesta ei tuottanut mitään löydöstä.

Yhteenvedona voidaan siis todeta, että in vitro-tutkimukset retikuloendoteelisyöväillä osoittavat sekä aglyca-PM:n ja IPM:n sekä yleisen kaavan 1 tai vast. 1a mukaisten monosakkaridi-konjugaattien ja myös yleisen kaavan 1 tai vast. 1a mukaisten disakkaridi-konjugaattien sytotoksisuuden. In vitro-testeissä nisätuumorisolukannoissa 1C29, 1C32 ja 1C39 esiintyy määrättyjä porrastuksia, koska Gal- β -IPM on aina tehokkain aine. Myös in vivo-tutkimukset osoittivat hyvän vaikutuksen P388-mallissa ja kiinteässä 1C32-nisätuumorissa, nimenomaan ilman akuuttia toksisuutta. Koska myös luuydintoksisuus, jota tutkittiin Glc- β -IPM:n esimerkissä, oli ainoastaan hyvin vähäinen, on täytetty tärkeä vaatimus uusien antineoplastisesti vaikuttavien kemoterapeuttisten aineiden kehityksessä.

Seuraavat esimerkit selventävät yksityiskohtaisesti erilaisten esimerkkiyhdisteiden valmistusta.

Esimerkki 1

Yleinen työohje bentsyyli-suojatun glykosyyli-fosforihappodiamidin valmistamiseksi

Ohje A: Aktivointi bromivedyllä

4,35 mmoolia sinänsä tunnetulla tavalla suojattua p-nitrobentsyyli-glukoosia (esim. 3,0 g yhdistettä 16) tai vast. N-fenylikarbamoyylijohdannaista 17 kuivatettiin P_2O_5 :n päällä ja liuotettiin sitten 10 ml:aan absoluuttista CH_2Cl_2 :ta

(kolmikaulapullo). -20°C :ssa ruiskutettiin hitaasti kuivan typen atmosfäärissä 30 ml HBr-kyllästettyä CH_2Cl_2 -liuosta. Lämmitettiin huoneen lämpötilaan (30 minuutin kuluessa) ja sitten sekoitettiin vielä tunnin ajan huoneen lämpötilassa ja tämän jälkeen imusuodatettiin kääntösintterin kautta toiseen kolmikaulapulloon. CH_2Cl_2 haihduttamisen jälkeen (sekoittaminen magneettisekoittimella, vesisuihkutyhjö, vesihaude, huoneen lämpötila) lisättiin vielä 2 kertaa 5 ml dietyylieetteriä ja haihdutettiin kulloinkin edellä esitetyllä tavalla HBr-tähteiden poistamiseksi. Saatu keltaisenoranssi öljy liuotettiin sitten 20 ml:aan CH_2Cl_2 :ta ja sitten lisättiin 1,0 g yhdistettä 4a tai 4b tai 54 (4,6 mmoolia) ja 0,85 ml trietyyliamiinia (6 mmoolia). Sekoitettiin 3 päivän ajan huoneen lämpötilassa ja sitten suodatettiin, pestiin 2 kertaa pienellä määrällä vettä, kuivatettiin orgaaninen faasi Na_2SO_4 :n päällä ja kiertohaihdutettiin. Tämän jälkeen suoritettiin useimmiten keltaisten erittäin viskoosien öljyjen SC ja kulloinkin kyseessä olevan anomeerin rikastumia saatiin jo aikaisissa tai vast. myöhäisissä fraktioissa. Täydellinen anomeeripuhtaus voitiin saada aikaan kaikissa tapauksissa preparatiivisella HPLC:llä, usein myös kiteyttämällä.

Kaikki työvaiheet suoritettiin kuivan typen atmosfäärissä, kuivilla liuottimilla ja valottomissa olosuhteissa.

Ohje B: Fosforihappodiamidien reaktio glykosyyli-imidaattien kanssa

1,0 mmoolia glykosyyli-imidaattia (esim. 25) liuotettiin 20 ml:aan asetonitriiliä. Lisättiin 1,0 mmoolia fosforihappodiamidia ja sitten kuumennettiin 6 tunnin ajan palautusjäähdyttäen (valottomissa olosuhteissa). Suodattamisen ja kiertohaihduttamisen jälkeen kromatografoitiin piihappogeelillä sinänsä tunnetulla tavalla.

Ohje C: Bentsyyli-suojaryhmien lohkaisu

0,1 mmoolia bentsyyli-suojattua monosakkaridi-johdannaista 22, 23, 24 tai 55 tai vast. disakkaridi-konjugaattia 48 tai 49 liuotettiin 15 ml:aan MeOH:ta. Lisättiin n. 5 mg Pd/aktiivihiiltä (hapetetussa muodossa, pitoisuus 10 % Pd:tä) lohkaistavan bentsyyli-ryhmän 0,1 millivalia kohden (siis esim. 20 mg katalysaattoria/0,1 mmoolia yhdistettä 22, 35 mg/0,1 mmoolia yhdistettä 48) ja sitten hydrattiin huoneen lämpötilassa, kunnes voitiin osoittaa DC-analyysistä kaikkien suojaryhmien lohkaisu (1 - 4 tunnin kuluttua). Lopettamalla heti hydraus vapautettu tuote saatiin puhtaana liuoksen suodattamisen ja kiertohaihduttamisen jälkeen. Tarpeettoman pitkään kestäneessä reaktiossa suojasta vapautettu glykosidi hajaantui ja muodostui IPM 4b. Tässä tapauksessa haluttu tuote voitiin eristää SC:n jälkeen (piihappogeeli, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH} = 70:30$).

DC: piihappogeeli, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH} = 30:70$, R_f (28 α) = 0,58, R_f (4b) = 0,18, piihappogeeli, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 75:20:5$, R_f -arvot: 0,44 (28 α), 0,48 (28 β), 0,43 (29 α), 0,45 (29 β), 0,43 (30 α), 0,41 (30 β), 0,29 (50 ja 51), 0,13 (4b).

Osoitusta varten suihkutettiin NBP-reagenssilla (2,5%:ista asetonissa), kuumennettiin 10 minuuttia 120°C:ssa, jäähdytettiin huoneen lämpötilaan ja sitten suihkutettiin 0,5 M NaOH:lla. IPM-konjugaatit värjäytyivät syvänsinisiksi, kun taas itse IPM esiintyi vaaleansinisenä.

Fosforiamidi-mustard ja ifosfamidi-mustard valmistettiin kirjallisuudesta tunnettujen työtapojen mukaisesti.

Monosakkaridi-PM/IPM-konjugaatit

(yhdisteen 6 mukaisesti)

Erä: 0,55 g yhdistettä 4a (2,5 mmoolia) (N,N-di-(2-kloorietyyli)-fosforidiamidi), 1,03 g ABG:tä (2,5 mmoolia).

Saanto: 30 g yhdistettä 5 kellertävänä, kirkkaana öljynä (2,2 % teoreettisesta), diastereomeeriseos (A + B, ks. NMR-spektri).

Analyysi: $C_{18}H_{29}Cl_2N_2O_{11}P$ (551,3)

laskettu: C 39,24, H 5,30, N 5,08

saatu: C 39,53, H 5,38, N 4,94.

1H -NMR: 90 MHz, $CDCl_3$: δ =
vaihdeavissa D_2O :lla, $-NH_2$), 3,35 - 3,70 (m, 8H, 2 x $-CH_2CH_2Cl$), 3,82 (m, 1H, H-5), 4,148 (dd, H-6a(A), $J_{5,6a} = 5,0$, $J_{6a,6b} = 12,5$ Hz), 4,208 (dd, H-6a(B), $J_{5,6a} = 4,9$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,5$ Hz), 4,244 (dd, H-6b(A), $J_{5,6b} = 2,1$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,5$ Hz), 4,288 (dd, H-6b(B), $J_{5,6b} = 2,1$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,5$ Hz), 5,02 - 5,12 (m, 2H), 5,21 ja 5,23 (2t, yhdessä 1H, (B + A), $J = 9,5$ Hz), 5,298 ja 5,316 (2t, yhdessä 1H), H-1(A) ja H-1(B), $J_{1,2} = J_{1,p} = 7,8$ Hz).

MS: m/e = 331 (M-PM).

2,3,4,6-tetra-O-asetyyli- β -D-glukopyranosyyli-N,N'-(di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 6

Seokseen, jossa oli 1,1 g yhdistettä 4b (5 mmoolia) ja 2,05 g asetobromiglukoosia (5 mmoolia) 50 ml:ssa kuivaa asetonia, lisättiin tipoittain 0,5 g trietyyliamiinia (5 mmoolia). Sekoitettiin 48 tunnin ajan huoneen lämpötilassa valottomissa olosuhteissa. Suodattamisen ja kiertohaihduttamisen jälkeen jäännös otettiin CH_2Cl_2 :een, pestiin pienellä määrällä 0,1 M HCl:ää, kyllästettyä $NaHCO_3$ -liuosta ja vettä, kuivatettiin

Na₂SO₄:n päällä ja kromatografoitiin piihappogeelillä (asetoni:n-heksaani = 40:60). Saatiin 80 mg yhdistettä 6 (2,9 % teoreettisesta) kirkkaana, värittömänä öljynä, joka kiteytyi kuukausien kuluttua +4°C:ssa, sp. 91°C.

DC: piihappogeeli, asetoni:n-heksaani = 1:1, R_f = 0,13.

Analyysi: C₁₈H₂₉Cl₂N₂O₁₁P (551,3)

laskettu: C 39,24, H 5,30, N 5,08, Cl 12,87

saatu: C 39,42, H 5,40, N 4,80, Cl 12,58.

Penta-O-pivaloyyli-β-D-glukoosi 7

(Kunz ja Harreus, 1982, Liebigs Ann. Chem., 41)

Erä: 29 g D-glukoosia (0,16 moolia), 121,2 g pivaloyylikloridia (1,0 moolia), 200 ml kloroformia, 120 ml pyridiiniä.

Saanto: 66 g yhdistettä 7 (69 % teoreettisesta).

Sp.: 154°C (kirjallisuudessa: 156 - 158°C).

Analyysi: C₃₁H₅₂O₁₁ (600,8)

laskettu: C 61,98, H 8,72

saatu: C 62,16, H 8,79.

2,3,4,6-tetra-O-pivaloyyli-α-D-glukopyranosyylibromidi 8

(Kunz ja Harreus, 1982, Liebigs Ann. Chem., 41)

Erä: 12 g yhdistettä 7 (20 mmoolia), 20 ml HBr:ää jääetikaassa (33%:ista), 20 ml dikloorimetaania.

Saanto: 6,4 g yhdistettä 8 (55,5 % teoreettisesta).

Sp.: 142°C.

Analyysi: $C_{26}H_{43}BrO_9$ (579,5)

laskettu: C 53,89, H 7,48

saatu: C 54,24, H 7,94.

$J_{2,3} = 9,5$ Hz), 5,21 ja 5,64 (2t, 2H, $J = 9,5$ Hz, H-4 ja H-3), 6,62 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 4,2$ Hz).

2,3,4,6-tetra-O-pivaloyyli- β -D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 9

Seokseen, jossa oli 0,38 g yhdistettä 4b (1,725 mmoolia) ja 1,0 g yhdistettä 8 (1,725 mmoolia) 50 ml:ssa asetonia, lisättiin huoneen lämpötilassa 0,5 g Ag_2CO_3 :a (1,8 mmoolia). Sekoitettiin 24 tunnin ajan huoneen lämpötilassa (valotomissa olosuhteissa), sitten suodatettiin, haihdutettiin ja kromatografoitiin piihappogeelillä (asetoni:n-heksaani = 25:75). Saatiin 160 mg yhdistettä 9 (12,9 % teoreettisesta) kirkkaana, värittömänä öljynä, joka kiteytyi kuukausien kuluessa $+4^\circ C$:ssa, sp.: $94^\circ C$.

DC: piihappogeeli, asetonin-heksaani = 1:1, $R_f = 0,43$.

Analyysi: $C_{30}H_{54}Cl_2N_2O_2P$ (719,54)

laskettu: C 50,08, H 7,42, N 3,89, Cl 9,86

saatu: C 51,35, H 7,98, N 3,24, Cl 9,36.

Metyyli-2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- α -D-glukopyranosidi 10

(julkaisussa Carbohydrate Chemistry, 1972, esitettyjen menetelmien mukaisesti)

Erä: 50 g metyyli- α -D-glukopyranosidia (257 mmoolia), 250 g KOH:ta (jauhettuna), 150 ml dioksaania, 318 ml bentsyyli-kloridia (2,76 moolia).

Saanto: 116 g yhdistettä 10 (81,3 % teoreettisesta) erittäin viskoosina, keltaisena, kirkkaana öljynä.

Analyysi: $C_{35}H_{38}O_6$ (554,68)

laskettu: C 75,79, H 6,91

saatu: C 76,19, H 6,93.

Metyyli-2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- α -D-galaktopyranosidi 11
(yhdisteen 10 mukaisesti)

Erä: 40 g metyyli- α -D-galaktopyranosidia (206 mmoolia), 200 g jauhattua KOH:ta, 200 ml dioksaania, 280 ml bentsyylikloridia.

Saanto: 102 g yhdistettä 11 (89,3 % teoreettisesta) keltaisena, kirkkaana öljynä.

Analyysi: $C_{35}H_{38}O_6$ (554,68)

laskettu: C 75,79, H 6,91

saatu: C 76,07, H 6,67.

Metyyli-2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- α -D-mannopyranosidi 12
(Koto et al., 1976)

Erä: 18 g metyyli- α -D-mannopyranosidia (92,7 mmoolia), 81 g NaH-suspensiota (20%:ista), 450 ml bentsyylikloridia.

Raakasaanto: Pesun jälkeen muodostuu 2 faasia. Ylemmän värittömän faasin erottamisen jälkeen (valkoöljy) saatiin 52 g keltaista, hieman sameaa öljyä, joka saatettiin reagoimaan ilman lisäpuhdistusta yhdisteeksi 15. Osa öljystä kromatografoitiin (piihappogeeli, EE:PE = 40:60): keltainen, kirkas öljy.

1H -NMR: 90 MHz, $CDCl_3$, δ = 3,31 (s, 3H, -OMe), 3,65 - 4,15 (m, 6H, sokeriprotoneja), 4,43 - 5,10 (m, 9H, H-1 ja 4 x $-CH_2-Ph$), 7,1 - 7,45 (m, 20H, 4 x -Ph).

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- α -D-glukopyranoosi 13

(julkaisun Carbohydrate Chemistry, 1982, menetelmien mukaisesti)

Erä: 115 g yhdistettä 10 (207 mmoolia).

Saanto: 54 g yhdistettä 13 (48,3 % teoreettisesta).

Sp.: 152°C (metanolista uudelleenkiteytettynä).

Analyysi: $C_{34}H_{36}O_6$ (540,66)

laskettu: C 75,53, H 6,71

saatu: C 75,69, H 6,91.

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- α -D-galaktopyranoosi 14

(Kronzer ja Schuerch, 1974, Carboh. Res. 33, 273)

Erä: 30 g yhdistettä 11 (54 mmoolia), 500 ml etikkahappoa (80%:ista), 150 ml 1N HCl:ää.

Saanto: 28,6 g yhdistettä 14 (98 % teoreettisesta), keltainen, kirkas öljy.

$^1\text{H-NMR}$: 90 MHz, CDCl_3 , δ = 3,47 (d, 1H, vaihdettavissa D_2O :lla, -OH), 3,5 - 4,3 (m, 6H, sokeriprotoneja), 4,35 - 5,05 (m, 8H, 4 x $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5,28 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3,2 Hz), 7,1 - 7,5 (m, 20H, 4 x -Ph).

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-D-mannopyranoosi 15

50 g seosta 12 (n. 90 mmoolia, sisältää vielä vähän valko-öljyä) liuotettiin 800 ml:aan jäätikkää ja lämmitettiin 80 - 85°C:seen. 60 minuutin kuluessa lisättiin tipoitain 120 ml 2N HCl:ää, 90 minuutin kuluttua lisättiin 200 ml vettä, erä jäädytettiin huoneen lämpötilaan ja uutettiin tämän jälkeen 3200 ml:lla tolueenia. Orgaaninen faasi pestiin kyl-lästetyllä NaHCO_3 -liuoksella ja vedellä, kuivatettiin Na_2SO_4 :n päällä ja kiertohaihdutettiin. Saatu ruskea siirap-

pi kromatografoitiin (piihappogeeli, EE:PE = 30:70) ja se tuotti 33,2 g yhdistettä 15 (68,3 % teoreettisesta) keltaisena öljynä.

^1H -NMR: 90 MHz, CDCl_3 , δ = 3,5 - 4,3 (m, 7H, 1H vaihdettavissa D_2O :lla, -OH ja 6 sokeriprotonia), 4,35 - 5,05 (m, 8H, 4 x $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5,22 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} \sim 2$ Hz), 7,05 - 7,4 (m, 20H, 4 x -Ph).

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-1-O-p-nitrobentsoyyli-D-glukopyranoosi 16

(julkaisun Carbohydrate Chemistry, 1972, menetelmien mukaisesti)

Erä: 15,5 g yhdistettä 13 (28,7 mmoolia), 6 g p-nitrobentsoylikloridia (32,3 mmoolia), 3,75 ml pyridiiniä.

Saanto: 15,6 g yhdistettä 16 (78,8 % teoreettisesta) valkoisena jauheena.

Sp.: 93 - 98°C (etanolista).

Toistettu uudelleenkiteytys di-isopropyylieetteristä tuottaa yhdisteen 16a neulasina.

Sp.: 122°C.

Analyysi: $\text{C}_{41}\text{H}_{39}\text{NO}_9$ (689,76)

laskettu: C 71,39, H 5,70, N 2,03

saatu: C 71,37, H 5,67, N 2,04.

Emäliuoksesta kiteytyy 16b, sp.: 98°C.

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-1-O-(N-fenyylikarbamoyyli)-D-galaktopyranoosi 17

(Kronzer ja Schuerch, 1974, Carboh. Res. 33, 273)

Erä: 18,7 g yhdistettä 14 (34,6 mmoolia), 50 ml pyridiiniä, 5,4 ml fenyyli-isosyanaattia.

Saanto: 8,0 g yhdistettä 17 (35 % teoreettisesta), ($\alpha:\beta$ = 35:65).

Sp.: 120 - 122°C (etanolista).

Analyysi: $C_{41}H_{41}NO_7$ (659,78)

laskettu: C 74,64, H 6,26, N 2,12

saatu: C 74,21, H 5,97, N 2,36.

Emäliuoksesta kiteytyy 17a, sp.: 143°C.

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-1-O-p-nitrobentsoyyli- α -D-mannopyranoosi 18

(Koto et al., 1976, Bull. Chem. Jpn. 49, 2639)

Erä: 9,8 g yhdistettä 15 (18,1 mmoolia), 4,9 g p-nitrobentsoyylikloridia, 50 ml pyridiiniä.

Saanto: Pikakromatografian jälkeen (Kieselgel 60, EE:PE = 25:75) kiteytyi 7,7 g yhdistettä 18 (61,7 % teoreettisesta) di-isopropyylieetteristä, sp.: 105°C.

Analyysi: $C_{41}H_{39}NO_9$ (689,76)

laskettu: C 71,39, H 5,70, N 2,03

saatu: 71,46, H 5,58, N 1,90.

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosfori-
happodiamidi 22

1) Ohjeen A mukaisesti:

Erä: 3,0 g yhdistettä 16 (4,35 mmoolia), 1,0 g yhdistettä 4b (4,6 mmoolia).

Saanto: SC:n jälkeen (piihappogeeli, EE:PE = 60:40) 2,2 g yhdistettä 22 (68 % teoreettisesta), anomeeriseos: $\alpha:\beta = 5:4$ ($^1\text{H-NMR}$).

DC: piihappogeeli, EE:PE = 60:40, $R_f = 0,28$, $R_f(\alpha) > R_f(\beta)$.

HPLC, anal.: piihappogeeli, EE:heksaani = 75:25, virtaus 1,0 ml/min., $R_t(\alpha) = 12,53'$, $R_t(\beta) = 14,04'$.

HPLC, prep.: piihappogeeli:heksaani:MeOH = 58:42:0,5, virtaus 10,0 ml/min., $R_t(\alpha) = 45'$, $R_t(\beta) = 55'$.

Analyysi: $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ (743,60)

laskettu: C 61,38, H 6,10, N 3,77, Cl 9,54

saatu: C 61,15, H 6,22, N 3,78, Cl 9,61 (22 α)

saatu: C 60,82, H 6,29, N 3,61, Cl 9,37 (22 β).

2) Ohjeen B mukaisesti:

Erä: 4,5 g yhdistettä 25 α (6,57 mmoolia), 1,45 g yhdistettä 4b (6,57 mmoolia).

Saanto: SC:n jälkeen (ks. yllä): 2,06 g yhdistettä 22 (42,2 % teoreettisesta), anomeerisuhde: $\alpha:\beta \sim 1:20$ ($^1\text{H-NMR}$:n ja HPLC:n mukaisesti).

Erä: 50 mg yhdistettä 25 β (0,073 mmoolia), 16,1 mg yhdistettä 4b (0,073 mmoolia).

DC osoittaa tuotteen, jonka $R_f = 0,28$, ja vähän tetrabentsyyliglukoosia 13 sekä vähän eduktia 25 β , anomeerisuhde $\alpha:\beta = 1:1,1$ (HPLC).

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-D-galaktopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 23

1) Ohjeen A mukaisesti:

Erä: 2,6 g yhdistettä 17 (3,94 mmoolia), 0,9 g yhdistettä 4b (4,07 mmoolia).

Saanto: SC:n jälkeen (piihappogeeli, EE:PE = 60:40): 1,9 g yhdistettä 23 (65 % teoreettisesta), anomeeriseos $\alpha:\beta = 1:1$ ($^1\text{H-NMR}$).

DC: piihappogeeli, EE:PE = 60:40, $R_f = 0,27$, $R_f(\alpha) > R_f(\beta)$.

HPLC, anal.: piihappogeeli, EE:heksaani = 75:25, virtaus 1,0 ml/min., $R_t(\alpha) = 14,26'$, $R_t(\beta) = 18,03'$.

HPLC, prep.: piihappogeeli, EE:heksaani:MeOH = 58:42:0,5, $R_t(\alpha) = 51'$, $R_t(\beta) = 62'$.

Analyysi: $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ (743,60)

laskettu: C 61,38, H 6,10, N 3,77, Cl 9,54

saatu: C 61,26, H 6,19, N 3,76, Cl 9,76 (23 α)

saatu: C 61,16, H 6,26, N 3,76, Cl 9,66 (23 β).

2) Ohjeen B mukaisesti:

Erä: 685 mg yhdistettä 26 α (1,0 mmoolia), 221 mg yhdistettä 4b (1,0 mmoolia).

Saanto: Suodatetun reaktioseoksen anomeerisuhde: $\alpha:\beta = 55:45$ (HPLC). SC:n jälkeen (ks. yllä) saatiin 260 mg yhdistettä 23 (38 % teoreettisesta).

2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-D-mannopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 24

1) Ohjeen A mukaisesti:

Erä: 2,3 g yhdistettä 18 (3,33 mmoolia), 0,75 g yhdistettä 4b (3,39 mmoolia).

Saanto: SC:n jälkeen (piihappogeeli, EE:PE = 80:20): 1,16 g yhdistettä 24 (47 % teoreettisesta), anomeeriseos $\alpha:\beta$ = 55:45 ($^1\text{H-NMR}$).

DC: piihappogeeli, EE:PE = 60:40, $R_f(\alpha)$ = 0,23, $R_f(\beta)$ = 0,19.

HPLC, anal.: piihappogeeli, EE:heksaani = 75:25, virtaus 1,0 ml/min., $R_t(\alpha)$ = 13,05', $R_t(\beta)$ = 21,61'.

HPLC, prep.: piihappogeeli, EE:heksaani:MeOH = 64:36:0,5, virtaus 10,0 ml/min., $R_t(\alpha)$ = 45', $R_t(\beta)$ = 70'.

Analyysi: $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ (743,60)
laskettu: C 61,38, H 6,10, N 3,77
saatu: C 60,98, H 6,32, N 3,52 (24 α)
saatu: C 60,98, H 6,19, N 3,29 (24 β).

2) Ohjeen B mukaisesti:

Erä: 3,2 g yhdistettä 27 α (4,67 mmoolia), 1,04 g yhdistettä 4b (4,70 mmoolia).

Saanto: DC osoittaa lähes kvantitatiivisen reaktion yhdisteeksi 24 α , R_f = 0,23. Suodatetussa reaktioseoksessa esiintyy ainoastaan α -anomeeri (HPLC). SC:n jälkeen saatiin 1,6 g yhdistettä 24 α (45 % teoreettisesta).

O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- α -D-glukopyranosyyli)-triklooriasetimidaatti 25 α

(Schmidt ja Stumpp, 1983, Liebigs Ann. Chem., 1249)

Erä: 9,2 g yhdistettä 13 (17 mmoolia), 7,7 ml triklooriasetonitriiliä, 680 mg NaH:ta.

Saanto: 10,9 g yhdistettä 25 α (93,6 % teoreettisesta), väritön, kirkas öljy.

DC: piihappogeeli, PE:E = 1:1, R_f = 0,44.

¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃, δ = 3,6 - 5,1 (m, 14H), 6,51 (d, 1H, H-1, J_{1,2} = 3,5 Hz), 6,95 - 7,55 (m, 20H, 4 x -Ph), 8,55 (s, 1H, -NH-).

O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- β -D-glukopyranosyyli)-triklooriasetimidaatti 25 β

(Schmidt et al., 1984, Liebigs Ann. Chem., 680)

Erä: 1,3 g yhdistettä 13 (2,4 mmoolia), 1,25 g kuivaa K₂CO₃:a, 1,25 ml triklooriasetonitriiliä.

Saanto: Piihappogeelisuodatuksen jälkeen: hieman kellertävä öljy (1,6 g, 97 % teoreettisesta, α : β = 1:5). SC:n jälkeen (piihappogeeli, E:PE = 2:3) saatiin puhdas 25 β värittömänä öljynä (50 mg, 30 % teoreettisesta).

DC: piihappogeeli, PE:E = 1:1, R_f = 0,37.

¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃, δ = 3,55 - 3,90 (m, 6H), 4,40 - 5,05 (m, 8H), 5,82 (d, 1H, H-1), 7,1 - 7,5 (m, 20H, 4 x -Ph), 8,70 (s, 1H, -NH-).

O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-D-galaktopyranosyyli)-trikloori-
riasetimidaatti 26

(Schmidt et al., 1984, Liebigs Ann. Chem., 1343)

Erä: 1,5 g yhdistettä 14 (2,77 mmoolia), 1,4 ml trikloori-
asetonitriiliä, 80 mg NaH:ta.

Saanto: Piihappogeelisuodatuksen jälkeen anomeerisuhteeksi
 $\alpha:\beta$ määritettiin 4:1 ($^1\text{H-NMR}$: 90 MHz, CDCl_3 , Nr. H14208, δ =
5,72 (d, 0,2H, H-1 (β), $J_{1,2}$ = 8,0 Hz), 6,52 (d, 0,8H, H-1
(α), $J_{1,2}$ = 3,7 Hz), 8,51 (s, 0,8H, -NH- (α), vaihdettavissa
 D_2O :lla), 8,60 (s, 0,2H, -NH- (β), vaihdettavissa D_2O :lla).
SC:n jälkeen (piihappogeeli, E:PE = 1:1) saatiin 2 fraktio-
ta:

F1: 1130 mg yhdistettä 26 α (59,5 % teoreettisesta) värittö-
mänä öljynä, $^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, CDCl_3 , Nr. H14112.

F2: 320 mg yhdistettä 26 (16,8 % teoreettisesta) kellertävä-
nä öljynä ($\alpha:\beta$ = 2:1), $^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, CDCl_3 , Nr. H14113.

DC: piihappogeeli, PE:E = 1:1, $R_f(\alpha)$ = 0,43, $R_f(\beta)$ = 0,34.

O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- α -D-mannopyranosyyli)-trikloori-
riasetimidaatti 27 α

(Schmidt et al., 1984, Liebigs Ann. Chem., 1343)

Erä: 4,5 g yhdistettä 15 (8,27 mmoolia), 4 ml triklooriase-
tonitriiliä, 45 mg NaH:ta.

Saanto: SC:n jälkeen: 4,45 g yhdistettä 27 α (65 % teoreetti-
sesta) värittömänä öljynä.

DC: piihappogeeli, E:PE = 3:2, R_f = 0,51.

$^1\text{H-NMR}$: 90 MHz, CDCl_3 , δ = 3,65 - 5,0 (m, 14H), 6,33 (d, 1H,
H-1, $J_{1,2}$ ~ 1,5 Hz), 7,0 - 7,5 (m, 20H, 4 x -Ph), 8,52 (s,
1H, -NH-).

α -D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappo-
diamidi 28 α

Yhdisteen 22 α hydraus ohjeen C mukaisesti.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, D_2O , Nr. 13943, δ = 3,25 - 3,32 (m, 4H, 2 x $-\text{CH}_2-$), 3,488 (t, 1H, J = 9,5 Hz), 3,61 - 3,67 (m, 5H, 2 x $-\text{CH}_2$), 3,719 (t, 1H, J ~ 9,5 Hz), 3,75 - 3,90 (m, 3H), 5,605 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3,4 Hz, $J_{1,p}$ = 7,8 Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 13608

positiivinen: m/e = 383, 385, 387 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

221, 223, 225 ($\text{IPM}+\text{H}$) $^+$

β -D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappo-
diamidi 28 β

Yhdisteen 22 β hydraus ohjeen C mukaisesti.

Analyysi: $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ (383,10)

laskettu: C 31,35, H 5,53, N 7,31

saatu: C 31,03, H 5,04, N 6,82.

α -D-galaktopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihap-
podiamidi 29 α

Yhdisteen 23 α hydraus ohjeen C mukaisesti.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, D_2O , Nr. 13945, δ = 3,26 - 3,32 (m, 4H, 2 x $-\text{CH}_2-$), 3,635 - 3,665 (m, 4H, 2 x $-\text{CH}_2-$), 3,74 - 4,05 (m, 5H), 4,098 (m, 1H), 5,642 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3,1 Hz, $J_{1,p}$ = 7,8 Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 13612

positiivinen: $m/e = 383 (M+H)^+$

221, 223, 225 (IPM+H)⁺

negatiivinen: $m/e = 381, 383, 385 (M-H)^-$

219, 221, 223 (IPM-H)⁻

β -D-galaktopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihap-
podiamidi 29 β

Yhdisteen 23 β hydraus ohjeen C mukaisesti.

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, Nr. 13946, $\delta = 3,26 - 3,32$ (m, 4H, 2 x -CH₂-), 3,605 (d, 1H), 3,63 - 3,67 (m, 4H, 2 x -CH₂-), 3,692 (dd, 1H, J = 3,5 ja J = 10,0 Hz), 3,70 - 3,95 (m, 4H), 4,950 (t, 1H, H-1, J_{1,2} = J_{1,p} = 8,0 Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 13613

negatiivinen: $m/e = 381, 383, 385 (M-H)^-$

219, 221, 223 (IPM-H)⁻

α -D-mannopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihap-
diamidi 30 α

Yhdisteen 24 α hydraus ohjeen C mukaisesti.

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, Nr. 13947, $\delta = 3,26 - 3,32$ (m, 4H, 2 x -CH₂-), 3,5 - 4,0 (m, 9H, jolloin 4H kohdassa 3,63 - 3,67, 2 x -CH₂-), 4,018 (dd, 1H), 5,564 (dd, 1H, H-1, J_{1,2} = 2,0 Hz, J_{1,p} = 8,0 Hz).

FAB-MS: Nr. 13614

negatiivinen: $m/e = 381, 383, 385 (M-H)^-$

219, 221, 223 (IPM-H)⁻

β -D-mannopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappo-
diamidi 30 β

Yhdisteen 24 β hydraus ohjeen C mukaisesti.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, D_2O , Nr. 13948, δ = 3,26 - 3,33 (m, 4H, 2 x $-\text{CH}_2-$), 3,45 (m, 1H, H-5), 3,604 (t, 1H, H-4, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,8$ Hz), 3,63 - 3,67 (m, 4H, 2 x $-\text{CH}_2-$), 3,703 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 3,2$ Hz, $J_{3,4} = 9,8$ Hz), 3,754 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 6,2$ Hz, $J_{6a,6b} \sim 12,5$ Hz), 3,931 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b} = 2,1$ Hz, $J_{6a,6b} \sim 12,5$ Hz), 4,052 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} \sim 1,1$ Hz, $J_{2,3} = 3,2$ Hz), 5,282 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2} \sim 1,1$ Hz, $J_{1,p} = 8,6$ Hz).

FAB-MS: Nr. 13615

negatiivinen: m/e = 381, 383, 385 (M-H^-)

219, 221, 223 (IPM-H^-)

Di-(2-kloorietyyli)-fosforihappoamidi-dikloridi 33

(Friedman ja Seligman, 1954, J. Am. Chem. Soc. 76, 655)

Erä: 130 ml POCl_3 :a (1,4 moolia), 50 g bis-(2-kloorietyyli)-amiini-hydrokloridia.

Saanto: 53 g yhdistettä 33 valkoisina kiteinä, sp.: 54°C (asetoni/PE:stä).

Analyysi: $\text{C}_4\text{H}_8\text{Cl}_4\text{NOP}$ (258,9)

laskettu: C 18,56, N 3,11, N 5,41, Cl 54,77

saatu: C 18,67, N 3,13, N 5,35, Cl 54,90.

Esimerkki 2

Disakkaridi-IPM-konjugaatit

Okta-O-asetyyli-laktoosi 35

Seosta, jossa oli 100 g laktoosia (147 mmoolia), 400 ml asetanhydridiä ja 25 g vedetöntä natriumasetaattia, sekoitettiin 60 minuutin ajan 120 - 135°C:ssa. Jäähdyttämisen jälkeen se kaadettiin jääveteen ja uutettiin CH₂Cl₂:lla. Orgaaninen faasi pestiin neutraaliksi kyllästetyllä NaHCO₃-liuoksella ja H₂O:lla, kuivatettiin Na₂SO₄:n päällä ja kiertohaihdutettiin. Kiteytys etanolista tuotti 153 g yhdistettä 35 (80 % teoreettisesta), sp.: 79 - 92°C.

DC: piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:4, R_f = 0,43.

Analyysi: C₂₈H₃₀O₁₉ (678,6)

laskettu: C 49,56, H 5,64

saatu: C 49,37, H 5,80.

Allyyli-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-asetyyli-β-D-galaktopyranosyyli)-2,3,6-tri-O-asetyyli-D-glukopyranosidi 37

(Koto et al., 1982, J. Chem. Soc. Jpn. 10, 1651)

34 g yhdistettä 35 (50 mmoolia) liuotettiin 60 ml:aan CHCl₃:a. 0°C:ssa lisättiin 20,6 ml asetyylibromidia (276 mmoolia) ja 4,56 ml H₂O:ta. Sekoitettiin 2,5 tunnin ajan huoneen lämpötilassa ja sitten keltainen kirkas liuos kiertohaihdutettiin 30°C:ssa, jolloin saatiin keltainen vaahto (hepta-O-asetyyli-α-D-laktosyylibromidi).

¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃, δ = 1,95 - 2,20 (m, 21H, 7 x -OAc), 3,7 - 5,65 (m, 13H, sokeriprotoneja), 6,51 (d, 1H, H-1, J_{1,2} = 4 Hz).

Vaahto liuotettiin 400 ml:an allyylialkoholia 35°C:ssa. Lisättiin 30 g hopeakarbonaattia, sitten sekoitettiin päivän ajan huoneen lämpötilassa (valottomissa olosuhteissa) ja suodatettiin ja haihdutettiin. Jäännös otettiin eetteriin,

suodatettiin ja haihdutettiin uudelleen ja sitten kromatografoitiin Kieselgel 60:llä (tolueeni:2-butanoni = 10:1 → 10:3). Saatiin 18,2 g yhdistettä 37 (53,8 % teoreettisesta) kirkkaana öljynä.

DC: piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:4 (10:1), R_f = 0,47 (0,08).

Analyysi: $C_{29}H_{40}O_{18}$ (676,62)
laskettu: C 51,48, H 5,96
saatu: C 51,44, H 5,92.

Allyyli-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-asetyyli- β -D-glukopyranosyyli)-
2,3,6-tri-O-asetyyli-D-glukopyranosidi 38
(yhdisteen 37 mukaisesti)

Erä: 29 g α -D-sellobioosi-okta-asetaatia (42,6 mmoolia) (Ega-Chemie), 17,6 ml asetyylibromidia, 3,9 ml H_2O :ta.

Välituote: hepta-O-asetyyli- α -D-sellobiosyylibromidi.

1H -NMR: 90 MHz, $CDCl_3$, δ = 6,51 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 4 Hz).

Saanto: SC:n (piihappogeeli, EE:PE) ja di-isopropyylieetteristä suoritettun kiteytyksen jälkeen saatiin 16,5 g yhdistettä 38 (57 % teoreettisesta), sp.: 179°C.

DC: piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:4, R_f = 0,49.

Analyysi: $C_{29}H_{40}O_{18}$ (679,62)
laskettu: C 51,48, H 5,96
saatu: C 51,45, H 6,07.

Allyyli-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-β-D-galaktopyranosyyli)-2,3,6-tri-O-bentsyyli-D-glukopyranosidi 39

(Koto et al., 1982, J. Chem. Soc. Jpn. 10, 1651)

Erä: 19,5 g yhdistettä 37 (28,8 mmoolia), 800 ml bentsyyli-kloridia, 105 g jauhettua KOH:ta.

Saanto: SC:n (piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 100:1 → 10:1) ja EE/heksaanista suoritettun kiteytyksen jälkeen saatiin 21,3 g yhdistettä 39 (73 % teoreettisesta) neulasina.

DC: piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:1, Rf = 0,50.

Sp.: 73°C.

Analyysi: C₆₄H₆₈O₁₁ (1013,24)

laskettu: C 75,87, H 6,76

saatu: C 75,66, H 6,63.

Allyyli-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli-β-D-glukopyranosyyli)-2,3,6-tri-O-bentsyyli-D-glukopyranosidi 40

(yhdisteen 39 mukaisesti)

Erä: 2,65 g yhdistettä 38 (3,92 mmoolia), 100 ml bentsyyli-kloridia, 14,3 g jauhettua KOH:ta.

Saanto: SC:n ja di-isopropyylieetteri/heksaanista suoritettun kiteytyksen jälkeen saatiin 2,82 g yhdistettä 40 (71 % teoreettisesta).

DC: piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:1, Rf = 0,50.

Sp.: 102°C.

Analyysi: $C_{64}H_{68}O_{11}$ (1013,24)

laskettu: C 75,87, H 6,76

saatu: C 76,17, H 6,57.

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- β -D-galaktopyranosyyli)-
2,3,4-tri-O-bentsyyli-D-gluklopyranoosi 43

A) Isomerointi t-BuOK:lla 1-propenyylieetteriksi 41

Seosta, jossa oli 4,9 g yhdistettä 39 (4,84 mmoolia) ja 1,3 g t-BuOK:ta 30 ml:ssa DMSO:ta, sekoitettiin typpiatmosfäärissä 2 tunnin ajan 110°C:ssa. DMSO haihdutettiin pois, jäännös liuotettiin eetterin ja veden seokseen. Eetterifaasi erotettiin, vesifaasi uutettiin vielä 2 kertaa eetterillä. Yhdistetyt eetterifaasit kuivatettiin Na_2SO_4 :n päällä ja haihdutettiin. Saatiin 4,02 g yhdistettä 41 (4,13 mmoolia) ruskeana öljynä (raakasaanto 85 %).

DC: piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:1, R_f = 0,62.

B) 1-propenyylieetterin 41 hydrolyysi $HgCl_2$:lla yhdisteeksi 43

(Gigg ja Warren, 1968, J. Chem. Soc. (C), 1903)

Seokseen, jossa oli 4,02 g yhdistettä 41 (4,13 mmoolia) ja 1130 mg HgO :ta 10 ml:ssa asetoni/vettä (10:1), lisättiin ti-poittain 5 minuutin kuluessa 1150 mg $HgCl_2$:ta 10 ml:ssa asetoni/vettä (10:1). Sekoitettiin tunnin ajan huoneen lämpötilassa, minkä jälkeen suodatettiin Celiten läpi, haihdutettiin ja lisättiin eetteriä. Eetterifaasi pestiin 10 ml:lla puolikyllästettyä KJ-liuosta ja vedellä. Kuivatettiin Na_2SO_4 :n päällä, haihdutettiin ja sitten kromatografoitiin piihappogeelillä (tolueeni:2-butanoni = 100:1 $\rightarrow$ 10:5). Saatiin yhdiste 43 keltaisena öljynä, joka kiteytyi eetteri/-PE:stä: 2,6 g (55 % teoreettisesta suhteessa yhdisteeseen 39, anomeeriseos, $\alpha:\beta \sim 2:1$ ^{13}C -NMR:n mukaisesti), sp.: 103°C.

DC: piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:1, Rf = 0,22.

Analyysi: $C_{61}H_{64}O_{11}$ (973,17)

laskettu: C 75,29, H 6,63

saatu: C 74,79, H 6,65.

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- β -D-glukopyranosyyli)-2,3,4-tri-O-bentsyyli-D-glukopyranoosi 44

1) Yhdisteen 43 mukaisesti: Isomerointi t-BuOK:lla 1-propenyylieetteriksi 42 ja sitten hydrolyysi $HgCl_2$:lla.

Saanto: 47,7 % teoreettisesta (SC:n jälkeen).

2) Isomerointi tris(trifenyylifosfiini)rodiumkloridilla ($RhCl(PPh_3)_3$) ja sitten hydrolyysi 1N HCl:llä (Corey ja Suggs, 1973, J. Org. Chem. 38, 3224).

125 mg yhdistettä 40 (0,123 mmoolia) keitettiin 3 tunnin ajan 30 ml:ssa EtOH/vettä diatsobisyklo[2.2.2]oktaanin (3 mg, 0,027 mmoolia) ja $RhCl(PPh_3)_3$:n (12 mg, 0,009 mmoolia) kanssa. Sitten lisättiin 6 ml 1N HCl:ää ja keitettiin edelleen 2 tunnin ajan. Jäähdyttämisen jälkeen lisättiin $NaHCO_3$ -liuosta ja uutettiin eetterillä. Orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivatettiin Na_2SO_4 :n päällä ja haihdutettiin. SC:n jälkeen (piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 100:1 $\rightarrow$ 100:5) saatiin 109 mg yhdistettä 44 (91 % teoreettisesta suhteessa yhdisteeseen 40, anomeeriseos, $\alpha:\beta \sim 3:1$ ^{13}C -NMR:n mukaisesti) värittömänä öljynä.

DC: piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:1, Rf = 0,22.

1H -NMR: 90 MHz, $CDCl_3$, δ = 3,05 ja 3,25 (2d, 1H, -OH (α ja β), vaihdettavissa D_2O :lla), 3,3 - 5,2 (m, 28H), 7,1 - 7,5 (m, 35 7 x -Ph).

^{13}C -NMR: Nr. C14897, CDCl_3 , $\delta = 91,38$ (s, C-1 α), 97,42 (s, C-1 β), 102,68 (s, C-1').

FAB-MS: Nr. 13689 (pos., glyseroli, DMF/HCl), $m/e = 973$ (M+H) $^+$.

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- β -D-galaktopyranosyyli-2,3,6-tri-O-bentsyyli-1-O-p-nitrobentsoyyli-D-glukopyranoosi 45

480 mg:aan yhdistettä 43 (0,49 mmoolia) 20 ml:ssa CH_2Cl_2 :ta lisättiin tipoittain huoneen lämpötilassa 2 ml liuosta, jossa oli 130 mg p-nitrobentsoyylikloridia ja 0,3 ml pyridiiniä CH_2Cl_2 :ssa. 20 tuntia huoneen lämpötilassa kestäneen sekoittamisen jälkeen DC (piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:1) osoitti tuskin enää eduktia 43 ($R_f = 0,22$) ja se osoitti kaksi tuotetta, joiden R_f oli 0,42 ja 0,49. Pestiin 0,5N HCl:llä, 1N NaHCO_3 :lla ja vedellä ja kuivatettiin Na_2SO_4 :n päällä, jolloin saatiin erittäin viskoosi öljy. Etanolista kiteytyi 435 mg yhdistettä 45 (79 % teoreettises-ta), anomeeriseos, $\alpha:\beta = 3:7$ ^1H -NMR:n mukaisesti), sp.: 112°C.

Analyysi: $\text{C}_{68}\text{H}_{67}\text{O}_{14}\text{N}$ (1122,28)
laskettu: C 72,77, H 6,02, N 1,25
saatu: C 73,05, H 6,25, N 1,11.

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- β -D-glukopyranosyyli-2,3,6-tri-O-bentsyyli-1-O-p-nitrobentsoyyli-D-glukopyranoosi 46
(yhdisteen 45 mukaisesti)

Erä: 520 mg yhdistettä 44 (0,534 mmoolia), 150 mg p-nitrobentsoyylikloridia, 0,4 ml pyridiiniä.

Saanto: 20 tunnin kuluttua DC (piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 10:1) osoitti kaksi tuotetta, joiden R_f oli 0,43 ja 0,49, eduktin pienen määrän lisäksi ($R_f = 0,22$). SC:n

jälkeen (piihappogeeli, tolueeni:2-butanoni = 20:1) saatiin 320 mg yhdistettä 46 öljynä (53,4 % teoreettisesta). Di-iso-propyylietteristä kiteytyi 46a. Sp.: 169°C.

Analyysi: $C_{68}H_{67}O_{14}N$ (1122,28)
laskettu: C 72,77, H 6,02, N 1,25
saatu: C 72,70, H 6,01, N 1,07.

O-[4-O-(2,3,6-tetra-O-bentsyyli- β -D-glukopyranosyyli)-2,4,6-tri-O-bentsyyli- α -D-glukopyranosyyli]-triklooriasetimidaatti 47

(yhdisteen 25a mukaisesti)

Erä: 130 mg yhdistettä 44 (0,133 mmoolia), 60 μ l trikloori-asetonitriiliä, 5,3 mg NaH:ta.

Saanto: SC:n jälkeen (piihappogeeli, E:PE = 2:3) saatiin 120 mg yhdistettä 47 (80 % teoreettisesta) kirkkaana, värittömänä öljynä.

DC: piihappogeeli, E:PE = 3:2, R_f = 0,49.

1H -NMR: 90 MHz, $CDCl_3$, δ = 3,3 - 5,2 (m, 27H), 6,44 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 4 Hz), 7,1 - 7,4 (m, 35H, 7 x -Ph), 8,57 (s, 1H, -NH-, vaihdettavissa D_2O :lla).

$C_{63}H_{64}Cl_3NO_{11}$ (1117, 56).

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-bentsyyli- β -D-galaktopyranosyyli)-2,3,6-tri-O-bentsyyli-D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 48

Ohjeen A mukaisesti.

Erä: 100 mg yhdistettä 45 (0,089 mmoolia), 21 mg yhdistettä 4b (0,095 mmoolia).

Saanto: SC:n jälkeen (piihappogeeli, EE:PE = 40:60 → 70:30)
saatiin 2 fraktiota:

F1: 7 mg yhdistettä 48, $\beta \gg \alpha$ (6,7 % teoreettisesta).

F2: 40 mg yhdistettä 48, $\alpha \gg \beta$ (38,2 % teoreettisesta).

DC: piihappogeeli, EE/PE = 80:20, $R_f(\alpha) = 0,37$, $R_f(\beta) = 0,42$.

$C_{65}H_{73}Cl_2N_2O_{12}P$ (1176,18).

1H -NMR: Nr. H15189, 90 MHz, $CDCl_3$, $\alpha \gg \beta$, Nr. H15326, 90 MHz, $CDCl_3$, $\beta \gg \alpha$.

HPLC, anal.: piihappogeeli, EE:heksaani:MeOH = 72:28:0,7,
virtaus 1,0 ml/min., $R_t(\alpha) = 10,32'$, $R_t(\beta) = 8,73'$.

HPLC, prep.: piihappogeeli, EE:heksaani:MeOH = 64:36:0,5,
virtaus 10,0 ml/min., $R_t(\alpha) = 35'$, $R_t(\beta) = 27'$.

4-O-(2,3,6-tetra-O-bentsyyli- β -D-glukopyranosyyli)-2,3,6-tri-O-bentsyyli-D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 49

Ohjeen B mukaisesti.

Erä: 40 mg yhdistettä 47 (0,036 mmoolia), 9 mg yhdistettä 4b (0,041 mmoolia).

Saanto: SC:n (piihappogeeli, EE:PE = 60:40) ja prep. HPLC:n jälkeen saatiin 2 fraktiota (kulloinkin kirkas, väritön öljy):

F1: 18 mg yhdistettä 49 β (42,5 % teoreettisesta).

F2: 7 mg yhdistettä 49 α (10,9 % teoreettisesta).

DC: piihappogeeli, EE/PE = 80:20, $R_f(\alpha) = 0,35$, $R_f(\beta) = 0,42$.

$C_{65}H_{73}Cl_2N_2O_{12}P$ (1176,18).

HPLC, anal.: piihappogeeli, EE:heksaani:MeOH = 72:28:1, virtaus 1,0 ml/min., $R_t(\alpha)$ = 7,03', $R_t(\beta)$ = 5,89'.

HPLC, prep.: piihappogeeli, EE:heksaani:MeOH = 64:36:0,5, virtaus 10,0 ml/min., $R_t(\alpha)$ = 35', $R_t(\beta)$ = 25'.

4-O-(β -D-galaktopyranosyyli)- α -D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 50 α

Yhdisteen 48 α hydraus ohjeen C mukaisesti.

$C_{16}H_{31}Cl_2N_2O_{12}P$ (541,31).

1H -NMR: 500 MHz, D_2O , Nr. H15701, δ = 3,27 - 3,34 (m, 4H, 2 x $-CH_2-$), 3,563 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'} = 8,0$ Hz, $J_{2',3'} = 9,8$ Hz), 3,65 - 4,0 (m, 15H, jolloin 4 H kohdassa 3,65 - 3,68, 2 x $-CH_2-$), 4,478 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 8,0$ Hz), 5,623 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, $J_{1,p} = 7,8$ Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 14075

positiivinen: m/e = 221, 223, 225 (IPM+H) $^+$
545, 547, 549 (M+H) $^+$

4-O-(β -D-galaktopyranosyyli)- β -D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 50 β

Yhdisteen 48 β hydraus ohjeen C mukaisesti.

$C_{16}H_{31}Cl_2N_2O_{12}P$ (541,31).

1H -NMR: 500 MHz, D_2O , 1H - 1H -2D-COSY, Nr. 15834, δ = 3,27 - 3,34 (m, 4H, 2 x $-CH_2-$), 3,43 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 8,0$ Hz), 3,558 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'} = 8,0$ Hz, $J_{2',3'} = 10,0$ Hz), 3,65 - 3,68 (m, 4H, 2 x $-CH_2-$), 3,68 - 3,90 (m, 8H), 3,938

(dd, 1H, $J = 3,4$ ja $J \sim 1,0$ Hz), 3,989 (dd, 1H, $J = 1,9$ ja $J = 12,6$ Hz), 4,473 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 8,0$ Hz), 5,049 (t, 1H, H-1, $J_{1,2} = J_{1,p} = 8,0$ Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 14076

positiivinen: $m/e = 221, 223, 225$ (IPM+H)⁺

545, 547, 549 (M+H)⁺

4-O-(β-D-glukopyranosyyli)-α-D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 51α

Yhdisteen 49α hydraus ohjeen C mukaisesti.

$C_{16}H_{31}Cl_2N_2O_{12}P$ (541,31).

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, ¹H-¹H-2D-COSY, Nr. 15856, $\delta = 3,27 - 3,32$ (m, 4H, 2 x -CH_{1,2}-), 3,333 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'} = 7,9$ Hz, $J_{2',3'} = 9,4$ Hz), 3,40 - 3,45 (m, 2H), 3,47 - 3,55 (m, 2H), 3,64 - 3,68 (m, 4H, 2 x -CH₂-), 3,69 (dd, 1H, H-2), 3,70 - 3,99 (m, 6H), 4,537 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 7,9$ Hz), 5,622 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, $J_{1,p} = 7,8$ Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 14077

positiivinen: $m/e = 221, 223, 225$ (IPM+H)⁺

545, 547 (M+H)⁺

4-O-(β-D-glukopyranosyyli)-β-D-glukopyranosyyli-N,N'-di-(2-kloorietyyli)-fosforihappodiamidi 51β

Yhdisteen 49β hydraus ohjeen C mukaisesti.

$C_{16}H_{31}Cl_2N_2O_{12}P$ (541,31).

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, ¹H-¹H-2D-COSY, Nr. 15857, $\delta = 3,27 - 3,32$ (m, 4H, 2 x -CH_{1,2}-), 3,33 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'} = 8,0$ Hz, $J_{2',3'} \sim 10$ Hz), 3,428 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, $J_{2,3}$

= 10,0 Hz), 3,44 - 3,54 (m, 3H), 3,64 - 3,68 (m, 4H, 2 x -CH₂-), 3,69 - 3,72 (m, 3H), 3,745 (dd, 1H, H-6'a, J_{5',6a'} = 3,8 Hz, J_{6'a,6'b} = 12,3 Hz), 3,855 (m, 1H, H-6b), 3,928 (dd, 1H, H-6'b, J_{5',6'b} = 2,1 Hz, J_{6'a,6'b} = 12,3 Hz), 3,990 (dd, 1H, H-6a, J_{5,6a} = 2,0 Hz, J_{6a,6b} = 12,2 Hz), 4,532 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 8,0 Hz), 5,044 (t, 1H, H-1, J_{1,2} = J_{1,p} = 8,0 Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 14078

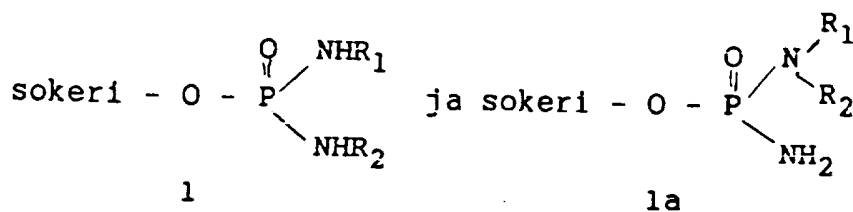
positiivinen: m/e = 221, 223, 225 (IPM+H)⁺
545, 547, 549 (M+H)⁺

Esimerkki 3

Maltotrioosi perasetyloidaan (natriumasetaatti/asetanhydridi), (R_f 0,48, CHCl₃/etikkahappoesteri 1:1, piihappogeeli), siitä muodostetaan HBr/jääetikalla 0°C:ssa 1-bromidi (R_f = 0,58, samat olosuhteet kuin yllä), siitä muodostetaan allyylialkoholi/Ag₂CO₃:lla 1-alkyyli-maltotrisidi (R_f = 0,60, samat olosuhteet kuin yllä). Bentsyylikloridi/KOH:lla muodostetaan siitä 120°C:ssa alkyyli-2,3,6,2',3',6',2'',3'',4'',6''-deka-O-bentsyyli-maltotriosidi (R_f = 0,51, tolueeni/etikkahappoesteri 10:1, piihappogeeli). Isomeroinnin jälkeen enolieetteriksi saippuointi 1-OH-yhdisteeksi 1N HCl:llä (R_f = 0,17, tolueeni/etikkahappoesteri 10:1, piihappogeeli). Siitä muodostetaan triklooriasetimidaatti saattamalla reagoimaan NaH:n ja triklooriasetonitriilin kanssa (R_{fα} = 0,48, samat olosuhteet kuin yllä). Siitä muodostetaan asetonitriilissä ifosfamidi-mustardilla palautusjäähdyttäen glykokonjugaatti (R_f = 0,24, etikkahappoesteri/heksaani 6:4, piihappogeeli). Hydraamalla 10%:isella Pd/aktiivihiilellä CH₃OH:ssa huoneen lämpötilassa lohkaistaan bentsyyli-ryhmät (R_f = 0,22, CHCl₃/metanoli 1:1, piihappogeeli).

Patenttivaatimukset

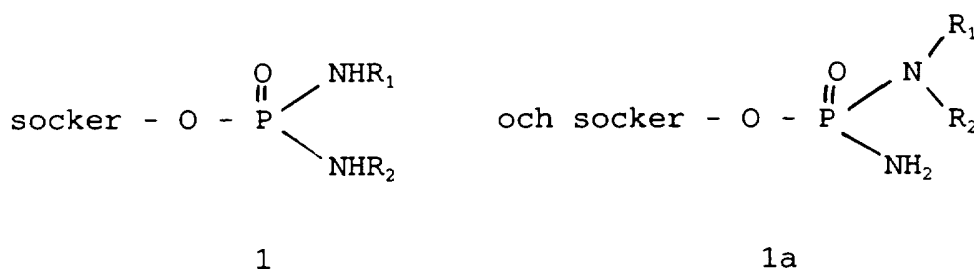
1. Menetelmä fosforiamidi mustardin ja ifosfamidi mustardin yleisten kaavojen



mukaisten glykokonjugaattien valmistamiseksi, jolloin sokerin liitää tapahtuu fosforiamidi-hukkafunktion tai vast. ifosfamidi-hukkafunktion kanssa etenkin 1-asemassa ja R_1 ja R_2 voivat olla samanlaisia tai erilaisia ja ne voivat merkitä vetyä, alempi- C_1 - C_4 -alkyyliä, C_1 - C_6 -halogeenialkyyliä, edullisesti C_1 - C_4 -halogeenialkyyliä ja etenkin C_2 -halogeenialkyyliä siten, että ainakin yksi substituentaista R_1 ja R_2 on C_1 - C_6 -halogeenialkyyli, ja sokereina voivat esiintyä mono- di- tai polysakkaridit kaikissa olemassa olevissa isomeerisissä tai enantiomeerisissä muodoissa, **tunnettu** siitä, että suojatut bromisokerit, etenkin bentsyyli-suojatut bromisokerit konjugoidaan sinänsä tunnetulla tavalla vastaavien fosforiyhdisteiden kanssa ja saatu yhdiste vapautetaan suojaryhmistä.

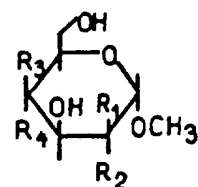
Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av glykokonjugat av fosforamid mustard och ifosfamid mustard enligt de allmänna formlerna



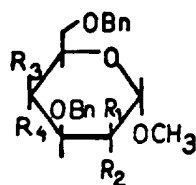
varvid tillfogningen av sockret sker med fosforamid-restfunktionen eller respektive med ifosfamid-restfunktionen speciellt i 1-läget och R_1 och R_2 kan vara likadana eller olika och kan utgöra väte, lägre- C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_6 -halogenalkyl, lämpligen C_1 - C_4 -halogenalkyl och speciellt C_2 -halogenalkyl så att en av substituenterna R_1 och R_2 är C_1 - C_6 -halogenalkyl, och sockret kan utgöras av mono-, di- eller polysackarider i alla befintliga isomera eller enantiomera former, k ä n n e t e c k n a t av att skyddade bromsocker, speciellt benzyl-skyddade bromsocker konjugeras på ett i och för sig känt sätt med motsvarande fosforföreningar och skyddsgrupperna avlägsnas från den erhållna föreningen.

Kuvio 1: Bentsyloitujen bromiglukoosien synteesi



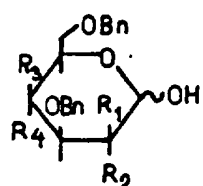
R_1	R_2	R_3	R_4
H	OH	H	OH
H	OH	OH	H
OH	H	H	OH

Metyyli- α -D-Glc
 Metyyli- α -D-Gal
 Metyyli- α -D-Man



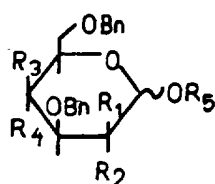
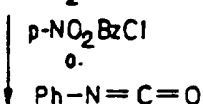
R_1	R_2	R_3	R_4
H	OBn	H	OBn
H	OBn	OBn	H
OBn	H	H	OBn

10
11
12



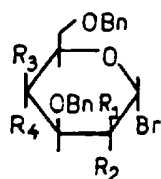
R_1	R_2	R_3	R_4
H	OBn	H	OBn
H	OBn	OBn	H
OBn	H	H	OBn

13
14
15



R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
H	OBn	H	OBn	CO-Ph-NO ₂
H	OBn	OBn	H	CO-NH-Ph
OBn	H	H	OBn	CO-Ph-NO ₂

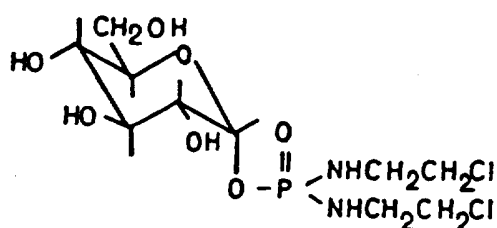
16
17
18



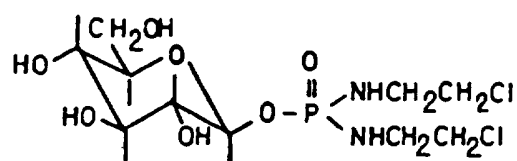
R_1	R_2	R_3	R_4
H	OBn	H	OBn
H	OBn	OBn	H
OBn	H	H	OBn

19
20
21

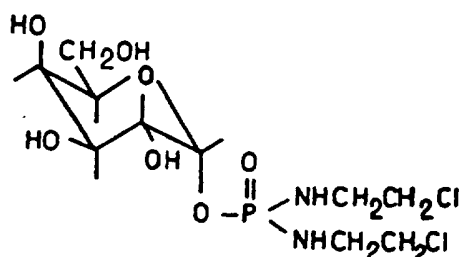
Kuvio 2: 6 suojasta vapautettua diastereomeeristä glykosyyli-IPM-konjugaattia



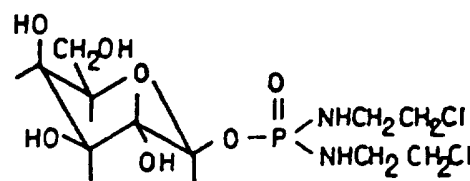
28 α
Glc- α -IPM



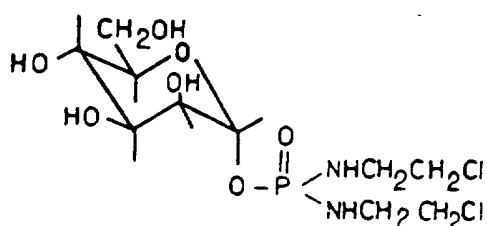
28 β
Glc- β -IPM



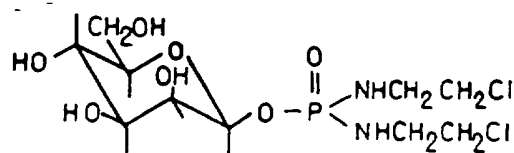
29 α
Gal- α -IPM



29 β
Gal- β -IPM

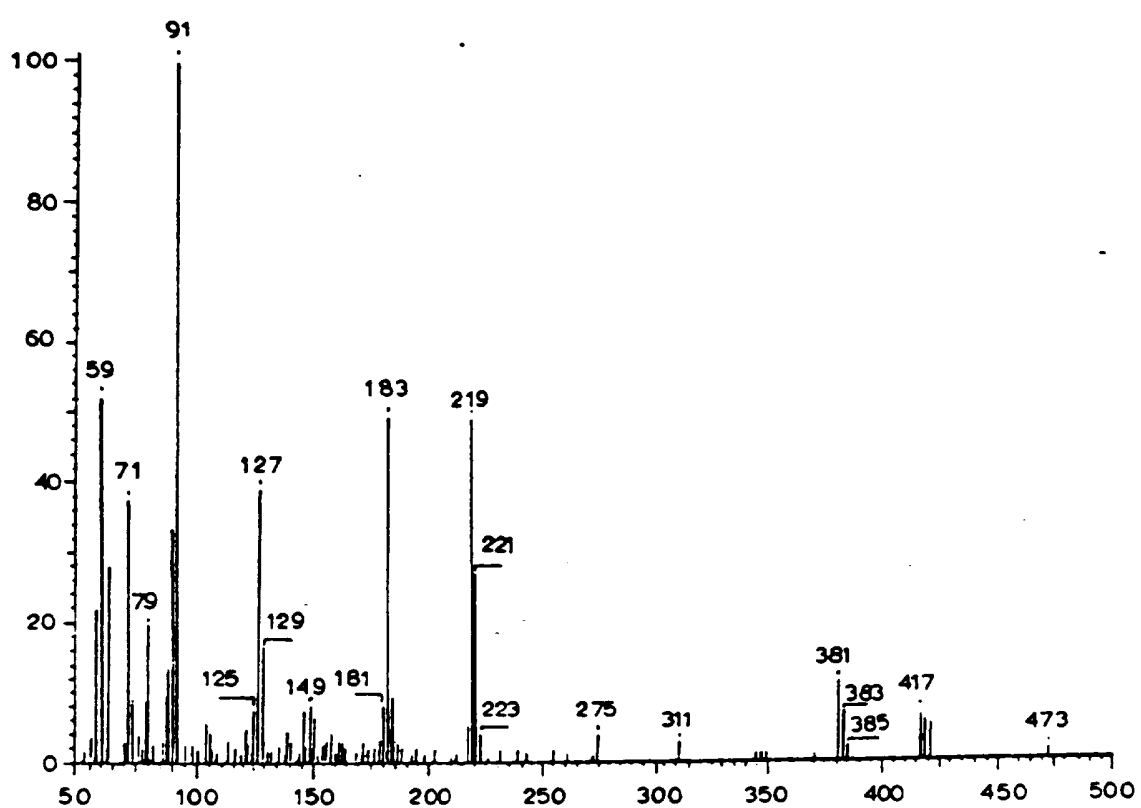


30 α
Man- α -IPM



30 β
Man- β -IPM

Fig. 3



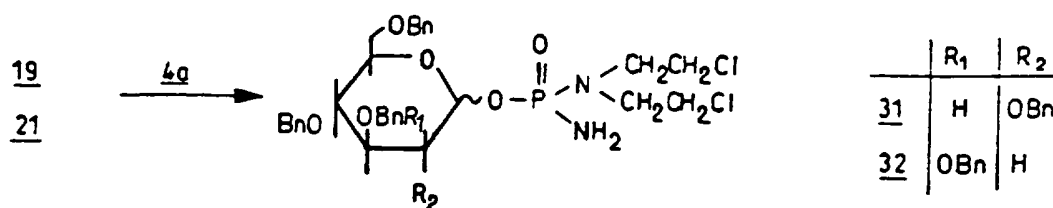
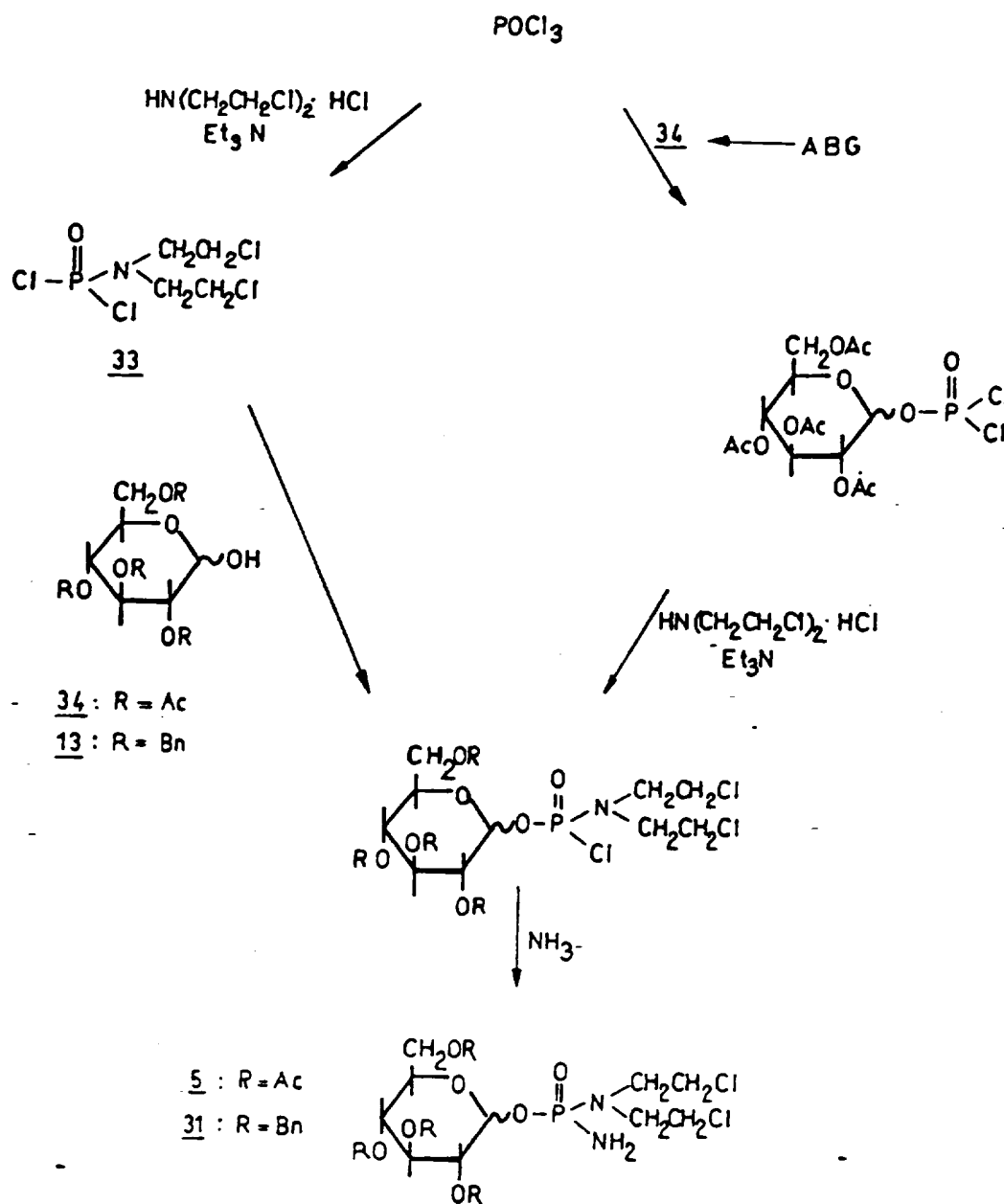
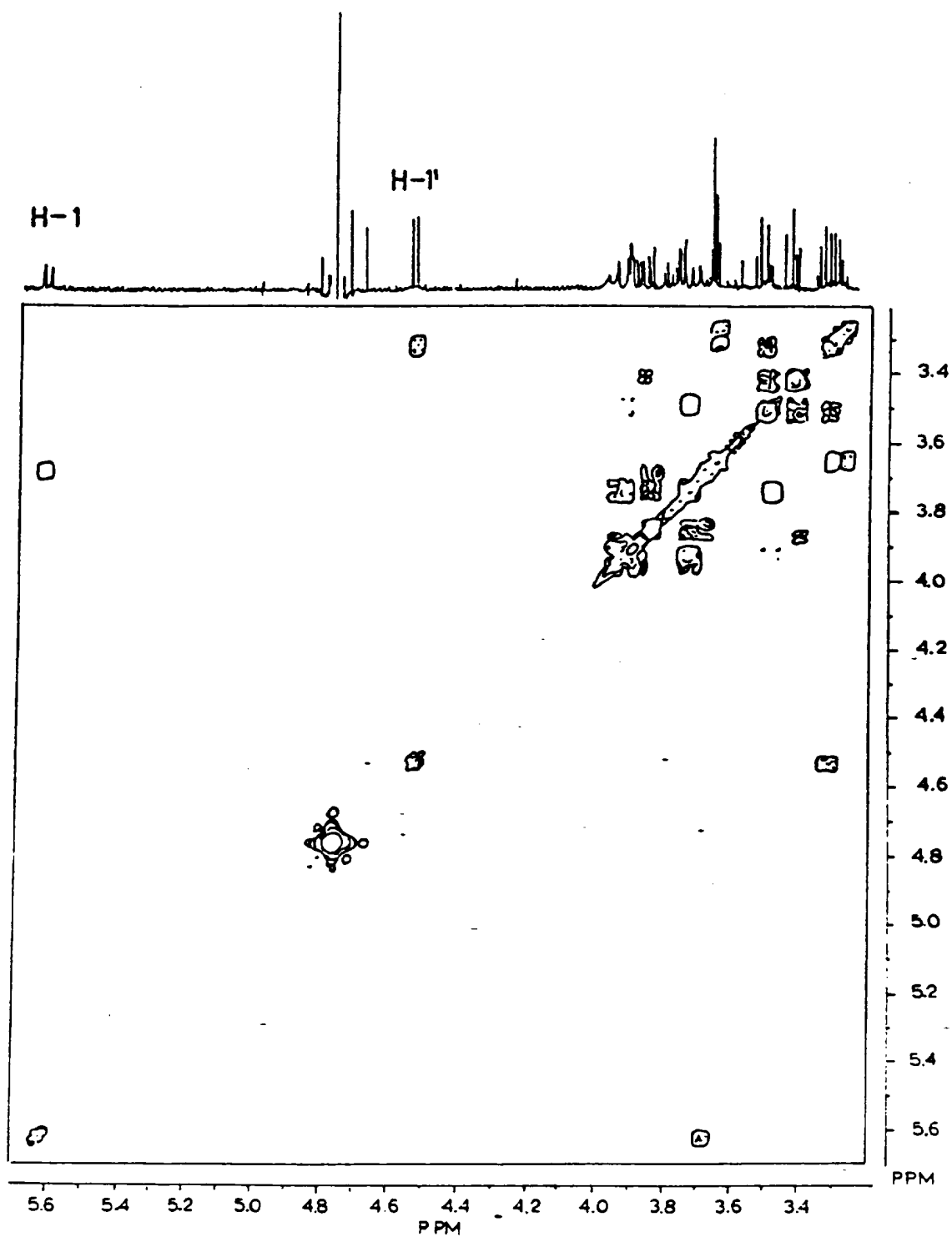


Fig.5

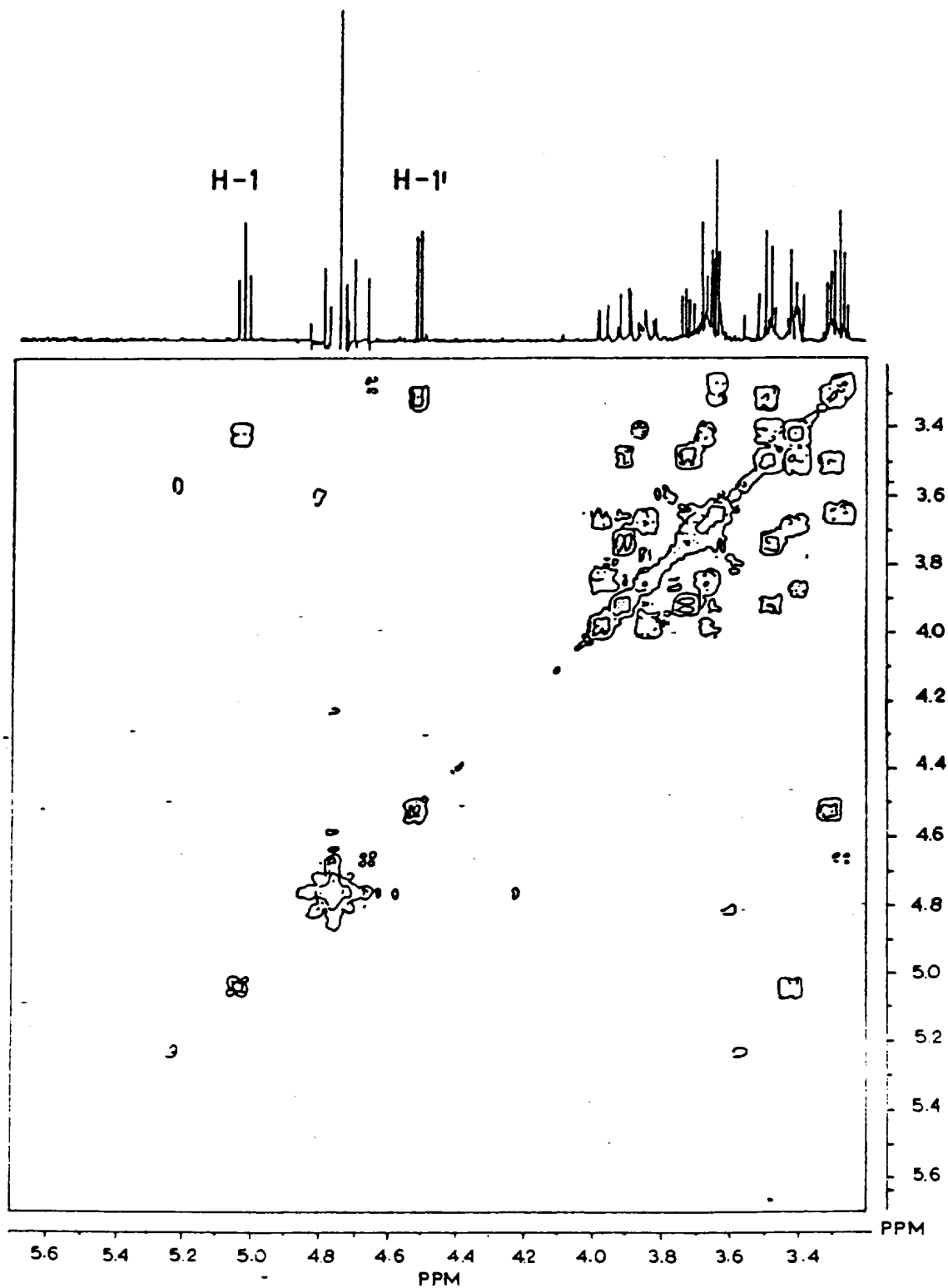


5/15

Kuvio 6a: Sellobioosikonjugaatin 51a 500 MHz- ^1H - ^1H -2D-NMR-spektri

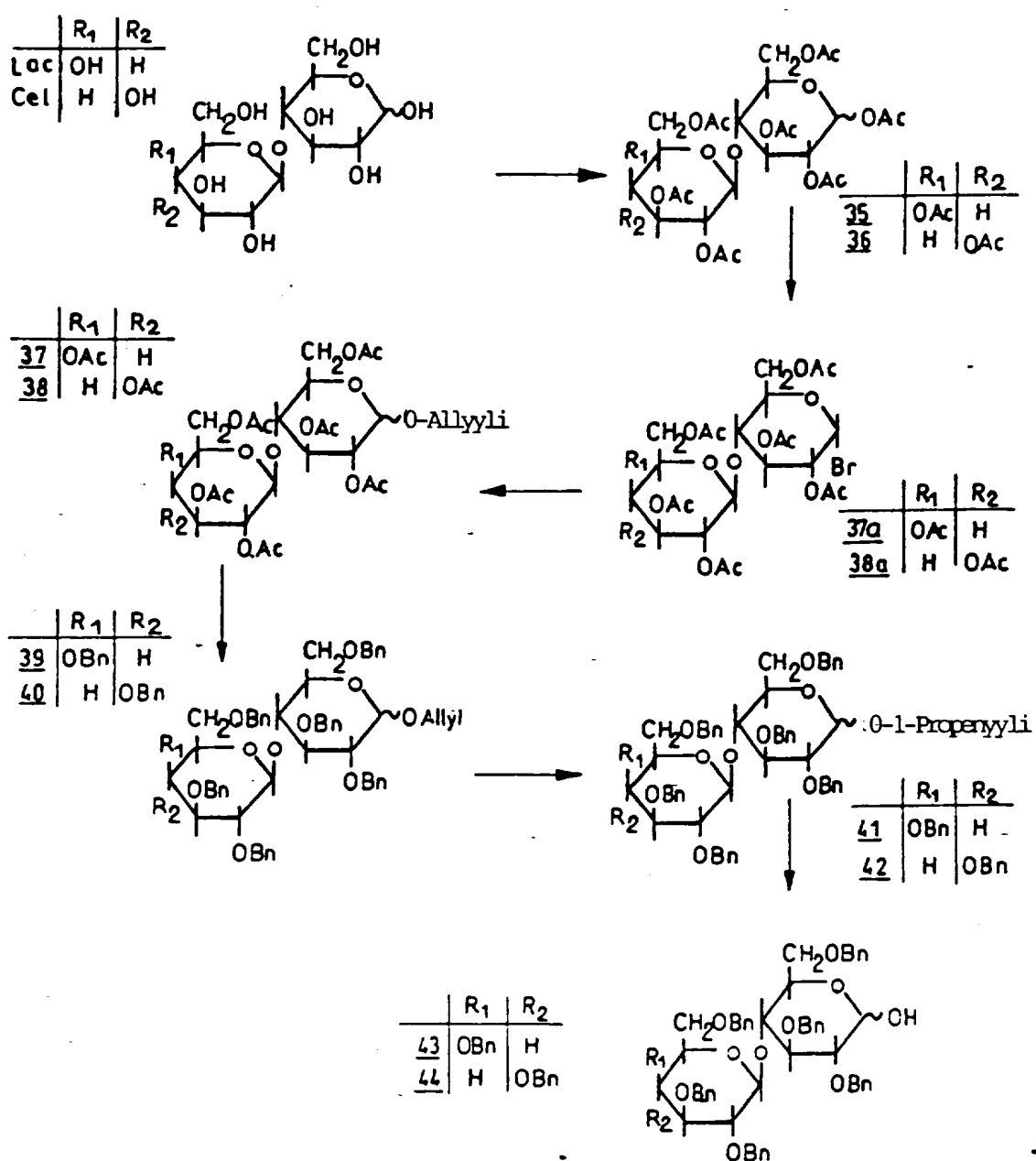


Kuvio 6b: Sellobioosijohdannaisen 51β 500 MHz- ^1H - ^1H -2D-NMR-spektri

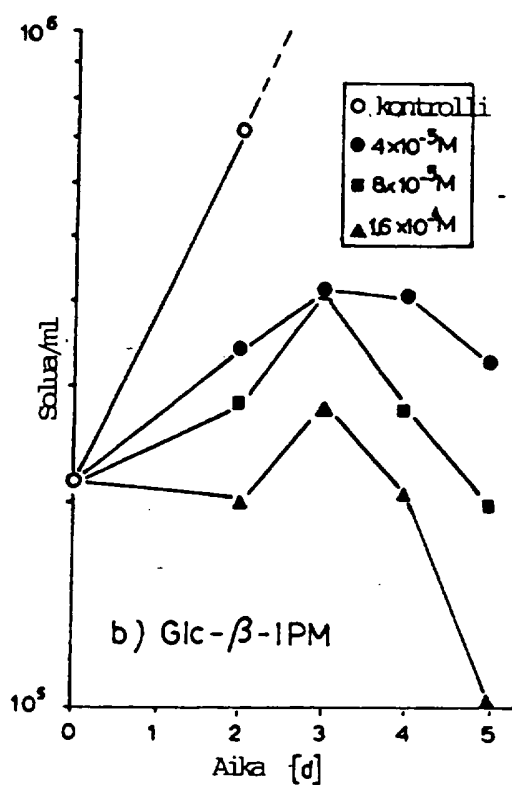
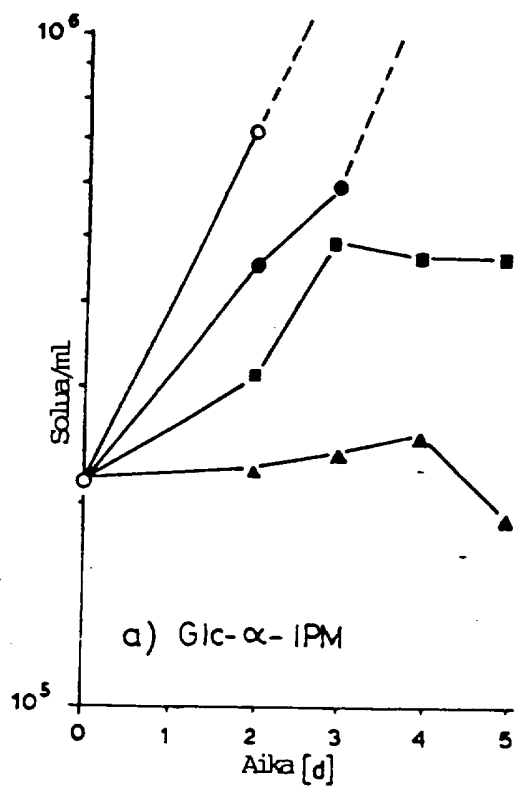


7/15

Fig.7

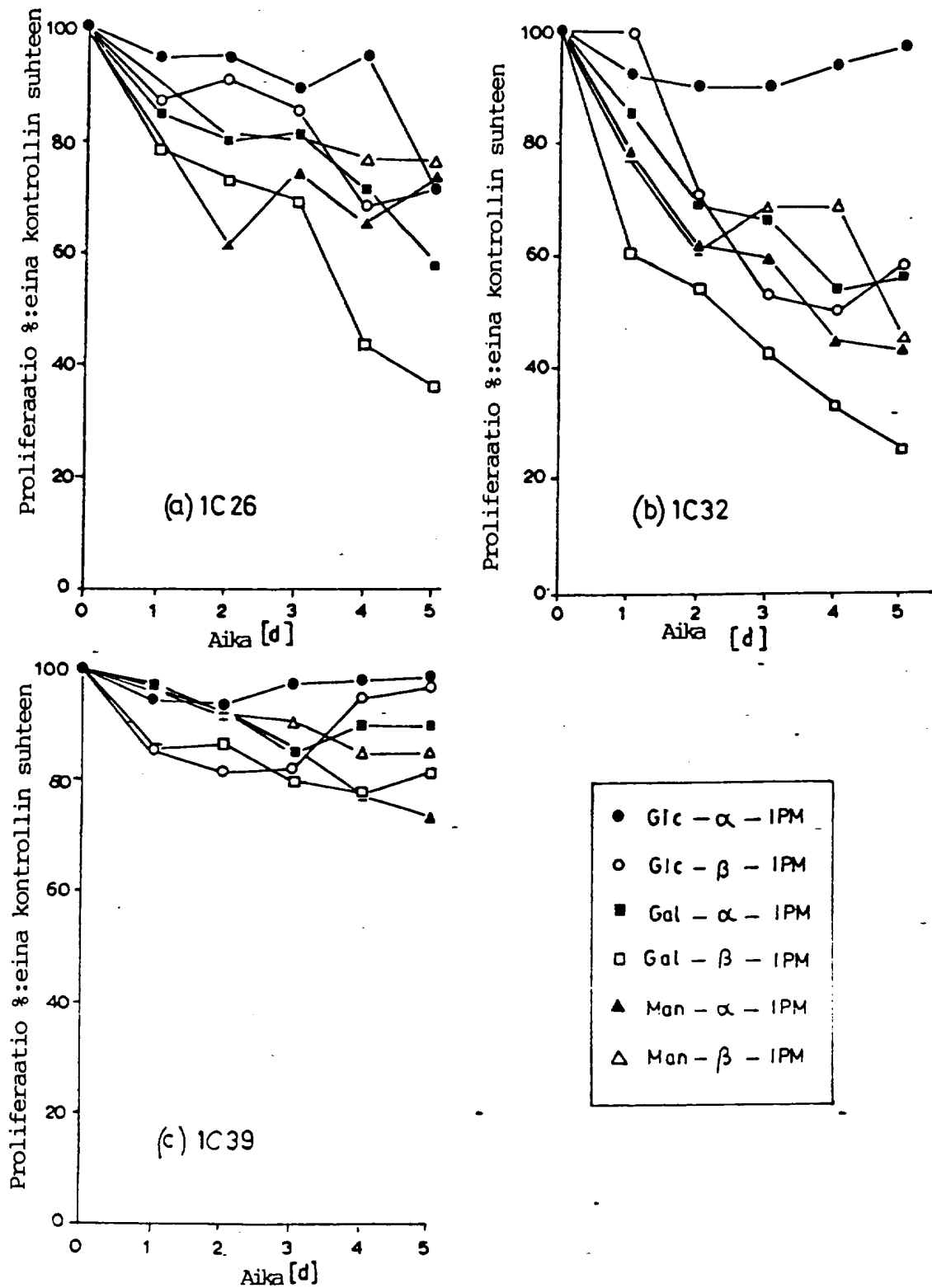


Kuvio 8: RES-viljelmän proliferaatio (uudiskasvu) kestoinku-
baatiossa yhdisteiden 28α (a) ja 28β (b) kanssa



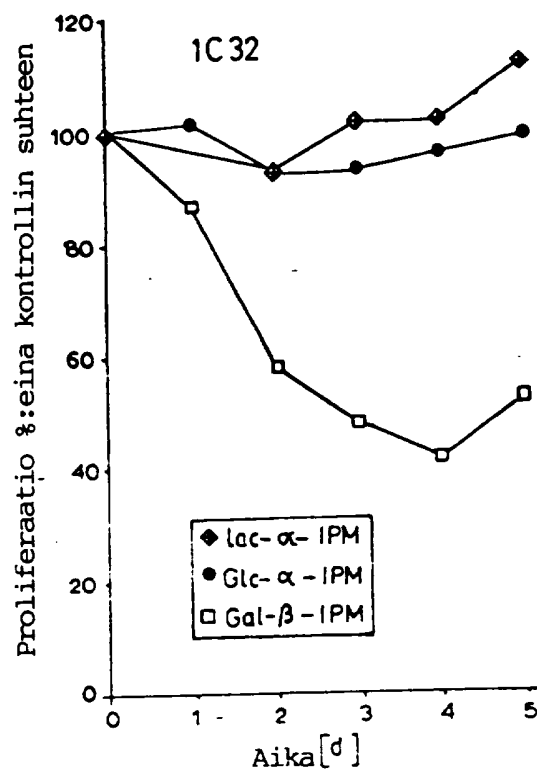
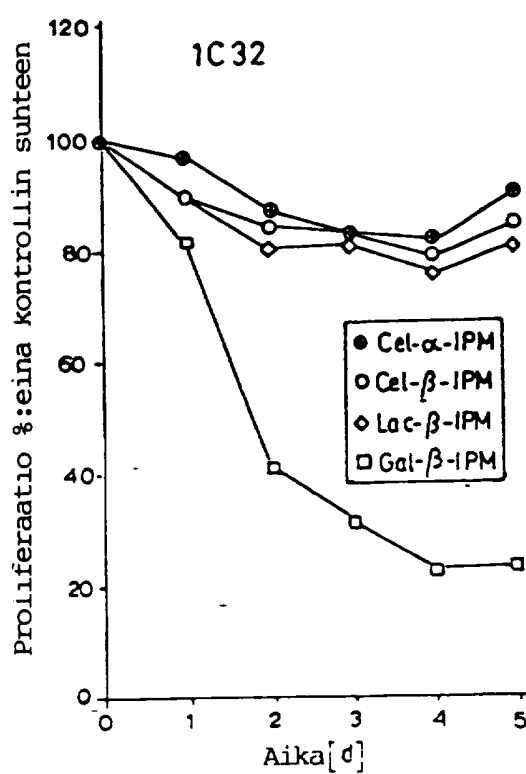
9/15

Kuvio 9: Nisätuumorisoluvielmien 1C26 (a), 1C32 (b) ja 1C39 (c) proliferaatio 2-tuntisen inkubaation jälkeen $8 \cdot 10^{-5}$ M monosakkaridi-IPM-konjugaattien 28 - 30 kanssa

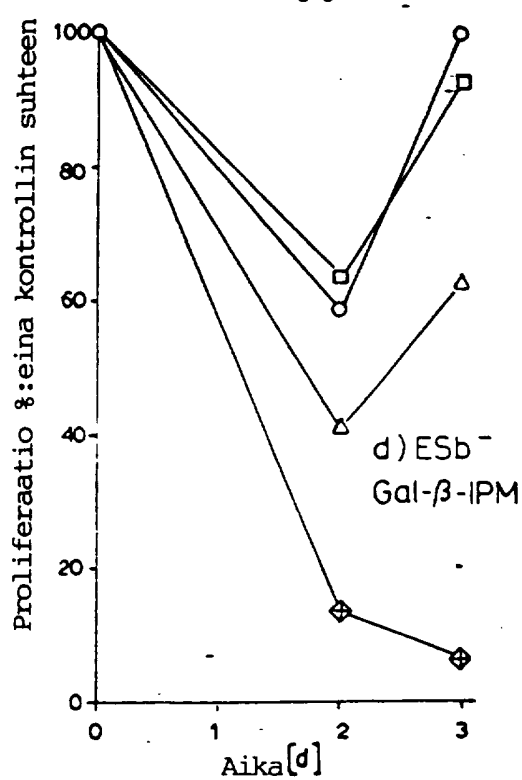
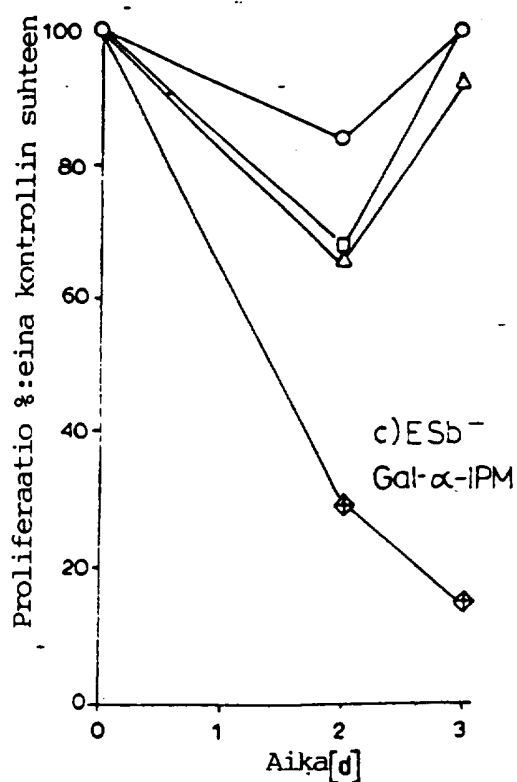
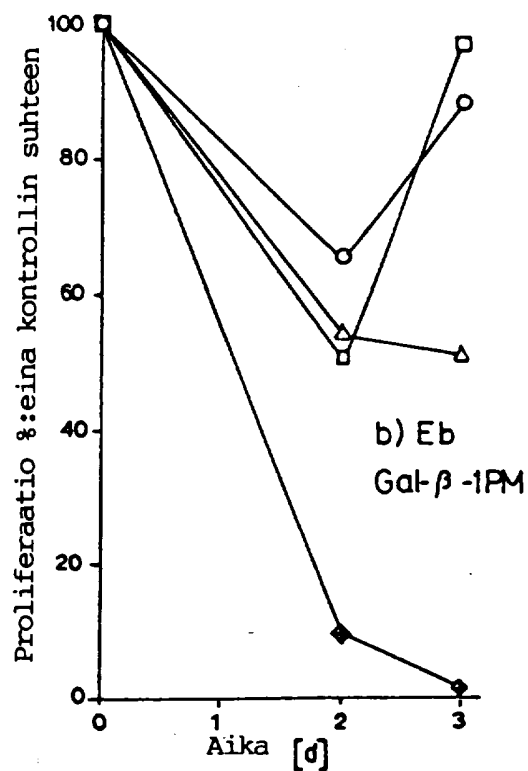
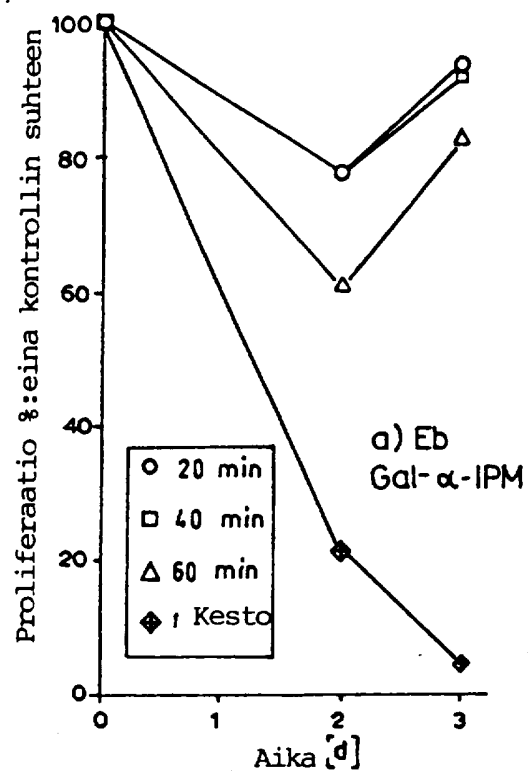


10/15

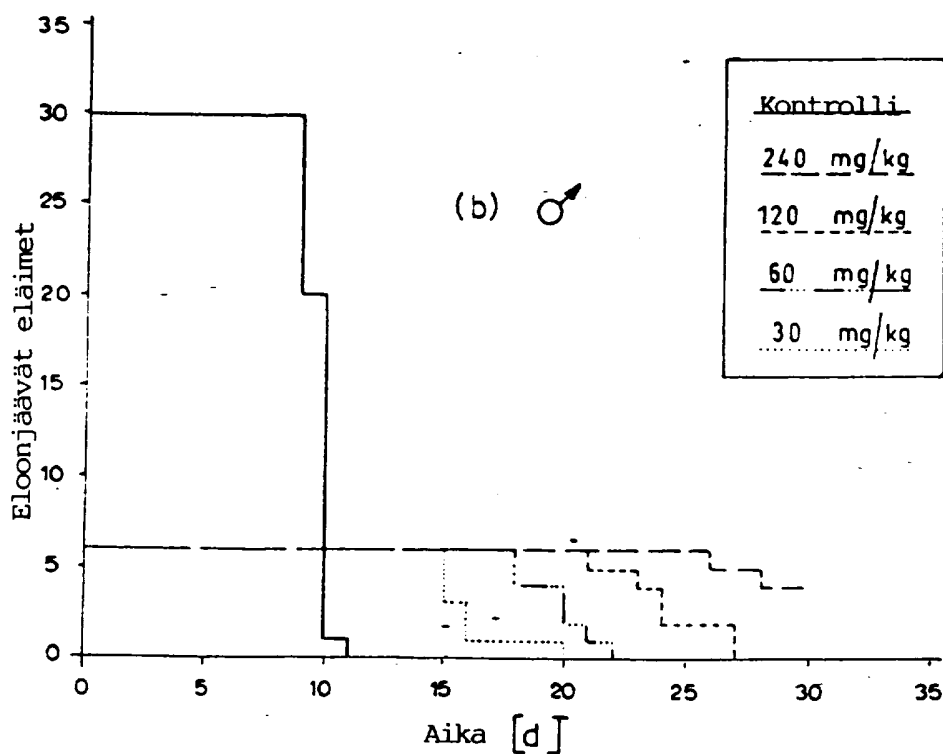
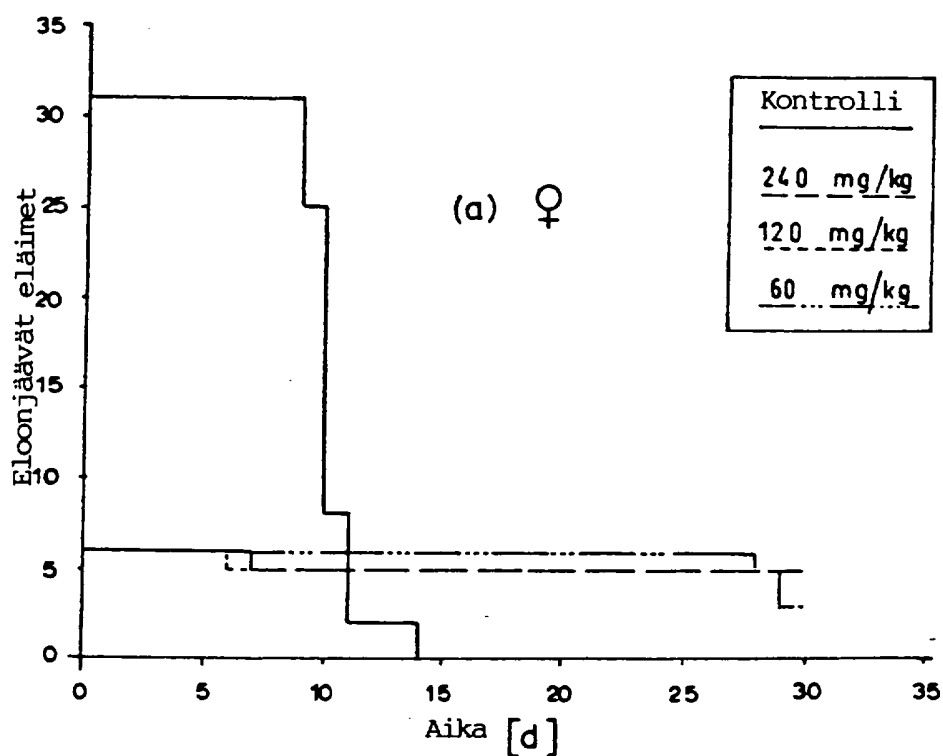
Kuvio 10: Nisätsuomorisolukannan 1C32 proliferaatio 2-tuntisen inkubaation jälkeen ($8 \cdot 10^{-5}$ M) disakkaridi-IPM-konjugaattien 50 ja 51 kanssa



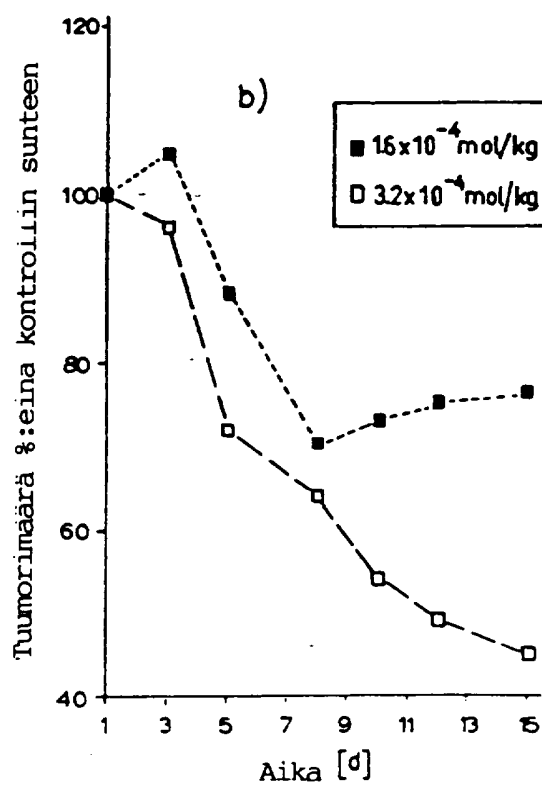
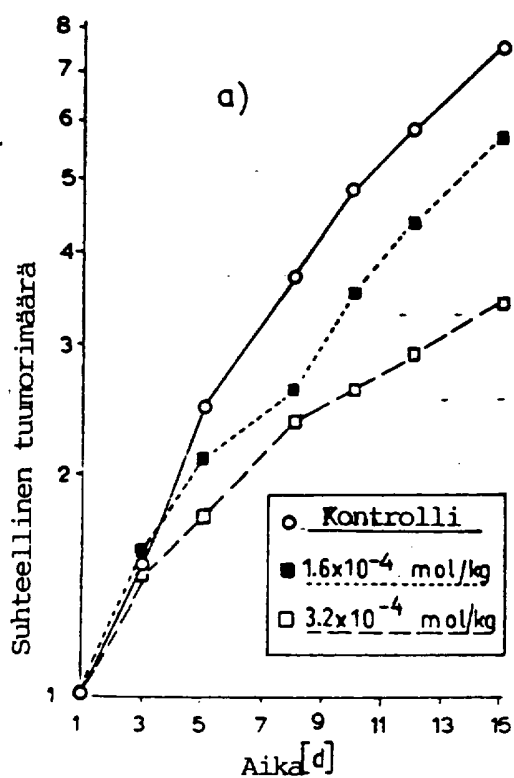
Kuvio 11: Eb:n (a ja b) tai vast. ESb⁻:n (c ja d) proliferaation riippuvaisuus inkubaatioajasta, inkuboitii Gal- α -IPM:n (a ja c) tai vast. Gal- β -IPM:n (b ja d) kanssa, kulloinkin $8 \cdot 10^{-5}$ M



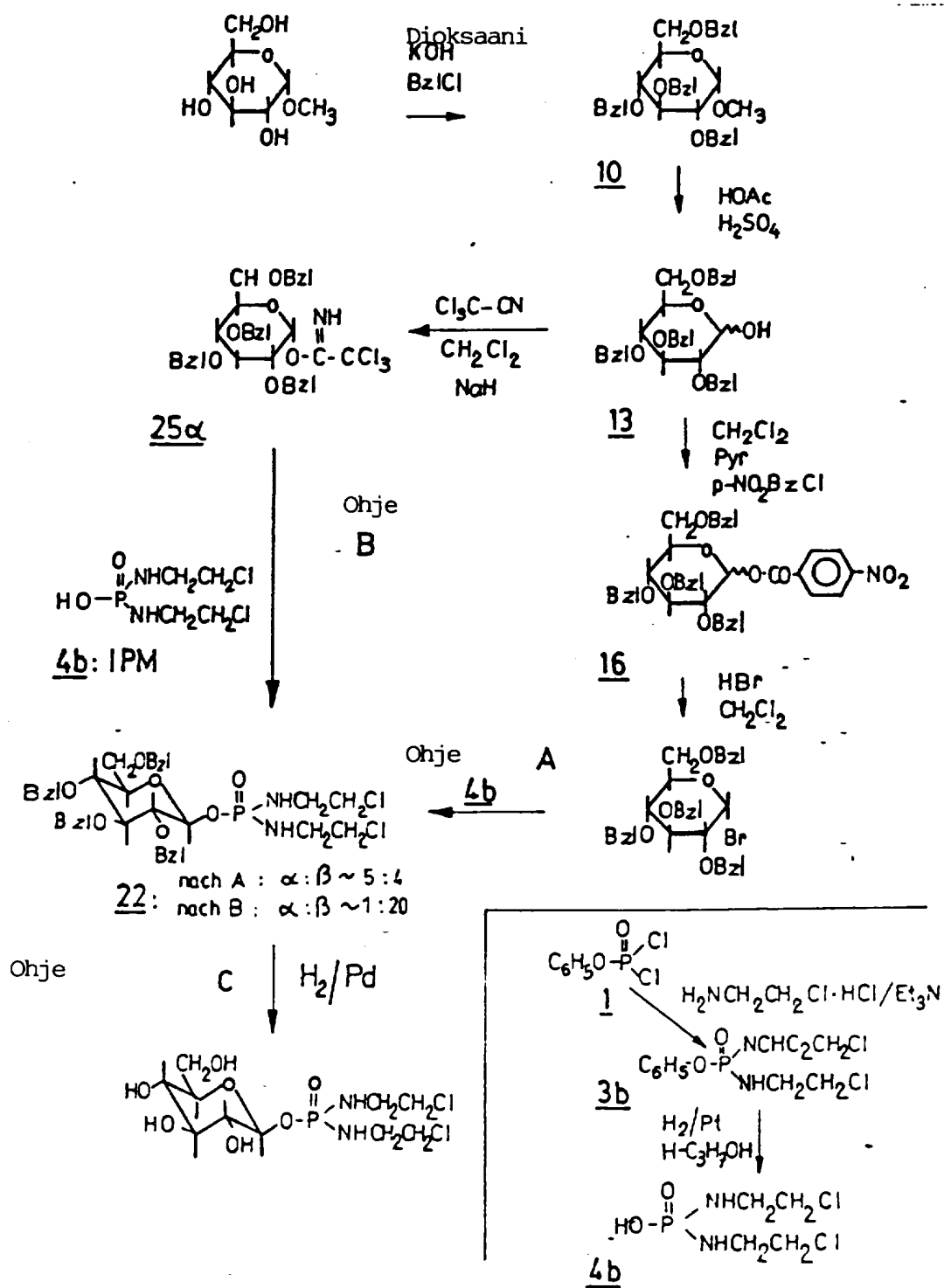
Kuvio 12: Glc- β -IPM:llä käsiteltyjen naaraspuolisten (a) ja koiraspuolisten (b) hiirien eloonjääntiajat; käsittelykaavio: 5.1 o.a. annos 1. - 5. päivänä; (NC1-tutkimuksen tulos)



Kuvio 13: Siirretyn 1C32-tuumorin kasvu hoidettaessa Gal-IPM:llä (5·1 annos); a) tuumorimäärän kasvu, b) tuumorimäärän kasvu prosentteina kontrollin suhteen



Kuvio 14: Yhdisteen 28β esimerkkisynteesi



Kuvio 15: Disakkaridi-IPM-konjugaattien 50 ja 51 synteesi lähdettäessä hepta-O-bentsyylligluukoosista 43 ja 44

