



FI000091071B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT****91071****C (45) Patentti myönnetty**
Patent meddelat 10 05 1991

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07J 41/00**S U O M I - F I N L A N D****(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus**
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	880103
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	11.01.88
(24) Alkupäivä - Löpdag	11.05.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	11.01.88
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.94
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/JP87/00288
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
12.05.86 JP 61-108228 P	04.09.86 JP 61-208380 P

(71) Hakija - Sökande

1. Mect Corporation, 1-1, Nishishinjuku 2-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 163, Japan, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Ogura, Haruo, 5-5, Tokiwadairajinyamae, Matsudo-shi, Chiba-ken 270, Japan, (JP)
2. Furuhashi, Kimio, 31-4, Narimasu 4-chome, Itabashi-ku, Tokyo 175, Japan, (JP)
3. Sato, Shingo, No. 201, Fujisawa Corpo, 499-1, Shimofujisawa, Iruma-shi, Saitama-ken 358, Japan, (JP)
4. Ito, Masayoshi, 27-22-303, Fujimidai 1-chome, Kunitachi-shi, Tokyo 186, Japan, (JP)
5. Shitori, Yoshiyasu, 12-6-1307, Nishishinjuku 6-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan, (JP)
6. Nagai, Yoshitaka, 29-10, Akazutsumi 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Kolster Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä terapeutisesti aktiivisen sialosyylikolesterolin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av terapeutiskt aktiv sialosylkolesterol

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 79542 (C 07H 15/04), EP A 166442 (C 07H 17/04),
Wikon Yakugakkai nro 105 Wenta Koen Yoshi-Shu julk. 10.3.1985 tiivistelmä p. 633 alaosa

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee sialosyylikolesterolin natriumsuolaa. Keksinnön mukaisella yhdisteellä on erinomainen vesiliukoisuus ja siksi yhdiste on hyvin käyttökelpoinen lääkkeenä, joka on tarkoitettu ääreis- tai keskushermostojen vaurioiden aiheuttamien erilaisten sairauksien hoitoon.

Föreliggande uppfinning avser ett natriumsalt av sialosylkolesterol. Föreningen enligt uppfinningen har utmärkt löslighet i vatten och är därvid mycket användbar som läkemedel för botande av olika sjukdomar, vilka härstammar från skador på de perifera eller centrala nerverna.

Menetelmä terapeutisesti aktiivisen sialosyylikolesterolin valmistamiseksi

5 Tämä keksintö koskee menetelmää sialosyylikolesterolin valmistamiseksi, joka on käyttökelpoinen ääreis- ja keskushermostojen vaurioiden aiheuttamien erilaisten sairauksien hoitoon käytettävänä aineena.

10 Tähän asti on ollut tunnettua, että siaalihappoa esiintyy monien eläimien elimistössä ja muutamien bakteerien solupinnalla sialyloituneena molekyylikompleksina, esimerkiksi glykoproteiinina, glykolipidinä, oligosakkaridina tai polysakkaridina.

15 Viime aikoina on ajateltu, että tämä yhdiste on tärkeä lääketieteellisesti ja farmaseuttisesti hermostominnan, syövän, tulehdusten, immunitetin, virusinfektioiden, erilaistumisen, hormonireseptorien tms. yhteydessä. Tähän yhdisteeseen on lisäksi kiinnitetty paljon huomiota solun pinnalla sijaitsevana erikoisena aktiivisena aineena. Siaalihapon roolia sialyloituneessa molekyylikompleksissa ei kuitenkaan ole vielä saatu selville.

20 Monet luonnonainekemistit ovat lisäksi tutkineet tätä yhdistettä ja on saatu aikaan sen monia johdoksia. Vielä ei kuitenkaan ole valmistettu johdoksia, joilla olisi merkittävää fysiologista aktiivisuutta.

25 Verta muodostavan elimen pahalaatuisen kasvaimen, monenlaisten syöpien ja kollageenisairauden lääketieteellisessä hoidossa tapahtuneet erilaiset parannukset ovat lisäksi todella pidentäneet ihmisen keskimääräistä elinikää. Nämä edistysaskeleet ovat kuitenkin väistämättömästi 30 lisänneet lääkkeiden, kuten lisämunuaisen kuoren hormonin, immuunisuppressanttien jne., käyttöä. Siksi on tullut esiin joukko epätoivottavia sivuvaikutuksia, kuten immuunikompetenssin aleneminen.

35 Tämän keksinnön tekijät ovat kiinnittäneet erityistä huomiota siaalihappoon, joka on biologisesti luontainen

aineosa ja tehneet intensiivisiä tutkimuksia, jotka koskevat immuunijärjestelmää säätelevää ainetta, jolla ei ole käytännöllisesti katsoen ollenkaan sivuvaikutuksia ja jolla on immuunivalvontaa säätelevä vaikutus, muuntamalla kemiallisesti siaalihappoa. Tuloksena tämän keksinnön tekijät ovat valmistaneet sialosyylikolesterolia, joka on käyttökelpoinen hermosairauslääkkeenä. Tämä perustuu havaintoon, että keksinnön mukaisesti valmistettu sialosyylikolesteroli edistää hiirestä peräisin olevien neuroblastoomasolujen (Neuro 2a) neuriiittien kasvua, kun sialosyylikolesterolin aktiivisuutta tutkitaan lisäämällä sitä Neuro 2a -viljelmään.

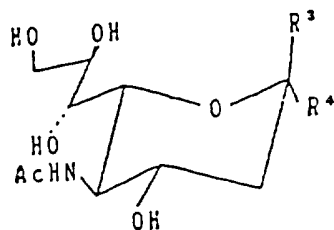
Julkaisussa Nihon Yakugakkai nro 105 esitetään menetelmä, jossa metyyli-2-kloori-4,7,8,9-tetra-O-asetyyli-neuraminaatti (jäljempänä mainittu yhdiste 1) saatetaan reagoimaan kolesterolin kanssa. Saatu yhdiste on kuitenkin selvästi erilainen kuin esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistetut yhdisteet, sillä tunnetussa yhdisteessä on monia suojaryhmiä, kuten O-asetyyli-ryhmiä, N-asetyyli-ryhmä ja $(\text{COOCH}_3)_n\text{CH}_3$ -ryhmä, ja se on siten polyfunktionaalinen. Esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistettujen yhdisteiden ja tunnetun yhdisteen kemiallisen rakenteen erojen vuoksi uusilla yhdisteillä on lisäksi ylivoimaiset kemialliset, biologiset ja farmakologiset vaikutukset tunnettuun yhdisteeseen verrattuna.

Tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota käytettäväksi menetelmä sialosyylikolesterolin valmistamiseksi. Keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet ovat käyttökelpoisia erityisesti hermosairauslääkkeenä.

Koska keksinnön mukaisesti valmistettu sialosyylikolesteroli esiintyy Na-suolamuodossa, on kolesteroli myös erinomaisesti veteen liukeneva, mikä laajentaa kolesterolin käyttöaluetta.

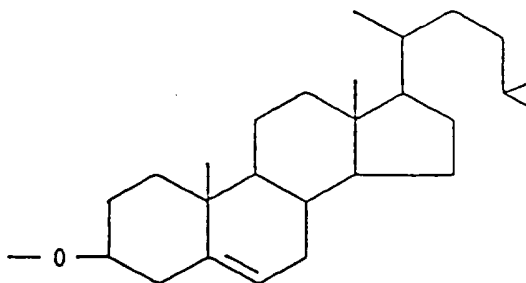
Tämä keksintö koskee menetelmää yhdisteen valmistamiseksi, jolla on yleinen kaava

3

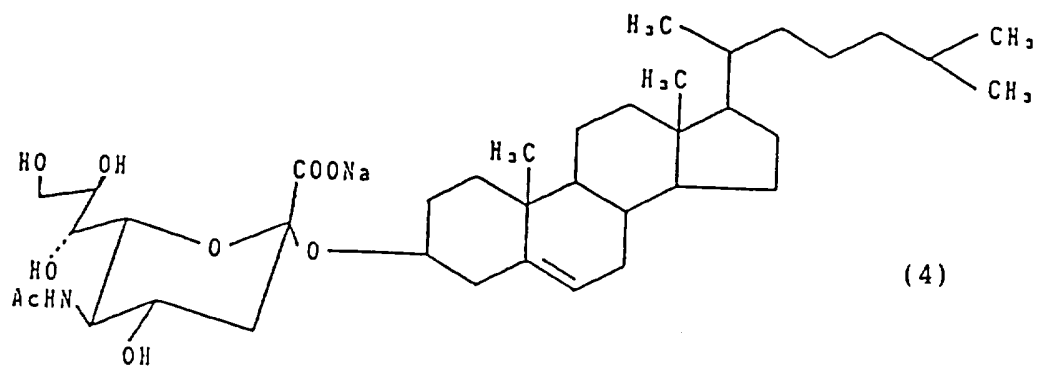


(B)

jossa toinen ryhmistä R^3 ja R^4 on $-\text{COONa}$ ja toinen ryhmä,
jolla on kaava

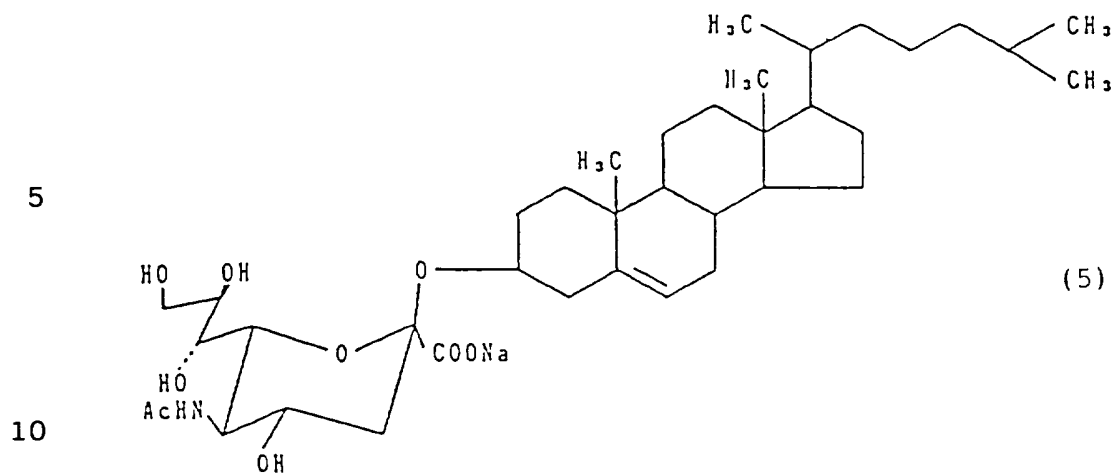


toisin sanoen yhdisteen valmistamiseksi, jolla on kaava



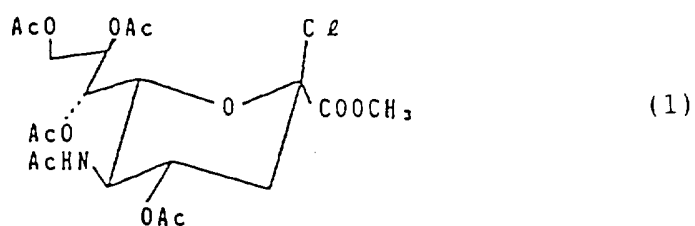
(4)

tai kaava



jolloin menetelmälle on tunnusomaista, että saatetaan yhdiste, jolla on kaava

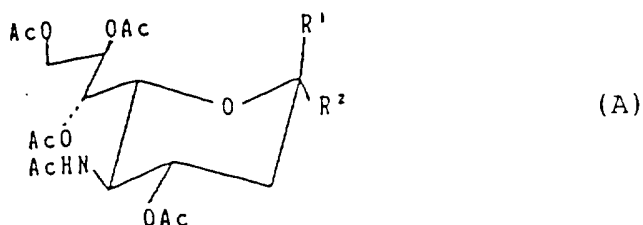
15



20

reagoimaan kolesterolin kanssa Koenigs-Knorr-katalysointireaktion läsnäollessa, jolloin muodostuu yhdiste, jolla on yleinen kaava

25



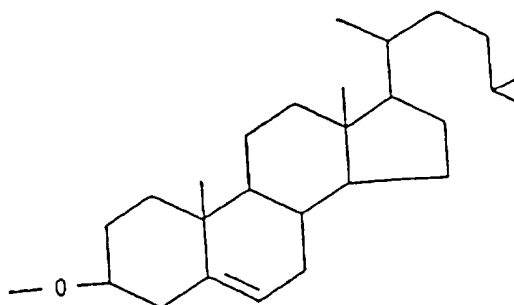
30

jossa toinen ryhmistä R^1 ja R^2 on $-\text{COOCH}_3$ ja toinen ryhmä, jolla on kaava

35

5

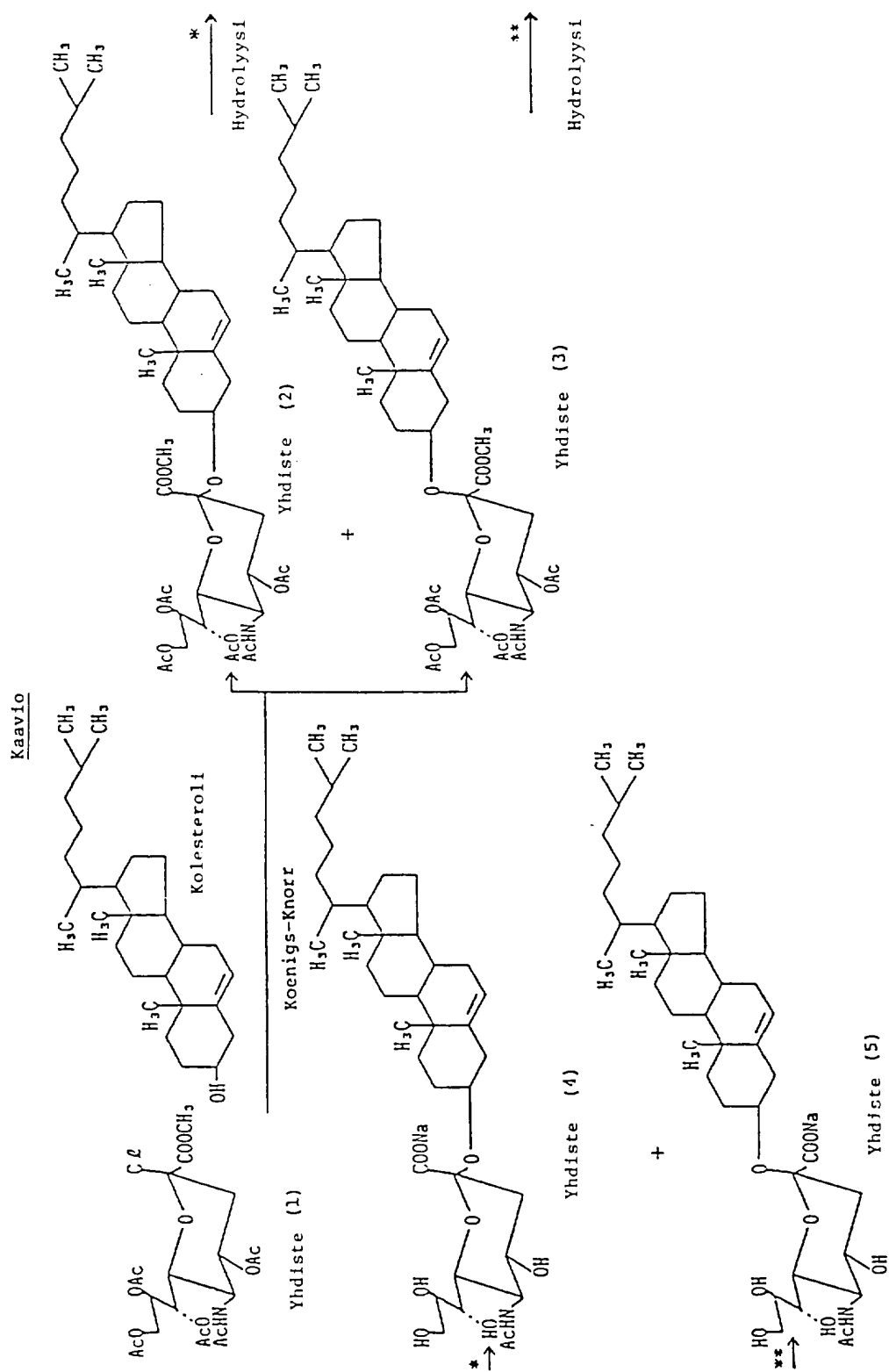
5



10 ja hydrolysoidaan sitten yhdiste (A).

Keksintöä selostetaan yksityiskohtaisesti jäljempänä.

15 Keksinnön mukaisesta menetelmässä yhdisteen 4 tai 5 valmistamiseksi esitetään yhteenveto seuraavan kaavion avulla.



Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä yhdiste (1) on tunnettu yhdiste ja kaupallisesti saatavissa.

Edellä mainitussa reaktiossa yhdiste (1) saatetaan reagoimaan kolesterolin kanssa Koenigs-Knorr-katalyytin läsnäollessa suunnilleen lämpötilassa 20 - 25 °C normaali-paineessa noin 1 - 7 vuorokauden ajan. Tässä tapauksessa kolesterolia saatetaan reagoimaan yhdisteen (1) kanssa mahdollisuhteessa noin 1 - 5 moolia kolesterolia yhtä moolia kohden yhdistettä (1).

Katalyytti voi olla elohopea(II)bromidi, elohopea-(II)syanidi, hopeaperkloraatti, hopeatrifluorimetaanisulfonaatti, hopeatrifluoriasetaatti tms. Katalyyttiä käytetään noin 1,0 - 1,2 ekvivalenttia yhtä ekvivalenttia kohden yhdistettä (1).

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettäviin liuottimiin kuuluvat asetonitriili, nitrometaani, asetoni, bentseeni, tetrahydrofuraani, dikloorimetaani jne. Niiden joukosta edullisia liuottimia ovat bentseeni, dikloorimetaani ja tetrahydrofuraani. Menetelmässä voidaan käyttää kuivausainetta. Kuivausaineena voidaan käyttää Drieriteä tai molekyylliseulaa 4A.

Tuloksena olevat yhdisteet (2) ja (3) erotetaan ja puhdistetaan tavanomaisella menetelmällä, kuten pylväskromatografialla.

Sitten yhdisteet hydrolysoidaan niiden metoksikarbonyyliryhmien muuttamiseksi natriumkarboksyyli ryhmiksi ja niiden asetyyliryhmien muuttamiseksi vetyryhmiksi. Tällä hydrolyysillä voidaan valmistaa yhdisteitä (4) tai (5). Tämä hydrolyysi tehdään yleensä jollakin tavanomaisella menetelmällä. Hydrolyysi tehdään esimerkiksi käsittelemällä yhdisteitä lämpötilassa noin 15 - 25 °C 5 - 15 tuntia emäsluoksella, jonka pitoisuus on noin 1 - 3 N.

Keksinnön mukaisesti valmistettu yhdistettä voidaan antaa suun kautta. Yhdistettä on kuitenkin edullista antaa silmään, inhaloimalla, lihakseen ruiskuttamalla, ihonalai-

sena ruiskeena tai laskimonsisäisenä ruiskeena. Annettava määrä vaihtelee sairauden asteen ja potilaan painon mukaan. Määrä on kuitenkin edullisesti 0,001 - 10 mg.

Tätä keksintöä selostetaan yksityiskohtaisemmin
5 esimerkkien avulla.

Esimerkki 1

Metyyli-5-asetoamidi-4,7,8,9-tetra-O-asetyyli-2-O-
asetyyli-2-O-(5-kolesten-3- β -yyli)-3,5-dideoksi- α -D-glyse-
ro-D-galakto-2-nonulopyranosaatin synteesi
10 0,77 g (2 mmol) ennalta täysin kuivattua koleste-
rolia liuotettiin liuottimeen (10 ml), kuten kuivattuun
metyleenikloridiin. Kun 0,5 g molekyyliseulaa 4A, joka oli
ennalta kuivattu alipaineessa korkeassa lämpötilassa, oli
lisätty kolesteroliliuokseen, sekoitettiin tuloksena ole-
15 vaa seosta 30 min - 1 tunti huoneen lämpötilassa argonvir-
rassa. Tähän seokseen lisättiin 1,02 g (2 mmol) yhdistettä
(1) ja sitten 2 - 2,4 mmol hopeatrifluorimetaanisulfonaat-
tia. Tuloksena olevaa seosta sekoitettiin sitten yksi yö
huoneen lämpötilassa kallistetun valon alla reaktion ai-
20 kaansaamiseksi.

Reaktioliuos suodatettiin Celiten avulla. Hopea-
suola poistettiin kyllästetyllä suolaliuoksella. Seos kui-
vattiin vedettömällä natriumsulfaatilla tms. Sitten pois-
tettiin liuotin tislamalla alipaineessa, jolloin saatiin
25 valkea kiinteä aine.

Valkoiselle kiinteälle aineelle tehtiin pylväskro-
matografia (silikageeli) yhdisteiden (2) ja (3) erottami-
seksi ja puhdistamiseksi. Saatiin 0,56 g (33 %) yhdistettä
(2) ja 0,55 g (32 %) yhdistettä (3).

30 Yhdisteen (2) fysikaaliset ominaisuudet:

Massa (EI) m/z 860 (M+1), 800 (m-59)

Alkuaineanalyysi (%) yhdisteelle C₄₇H₇₃O₁₃N

Laskettu: C 65,63 H 8,55 N 1,63

Saatu: C 65,41 H 8,61 N 1,60

35 $[\alpha]_D^{25}$ -23,8° (c = 1, kloroformi)

sp. 113 - 115 °C

IR ν film 3250, 2940, 1745, 1660 ja 1540 cm^{-1}
max

^1H NMR CDCl_3 $\delta(\text{TMS})$ 400 MHz

- 5 0,669 3H, s, CH_3 -18
0,985 3H, s, CH_3 -19
1,883 3H, s, NAc
2,026, 2,031, 2,126, 2,145, 3H x 4, s x 4, OAc x 4
2,596 1H, dd, $J = 5,2, 12,8$ Hz, 2-Heq
10 3,650 1H, m, H-3
3,790 3H, s, COOMe
4,02 - 4,09 2H, m, H-4', H-5'
4,166 1H, dd, $J = 5,8, 12,5$ Hz, Ha-8'
4,347 1H, dd, $J = 2,5, 12,8$ Hz, Hb-8'
15 4,854 1H, ddd, $J = 5,2, 9,8, 12,0$ Hz, H-3'
5,205 1H, d, $J = 10,1$ Hz, NH
5,33 - 5,37 2H, m, H-6', 7'

Yhdisteen (3) fysikaaliset ominaisuudet:

Massa (EI) m/z 860 (M+1), 800 (M-59)

20 Alkuaineanalyysi (%) yhdisteelle $\text{C}_{47}\text{H}_{73}\text{O}_{13}$ ^{13}N

Laskettu: C 65,63 H 8,55 N 1,63

Mitattu: C 65,89 H 8,58 N 1,66

$[\alpha]_D^{25} -40,2^\circ$ ($c = 1$, kloroformi)

sp. 138 - 140 $^\circ\text{C}$

25 IR ν film 3420, 3250, 2930, 1740, 1660 ja 1540 cm^{-1}
max

^1H NMR CDCl_3 $\delta(\text{TMS})$ 400 MHz

- 30 0,670 3H, s, CH_3 -18
0,999 3H, s, CH_3 -19
1,871 3H, s, NAc
2,021, 2,021, 2,077, 2,130, 3H x 4, s x 3, OAc x 4
2,525 1H, dd, $J = 4,9, 13,1$ Hz, Heq-2'
3,572 1H, m, H-3
35 3,798 3H, s, COOCH_3
4,04 - 4,13 2H, m, H-4', 5'
4,146 1H, dd, $J = 7,6, 12,5$ Hz, Ha-8'
4,888 1H, dd, $J = 1,8, 12,5$ Hz, Hb-8'

5,07 1H, tt, $J = 2,0, 8,2\text{Hz}$, H-7'

5,22 - 5,27 H, m, H-3'

5,34 - 5,38 2H, m, NH, H-6'

Esimerkki 2

5 5-asetoamidi-2-O-(5-kolesten-3- β -yyli)-3,5-dideoksi- α -D-glysero-D-galakto-2-nonulopyranosonihapon synteesi
 Esimerkissä 1 valmistettu yhdiste (2) liuotettiin etanoliin (2 ml). Liuokseen lisättiin 3 ml natriumhydroksidin 1 N vesiliuosta ja sekoitettiin sitten yksi yö huoneen lämpötilassa. Kun saatuun liuokseen oli lisätty 2 ml vettä, liuos neutraloitiin Dowex 50:llä (H'), erotettiin pieni sakka suodattamalla ja kuivattiin suodos alipaineessa, jolloin saatiin 31,4 mg (79,7 %) yhdistettä (4) (valkea jauhe).

15 30,0 mg (76,1 %) yhdistettä (5) valmistettiin yhdisteestä (3) edellä kuvatulla tavalla.

Yhdisteen (4) fysikaaliset ominaisuudet:

IR ν film 2750, 1570 cm^{-1}
 max

20

^1H NMR CDCl_3 $\delta(\text{TMS})$ 90 MHz

0,71 3H, s, CH_3 -18

0,84 ja 0,91 6H, CH_3 -26 ja CH_3 -27

0,95 3H, d, $J = 4,5\text{ Hz}$, CH_3 -21

25

1,00 3H, s, CH_3 -19

2,01 3H, s, NAc

2,43 1H, dd, $J = 4,5$ ja $12,6\text{ Hz}$, 3-Heq

$[\alpha]_D^{22} -12,58^\circ$ ($c = 0,41$, metanolissa)

Yhdisteen (5) fysikaaliset ominaisuudet:

30 IR ν KBr max 2870, 1620 ja 1550 cm^{-1}

^1H NMR CD_3OD $\delta(\text{TMS})$ 90 MHz

0,71 3H, s, CH_3 -18

0,86 ja 0,92 6H, CH_3 -26 ja CH_3 -27

0,95 3H, d, $J = 4,5\text{ Hz}$, CH_3 -21

35

1,00 3H, s, CH_3 -19

2,00 3H, s, NAc

2,39 1H, dd, $J = 4,5$ ja $12,6\text{ Hz}$, 3-Heq

$[\alpha]_D^{20} -31,77^\circ$ ($c = 0,78$, metanolissa)

Esimerkki 3

50 mg yhdistettä (2), metyyli-5-asetoamidi-4,7,8,9-tetra-O-asetyyli-2-O-(5-kolesten-3- β -yyli)-3,5-dideoksi- α -D-glysero-D-galakto-2-nonulopyranosonaattia, liuotettiin metanoliin (100 ml). Tähän liuokseen lisättiin ti-
5 poittain noin 20 ml 2 N natriumhydroksidin vesiliuosta sekoittaen, jolloin saatiin noin 0,2 N natriumhydroksidi-metanoliliuos, jota sitten sekoitettiin yksi yö huoneen lämpötilassa yhdisteen saippuoimiseksi.

10 Saatuun liuokseen lisättiin seuraavaksi Dowex 50W -hartsia (H⁺) sekoittaen. Kun liuoksen pH oli siirtynyt happamalle alueelle (pH noin 4), hartsi poistettiin. Sit-
ten liuos kuivattiin alipaineessa, jolloin saatiin valkea jauhe, 5-asetoamidi-2-O-asetyyli-(5-kolesten-3- β -yyli)-
15 3,5-dideoksi- α -D-glysero-D-galakto-2-nonulopyranosonihap-
po. Tämä jauhe liuotettiin natriumhydroksidin 0,02 N vesi-
liuokseen. Saatu liuos johdettiin Dianon HP 20 -hartsia sisältävän kromatografiapylvään läpi, jolloin tapahtui
20 adsorboituminen hartsiin, joka pestiin vedellä. Kun oli
eluoitu 75 % metanolia sisältävällä vesiliuoksella, me-
tanoli poistettiin tislamalla ja tehtiin kylmäkuivaus,
jolloin saatiin 37 mg (91 %) valkeaa jauhetta, natrium-5-
asetoamidi-2-O-(5-kolesten-3- β -yyli)-3,5-dideoksi- α -D-gly-
sero-D-galakto-2-nonulopyranosonaattia [yhdiste (4)]. Yh-
25 disteen (4) fysikaaliset ominaisuudet olivat suurin piir-
tein samat kuin esimerkin 2 mukaisen yhdisteen.

Esimerkki 4

50 mg yhdistettä (2) liuotettiin metanoliin (100 ml), johon lisättiin 20 ml natriumhydroksidin 2 N vesi-
30 liuosta. Saatua liuosta sekoitettiin yksi yö huoneen läm-
pötilassa saippuoitumisen aikaansaamiseksi. Kun liuokseen
oli lisätty Dowex 50W:tä (H⁺) ja sekoitettu seosta, seoksen
pH asettui arvoon 7 - 8. Seokselle tehtiin imusuodatus ja
sen jälkeen pesu metanolilla hartsin poistamiseksi. Suo-
35 dos ja pesuun käytetty metanoli yhdistettiin ja metanoli
tislattiin pois. Saostunut valkoinen liukenematon aine

suodatettiin ja kylmäkuivattiin sitten, jolloin saatiin 39 mg (96 %) valkeaa jauhetta [yhdiste (4)].

Yhdisteen fysikaaliset ominaisuudet:

Massa (FD) m/z 722 (M+Na), 700 (M+1), 386, 336 ja 314

5 Alkuaineanalyysi (%) yhdisteelle $C_{38}H_{62}O_9NNA \cdot 2H_2O$

Laskettu: C 61,96 H 8,42 N 1,90

Mitattu: C 61,92 H 8,71 N 2,04

$[\alpha]_D^{24} +22^\circ$ (c = 1,0 metanoli)

IR $\nu_{\max}^{KBr}$ 3250, 2940 ja 1605 cm^{-1}

10 1H NMR CD_3OD $\delta(TMS)$ 400 MHz

0,704 3H, s, CH_3 -18

0,870 ja 0,885 3H x 2, d, J = 1,7 Hz,

CH_3 -26, CH_3 -27

0,936 3H, d, J = 6,5 Hz, CH_3 -21

15 0,992 3H, s, CH_3 -19

2,010 3H, s, NAc

2,839 1H, dd, J = 4,2 ja 12,0 Hz, 2'-Heq

5,332 1H, d, J = 5,5 Hz, 6-H

^{13}C NMR CD_3OD $\delta(TMS)$ 100 MHz

20 175,91 NAc,

175,26 1'-COONa

142,87 C-5

122,59 C-6

102,57 C-1'

25 70,50 C-3

41,00 C-2

Esimerkki 5

Toistettiin muuten esimerkin 3 mukainen menetelmä, mutta käytettiin yhdistettä (3), metyyli-5-asetoamidi-
30 4,7,8,9-tetra-O-asetyyli-2-O-(5-kolesten-3- β -yyli)-3,5-dideoksi- β -D-glysero-D-galakto-2-nonulopyranosonaattia yhdisteen (2) tilalla, jolloin saatiin 36 mg (88 %) yhdistettä (5), natrium-5-asetoamidi-2-O-(5-kolesten-3- β -yyli)-3,5-dideoksi- β -D-glysero-D-galakto-2-nonulopyranosonaattia.
35 Yhdisteen (5) fysikaaliset ominaisuudet olivat suurin piirtein samat kuin esimerkin 2 mukaisen yhdisteen.

Esimerkki 6

Toistettiin muuten esimerkin 4 mukainen menettely, mutta käytettiin yhdistettä (3) yhdisteen (2) tilalla, jolloin saatiin yhdistettä (5) (40 mg, 98 %).

5 Yhdisteen (5) fysikaaliset ominaisuudet:

Massa (FD) m/z 722 (M+Na), 700 (M+1) ja 386

Alkuaineanalyysi (%) yhdisteelle $C_{38}H_{62}O_9NNa \cdot H_2O$

Laskettu: C 63,52 H 8,91 N 1,95

Mitattu: C 63,81 H 9,25 N 2,13

10 $[\alpha]_D^{24} -10,6^\circ$ (c = 1,0, metanoli)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3270, 2950 ja 1608 cm^{-1}

^1H NMR CD_3OD $\delta(\text{TMS})$ 400 MHz

0,700 3H, s, CH_3 -18

0,861 ja 0,880 3H x 2, d, J = 1,5 Hz,

15 CH_3 -26, CH_3 -27

0,928 3H, d, J = 6,5 Hz, CH_3 -21

0,991 3H, s, CH_3 -19

1,972 3H, s, NAc

2,482 H, dd, J = 4,5 ja 13,0 Hz, 2'-Heq

20 5,282 1H, d, J = 5,3 Hz, 6-H

^{13}C NMR CD_3OD $\delta(\text{TMS})$ 100 MHz

176,95 NAc,

174,51 1'-COONa

143,08 C-5

25 122,46 C-6

10,37 C-1'

72,37 C-3

43,82 C-2'

Esimerkki 7

30 50 mg yhdistettä (2) liuotettiin vedettömään metanoliin (100 ml). Tähän liuokseen lisättiin 0,02 ml
28-%:ista natriummetylaattiliuosta ja sekoitettiin sitten tuloksena olevaa liuosta noin yksi tunti huoneen lämpötilassa deasetyloitumisen aikaansaamiseksi. Sitten tuloksena olevaan liuokseen lisättiin Dowex Wx8 -hartsia (H^+),
35 sekoitettiin liuosta ja neutraloitiin se. Liuos imusuoda-

tettiin ja pestiin metanolilla hartsin poistamiseksi. Suodos ja pesuun käytetty metanoli yhdistettiin ja lisättiin sitten 20 ml 2 N natriumhydroksidin vesiliuosta liuokseen, jota sekoitettiin yön yli huoneen lämpötilassa, jolloin tapahtui saippuoituminen. Saippuoituun liuokseen lisättiin Amberlite IRC-50 -hartsia (H⁺). Tuloksena olevaa liuosta sekoitettiin ja sen pH säädettiin arvoon 5 - 7. Liuokselle tehtiin imusuodatus ja sen jälkeen metanolipesu hartsin poistamiseksi. Suodos ja pesuun käytetty metanoli yhdistettiin ja kuivattiin alipaineessa metanolin tislaukseksi pois. Pieni määrä saostunutta valkeaa liukenematonta materiaalia suodatettiin ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 38 mg (93 %) valkeaa jauhetta [yhdiste (4)]. Yhdisteen fysikaaliset ominaisuudet olivat suurin piirtein samat kuin esimerkin 2 mukaisen yhdisteen.

Esimerkki 8

Toistettiin muuten esimerkin 7 mukainen menetelmä, mutta käytettiin yhdistettä (3) yhdisteen (2) tilalla, jolloin saatiin 35 mg (86 %) yhdistettä (5). Yhdisteen fysikaaliset ominaisuudet olivat suurin piirtein samat kuin esimerkin 2 mukaisen yhdisteen.

Esimerkki 9

Injektiokoostumus

Ampulliin pakattiin 2,5 mg keksinnön mukaista yhdistettä, 0,25 mg natriumdivetyfosfaattihydraattia, 3 mg dinatriumvetyfosfaattidodekahydraattia ja tislattua, injektioihin tarkoitettua vettä, jolloin saatiin injektio-koostumus, jonka kokonaismäärä oli 1 ml.

Esimerkki 10

Ennen käyttöä liuotettava injektio-koostumus

Injektio-koostumus, joka valmistettiin sekoittamalla 0,5 mg keksinnön mukaista yhdistettä ja 1 ml fysiologista suolaliuosta ja tekemällä kylmäkuivaus, pakattiin pulloon ja lisättiin pulloon 1 ml tislattua vettä, jolloin injektio-koostumus liukeni.

Esimerkki 11

Silmään annettavaksi tarkoitettu koostumus

Pulloon pakattiin 1 mg keksinnön mukaista yhdistettä, 52,5 mg boorihappoa, 14,5 mg booraksia, sopiva määrä
5 bentsalkoniumkloridia ja silmään annettavaksi sopivaa liu-
kenemisen aikaansaavaa liuosta, jolloin saatiin silmään
annettava koostumus, jonka kokonaismäärä oli 5 ml.

Esimerkki 12

Inhalaatiokoostumus

10 Keksinnön mukainen yhdiste jauhettiin agaattihuh-
maressa hienojakoiseksi jauheeksi, jossa hiukkasläpimitta
oli 1 - 20 µm. Jauheeseen lisättiin laktoosia, jauhettiin
ja sekoitettiin keskenään. Seokseen lisättiin edelleen
laktoosia vähitellen ja aineosat jauhettiin hienojakoisik-
15 si ja sekoitettiin hyvin keskenään, jolloin saatiin tritu-
raatio 20 - 40. 20 - 40 mg jauhetta pakattiin kapseliin
tai pulveripaperiin tavanomaisella menetelmällä. Kapselia
käytettiin jauheaerosoliin. Paperiin pakattua jauhetta
käytettiin nesteaerosoliin.

20 Seuraavassa kuvataan kokeita, jotka tehtiin keksin-
nön mukaisesti valmistetun yhdisteen neuriittien kasvua
edistävän vaikutuksen vahvistamiseksi.

Koe 1

25 Vaikutus Neuro 2a -kannan neuroblastoomasolun pro-
liferaatioon

Neuro 2a -solut laitettiin kellumaan kasvualustal-
le, joka koostui Dulbecco's Modified Eagle's Medium -alus-
tasta (90 %) ja naudan sikiöseerumista (FCS, 10 %) ja si-
sälsi 100 yksikköä/ml penisilliini G:tä ja 100 µ/ml strep-
30 tomyysiinisulfaattia, ja viljeltiin sitten lämpötilassa
37 °C hiilidioksidi-inkubaattorissa, joka sisälsi ilmaa,
johon oli sisällytetty 5 % hiilidioksidia. Käytetty astia
oli polystyreenimalja, jonka läpimitta oli 60 mm. Kuhunkin
maljaan siirrostettiin 1 - 2 x 10⁴ neuroblastoomasolua ja
35 viljeltiin 48 tuntia. FCS-pitoinen kasvualusta poistettiin
tuloksena olevasta soluviljelmästä. Viljelmään, joka ei

sisältänyt FCS:ää (tämä viljelmä sisälsi 100 % MEM-alustaa ja antibioottipitoisuudet olivat samat kuin viljelmässä ennen FCS:n poistamista), lisättiin tutkittaviksi näytteiksi yhdistettä (4) (taulukko 1), yhdistettä (5) (taulukko 2), $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{-GalNac}(\beta 1-4)\text{<NACNeu}(\alpha 2-3)\text{>Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{-keramidia}$ (tästäedessä käytetään lyhennettä GM) (taulukko 3) ja $\text{<NACNeu}(\alpha 2-8)\text{NACNeu}(\alpha 2-3)\text{>Gal}(\beta 1-3)\text{GalNac}(\beta 1-4)\text{NACNeu}(\alpha 2-8)\text{<NACNeu}(\alpha 2-3)\text{>Bal}(\beta 1-4)\text{-Glc}(\beta 1-1)\text{-keramidia}$ (tästäedessä käytetään lyhennettä GQ_{1b}) (taulukko 4) ennalta määrättyt määrät, ja jatkettiin viljelyä. Kun oli kulunut 24 - 48 tuntia näiden lääkkeiden lisäämisestä, mitattiin elävien solujen lisääntynyt lukumäärä viljelmässä, neuriittien lisääntynyt määrä ja neuriittien pituus. Koe tehtiin kolmella maljalla kunkin pitoisuuden suhteen. Saadut tulokset ilmoitettiin keskiarvona + standardipoikkeamana (S.E.).

Yhdisteen (4), GM_1 :n ja GQ_{1b} :n pienimmät vaikuttavat pitoisuudet 48 tunnin kuluttua näiden lääkkeiden lisäämisestä viljelmään olivat 10 ng/ml, 10 μ /ml ja vastaavasti 10 μ /ml. Kun otetaan huomioon näiden aineiden molekyylipainot, on yhdisteen (4) aktiivisuus 420 kertaa niin suuri kuin GM_1 :n ja 270 kertaa niin suuri kuin GQ_{1b} :n. Yhdisteen (5) pienin vaikuttava pitoisuus 48 tunnin kuluttua lääkkeen lisäämisestä on 100 mg/ml ja yhdisteen (5) aktiivisuus on 42 kertaa niin korkea kuin GM_1 :n ja 27 kertaa niin suuri kuin GQ_{1b} :n.

GM_1 :llä ja GQ_{1b} :llä ei lisäksi ole mitään vaikutusta viljelyn kestätyä 24 tuntia. Yhdisteet (4) ja (5) osoittivat sen sijaan aktiivisuutta 24 tunnin viljelyaikana, kun näitä yhdisteitä käytettiin pitoisuutena 10 mg/ml. Nämä tulokset osoittavat selvästi, että yhdisteillä (4) ja (5) on voimakas neuriittien kasvua edistävä vaikutus.

Akuutin toksisuuden testaaminen

Akuutti toksisuus testattiin injektoimalla laskimon sisäisesti yhdisteitä 45 viikon ikäisiin ddy-uroshiiriin. Tulokset osoittavat, että yhdisteiden (4) ja (5) LD_{50} -arvot ovat 93 mg/kg ja vastaavasti 291 mg/kg.

Taulukko 1

24 tuntia

Tutkittava näyte	Solujen kokonaismäärä	Solujen, joissa tapahtui neuritiittikasvua, lukum.	Neuritiittien kasvusuhte (%)	Neuritiitin pituus +S.E. ($\mu\text{m}/\text{solu}$)	Neuritiittien lukumäärä +S.E. ($\text{kp1}/\text{solu}$)
VERTAILU	417	169	40,5	79,4 $\pm$ 2,43	1,3 $\pm$ 0,04
Yhdiste (4) 10 ng/ml	416	131	31,5	92,4 $\pm$ 5,31***	1,2 $\pm$ 0,04
Yhdiste (4) 100 ng/ml	427	177	41,5	96,7 $\pm$ 4,12*	1,2 $\pm$ 0,03
Yhdiste (4) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	373	190	50,9	130,4 $\pm$ 6,12*	1,2 $\pm$ 0,03
Yhdiste (4) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	U.C.	U.C.	-	U.C.	U.C.

48 tuntia

VERTAILU	483	206	42,7	103,6 $\pm$ 4,08	1,2 $\pm$ 0,03
Yhdiste (4) 10 ng/ml	467	219	46,9	121,9 $\pm$ 5,18**	1,2 $\pm$ 0,03
Yhdiste (4) 100 ng/ml	404	193	47,8	126,0 $\pm$ 6,10**	1,2 $\pm$ 0,04
Yhdiste (4) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	369	182	49,3	156,3 $\pm$ 8,32*	1,2 $\pm$ 0,04
Yhdiste (4) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	U.C.	U.C.	-	U.C.	U.C.

U.C.: ei mitattavissa

* $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$

Taulukko 2

24 tuntia						
Tytäkittava näyte	Solujen kokonais- luku- määrä	Solujen, jois- sa tapahtui neuriittikas- vua, lukumäärä	Neuriittien kasvusuhte (%)	Neuriitin pituus $\pm$ S.E. (μ m/solu)	Neuriittien lukumäärä $\pm$ S.E. (kpl/solu)	
VERTAILU	417	169	40,5	79,4 $\pm$ 2,43	1,3 $\pm$ 0,04	
Yhdiste	(5) 10 ng/ml	361	34,3	89,4 $\pm$ 4,23***	1,3 $\pm$ 0,05	
Yhdiste	(5) 100 ng/ml	384	40,6	116,4 $\pm$ 5,59*	1,2 $\pm$ 0,03	
Yhdiste	(5) 1 μ g/ml	396	53,8	130,8 $\pm$ 5,16*	1,2 $\pm$ 0,04	
Yhdiste	(5) 10 μ g/ml	U.C.	-	U.C.	U.C.	
48 tuntia						
VERTAILU	483	206	42,7	103,6 $\pm$ 4,08	1,2 $\pm$ 0,03	
Yhdiste	(5) 10 ng/ml	472	47,9	110,6 $\pm$ 4,93	1,2 $\pm$ 0,04	
Yhdiste	(5) 100 ng/ml	422	50,2	135,1 $\pm$ 6,23*	1,3 $\pm$ 0,04	
Yhdiste	(5) 1 μ g/ml	454	55,5	138,9 $\pm$ 5,39*	1,2 $\pm$ 0,03	
Yhdiste	(5) 10 μ g/ml	U.C.	-	U.C.	U.C.	

U.C.: ei mitattavissa

*p<0,001, **p<0,01, ***p<0,05

Taulukko 3

24 tuntia

Tutkittava näyte	Solujen kokonais- luku- määrä	Solujen, jois- sa tapahtui neuriittikas- vua, lukum.	Neuriittien kasvusuhte (%)	Neuriitin pituus +S.E. ($\mu\text{m}/\text{solu}$)	Neuriittien lukumäärä +S.E. (kpl/solu)
VERTAILU	320	146	45,6	101,0 $\pm$ 6,04	1,3 $\pm$ 0,05
GM ₁ 10 ng/ml	334	145	43,4	94,9 $\pm$ 6,64	1,4 $\pm$ 0,05
GM ₁ 100 ng/ml	297	142	47,8	101,1 $\pm$ 5,09	1,4 $\pm$ 0,06
GM ₁ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	332	140	42,2	109,7 $\pm$ 6,44	1,4 $\pm$ 0,06
GM ₁ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	325	149	45,8	89,3 $\pm$ 4,77	1,4 $\pm$ 0,05
GM ₁ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	310	172	55,5	90,5 $\pm$ 3,88	1,8 $\pm$ 0,06

48 tuntia

VERTAILU	383	184	48,0	95,8 $\pm$ 4,61	1,4 $\pm$ 0,05
GM ₁ 10 ng/ml	333	194	58,3	93,7 $\pm$ 5,07	1,4 $\pm$ 0,05
GM ₁ 100 ng/ml	349	156	44,7	108,8 $\pm$ 5,97	1,4 $\pm$ 0,06
GM ₁ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	352	211	59,9	109,2 $\pm$ 6,09	1,3 $\pm$ 0,04
GM ₁ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	330	205	62,1	113,8 $\pm$ 5,49***	1,3 $\pm$ 0,04
GM ₁ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	317	193	60,9	98,9 $\pm$ 5,22	1,5 $\pm$ 0,05

***p<0,05

Taulukko 4

24 tuntia

Tutkittava näyte	Solujen kokonais- luku- määrä	Solujen, jois- sa tapahtui neuriittikas- vua, lukum.	Neuriittien kasvusuhte (%)	Neuriittien pituus +S.E. ($\mu\text{m}/\text{solu}$)	Neuriittien lukumäärä +S.E. (kpl/solu)
VERTAILU	320	146	45,6	101,0 $\pm$ 6,04	1,3 $\pm$ 0,05
CQ1b 10 ng/ml	336	174	51,8	88,5 $\pm$ 5,00	1,3 $\pm$ 0,05
CQ1b 100 ng/ml	331	159	48,0	86,0 $\pm$ 4,72	1,3 $\pm$ 0,04
CQ1b 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	308	157	51,0	97,6 $\pm$ 4,95	1,4 $\pm$ 0,05
CQ1b 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	321	205	63,9	114,9 $\pm$ 5,98	1,4 $\pm$ 0,06
CQ1b 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	U.C.	U.C.	-	U.C.	U.C.

48 TUNTIA

VERTAILU	383	184	48,0	95,8 $\pm$ 4,61	1,4 $\pm$ 0,05
CQ1b 10 ng/ml	371	158	42,6	100,4 $\pm$ 5,76	1,5 $\pm$ 0,06
CQ1b 100 ng/ml	347	153	44,1	90,4 $\pm$ 6,06	1,2 $\pm$ 0,04
CQ1b 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	384	182	47,4	106,5 $\pm$ 6,40	1,3 $\pm$ 0,04
CQ1b 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	346	214	61,8	122,5 $\pm$ 6,99**	1,3 $\pm$ 0,04
CQ1b 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	U.C.	U.C.	-	U.C.	U.C.

U.C.: ei mitattavissa

*** $p < 0,01$

Esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistettua yhdistettä ja julkaisusta Nihon Yakugakkai nro 105 tunnettua yhdistettä verrattiin keskenään seuraavassa vertailuko-
keessa.

- 5 Edellä esitetyssä kokeessa kuvatulla tavalla siirrostettiin jatkoviljeltyjä Neuro 2a -soluja viljelylevylle tiheytenä 10^4 solua/levy ja viljeltiin 48 tuntia. Sitten solut siirrettiin Dulbeccon modifioimaan Eaglen väliaineeseen, jossa ei ollut seerumia mutta joka sisälsi keksinnön mukaisesti valmistettua yhdistettä 4 tai tunnettua yhdistettä pitoisuutena 10^{-6} M. 24 tunnin viljelyn jälkeen neurii-
10 riittien pituus mitattiin ja ilmaistiin suhteellisena pituutena kontrollin pituuteen. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 5.

15

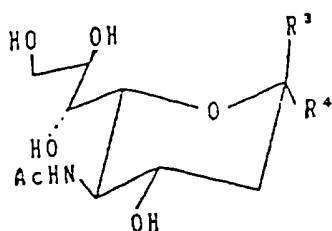
Taulukko 5

	<u>Lisätty yhdiste</u>	<u>Neuriitin suhteellinen pituus</u>
	Ei yhdistettä	1,00
20	Yhdiste 4	1,85
	Tunnettu yhdiste (metyyliesteri)	1,01

- 25 Tulokset osoittavat, että esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistetun yhdisteen 4 (Na-suola) vaikutus neuroblastoomasolun, Neuro 2a -kannan, lisääntymiseen on selvästi suurempi kuin tunnetulla yhdisteellä (metyyliesteri). Tällainen vaikutus viittaa siihen, että keksinnön mukaisesti valmistetut yhdisteet olisivat käyttökelpoisia
30 neurologisena lääkkeenä.

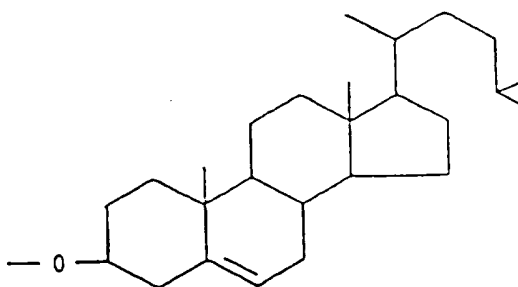
Patenttivaatimus

Menetelmä terapeuttisesti aktiivisen sialosyyliko-
lesterolin valmistamiseksi, jolla on yleinen kaava

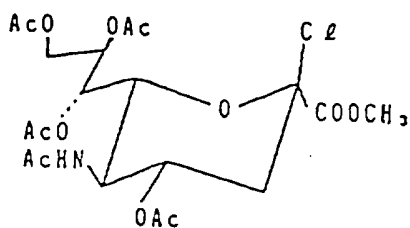


(B)

jossa toinen ryhmistä R^3 ja R^4 on $-COONa$ ja toinen ryhmä,
jolla on kaava



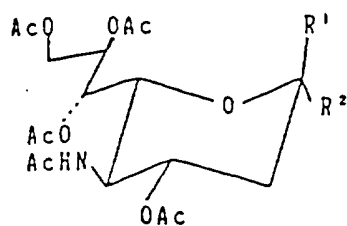
t u n n e t t u siitä, että saatetaan yhdiste, jolla on
kaava



(1)

reagoimaan kolesterolin kanssa Koenigs-Knorr-katalysaatto-
rin läsnäollessa, jolloin muodostuu yhdiste, jolla on
yleinen kaava

5

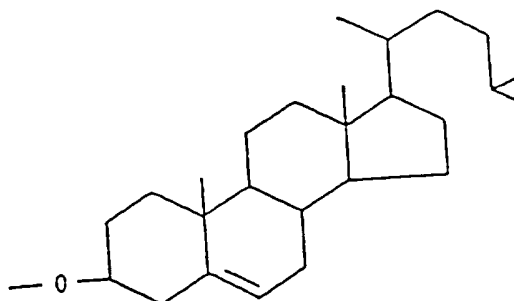


(A)

10

jossa toinen ryhmistä R^1 ja R^2 on $-\text{COOCH}_3$ ja toinen ryhmä, jolla on kaava

15

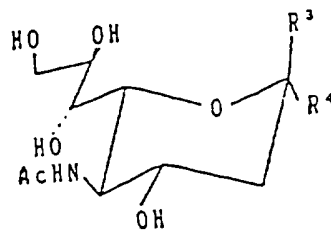


ja hydrolysoidaan sitten yhdiste (A).

Patentkrav

Förfarande för framställning av en terapeutiskt aktiv sialosylkolesterol med den allmänna formeln

5

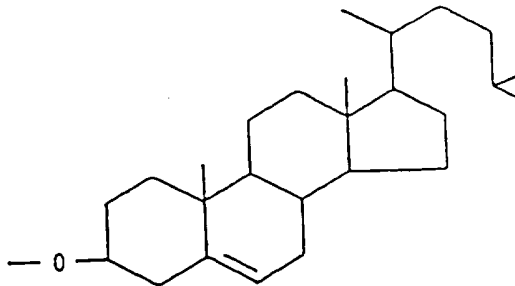


(B)

10

vari den ena av grupperna R^3 och R^4 är $-\text{COONa}$ och den andra är en grupp med formeln

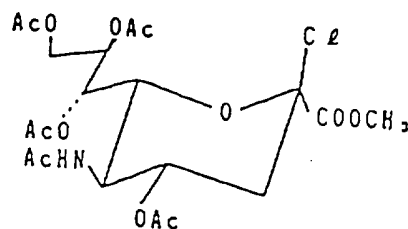
15



20

k ä n n e t e c k n a t därav, att man omsätter en förening med formeln

25



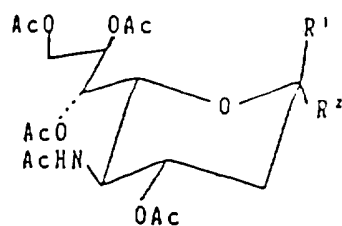
(1)

30

med kolesterol i närvaro av en Koenigs-Knorr-katalysator, varvid det bildas en förening med den allmänna formeln

35

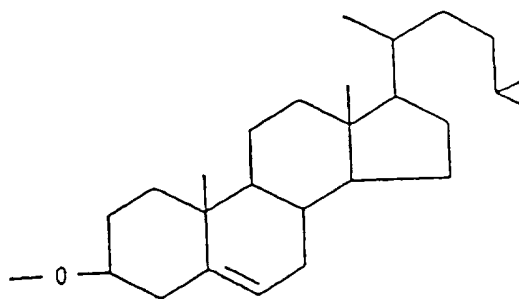
5



(A)

10 vari en av grupperna R^1 och R^2 är $-\text{COOH}_3$ och den andra är en grupp med formeln

15



20 varefter föreningen (A) hydrolyseras.