NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **302751** (13) B1

(51) Int Cl[6] C 07 D 309/22

Patentstyret

(21) Søknadsnr	923944	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	24.04.91, PCT/AU91/00161
(22) Inng. dag	09.10.92	(85) Videreføringsdag	09.10.92
(24) Løpedag	24.04.91	(30) Prioritet	24.04.90, AU, 9800/90
(41) Alm. tilgj.	18.12.92		19.10.90, AU, 2896/90
(45) Meddelt dato	20.04.98		11.02.91, AU, 4537/91

(73) Patenthaver Biota Scientific Management Pty Ltd,
North Tower, Rialto, 525 Collins Street, Melbourne, Vic 3000, AU

(72) Oppfinner Laurence Mark von Itzstein, Northcote, Vic, AU
Wen-Yang Wu, Mount Waverley, Vic, AU
Tho van Phan, Carnegie, Vic, AU
Basil Danylec, Box Hill, Vic, AU
Betty Jin, Mount Waverley, Vic, AU
Peter Malcolm Colman, East Melbourne, Vic, AU
Joseph Noozhumurry Varghese, Brunswick, Vic, AU

(74) Fullmektig Johan H. Gørbitz, Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive derivater og analoger av 2-deoksy-2,3-didehydro-N-acetylnevraminsyre**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Det beskrives derivater og analoger av 2-deoksy-2,3-didehydro-N-acetyl-nevraminsyre, farmasøytiske formuleringer av disse, fremgangsmåter for deres fremstilling og deres bruk ved behandling av virusinfeksjoner, særlig influenza.

Denne oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstiling av en ny klasse kjemiske forbindelser og deres medisinske anvendelse. Spesielt angår oppfinnelsen fremstilling av nye 4-substituerte-2-deoksy-2,3-didehydro-derivater av α-D-nevraminsyre, som kan anvendes som antivirale midler.

Enzymer med evnen til å spalte N-acetylnevraminsyre (NANA), også kjent som sialinsyre, fra andre sukkere, forekommer i mange mikroorganismer. Disse innbefatter bakterier som Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Streptococcus pneumoniae og Arthrobacter sialophilus, og vira, så som influenzavirus, parainfluenzavirus, kusmavirus, Newcastle disease-virus, hønsepestvirus og Sendai-virus. De fleste av disse virus er av orthomyxovirus- eller paramyxovirusgruppene og bærer en nevraminidase-aktivitet på overflaten av viruspartiklene.

Mange av de organismer som har nevraminidase er viktige patogener hos mennesker og/eller dyr, og enkelte, så som influenzavirus, Newcastle disease-virus og hønsepestvirus, forårsaker sykdommer som forårsaker enorm økonomisk skade.

Det har lenge vært antatt at hemmere av nevraminidase-aktivitet kunne forhindre infeksjon av nevraminidase-bærende virus. De fleste av de kjente nevraminidase-hemmerene er analoger av nevraminsyre, så som 2-deoksy-2,3-didehydro-N-acetylnevraminsyre (DANA) og derivater av denne. Se f.eks. Meindl et al., Virology 1974 58 457-63. De mest aktive av disse er 2-deoksy-2,3-dehydro-N-trifluoracetyl-nevraminsyre (FANA) som hemmer multicyklisk replikasjon av influenza- og parainfluenzavirus in vitro. Se Palese et al., Virology, 1974 59 490-498.

En rekke 2-deoksy-2,3-didehydro-N-acetyl-nevraminsyre-derivater er kjent på fagområdet. Se for eksempel P. Meindl et al., Virology, 58, 457-463 (1974); P. Meindl & H. Tuppy, Mh. Chem., 100 (4), 1295-1306 (1969); M. Flashner et al., Carbohydrate Research, 103, 281-285 (1982); E. Zbiral et al., Liebigs Ann Chem., 159-165 (1989); T. Ogawa & Y. Ito, Tetrahedron Letters, 28 (49), 6221-6224 (1987); T. Goto et al., Tetrahedron Letters, 27 (43), 5229-5232 (1986); H. Ogura

et al., Chem. Pharm. Bull, 36 (12), 4807-4813 (1988); German Offenlegungschrift P 1439249. Mange av disse forbindelsene er virksomme in vitro mot nevraminidase fra V. cholerae eller Newcastle-disease-virus så vel som mot influenzavirus. Nevraminidase har i det minste i enkelte stammer av influenza- eller parainfluenzavirus vært angitt å hemmes in vitro av 3-aza-2,3,4-trideoksy-4-okso-D-arabinoktonsyre-δ-lakton og O-α-N-acetyl-D-nevraminosyl(2-→3)-2-acetamido-2-deoksy-D-glukose. Se Zakstel'skaya et al., Vop. Virol. 1972 17 223-28.

Nevraminidase fra Arthrobacter sialophilus hemmes in vitro av glykalene 2,3-dehydro-4-epi-N-acetylnevraminsyre, 2,3-dehydro-2-deoksy-N-acetylnevraminsyre og 5-acetamido-2,6-anhydro-2,3,5-trideoksy-D-manno-non-2-en-4-ulosonat og av deres metylestere. Se Kumar et al., Carbohydrate Res., 1981 94 123-130; Carbohydrate Res. 1982 103, 281-285. Tio-analogene 2-α-azido-6-tio-nevraminsyre og 2-deoksy-2,3-didehydro-6-tionevraminsyre, Mack & Brossmer, Tetrahedron Letters 1987 28 191-194 og den fluorerte analogen N-acetyl-2,3-difluor-α-D-nevraminsyre, Nakajima et al., Agric. Biol. Chem., 1988 52 1209-1215 er rapportert å hemme nevraminidase, selv om typen av nevraminidase ikke var angitt. Schmid et al., Tetrahedron Letters 1958 29 3643-3646 har beskrevet syntesen av 2-deoksy-N-acetyl-α-D-nevraminsyre, men ikke angitt dens aktivitet eller annet mot nevraminidase.

Ingen av de kjente in vitro-hemmere av nevraminidase-aktivitet har vært vist å ha antiviral aktivitet in vivo, og enkelte, så som FANA, har faktisk spesielt vist seg inaktive in vivo. Den vanlige oppfatning har således vært at forbindelser som oppviser in vitro-hemming av viral nevraminidase, ikke vil påvirke en in vivo blokkering av virusinfeksjon.

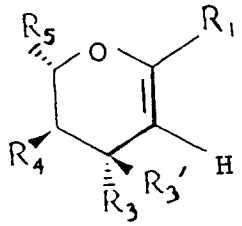
Meindl & Tuppy, Hoppes-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1969 350, 1088, har beskrevet hydrogenering av den olefiniske dobbeltbinding av 2-deoksy-2,3-dehydro-N-acetylnevraminsyre for å fremstille ß-anomeren av 2-deoksy-N-acetylnevraminsyre. Denne ß-anomer hemmet ikke Vibrio cholerae nevraminidase.

De mest potente in vitro-hemmere av viral nevraminidase

har således vært identifisert som forbindelser som er basert på nevraminsyre-skjelettet, og disse antas av enkelte å være aktiverings-analoger (transition-state-analoger). Miller et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1978 83 1479. Men, mens mange av de ovennevnte nevraminsyre-analoger er konkurrerende hemmere av nevraminidaser, har ingen per idag vært rapportert å oppvise antiviral aktivitet in vivo. Selv om et halv-planart, umettet 6-leddet ringsystem for eksempel har vært hevdet å være viktig for hemmingsaktiviteten, se Dernick et al., i ANTIVIRAL CHEMOTHERAPY (K.K. Gauri ed.) Academic Press, 1981, sidene 327-336, har enkelte forbindelser karakterisert gjennom et slikt system, nemlig FANA, vært angitt å ikke ha in vivo antiviral aktivitet. Se Palese & Schulman i CHEMOPROPHYLAXIS AND VIRUS INFECTION OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT, Vol. 1 (J.S. Oxford ed.) CRC Press, 1977, sidene 189-205.

Vi har nå funnet nye 4-substituerte-2-deoksy-2,3-didehydro-derivater av α-D-nevraminsyre som er virksomme in vivo.

Oppfinnelsen tilveiebringer således en fremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive forbindelser med formel (I)

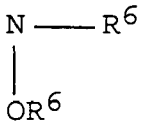


(I)

hvor

R^1 betyr COOH;

$R^{3'}$ er hydrogen og R^3 er N_3, OR^6, guanidino,



hvor

R^6 er hydrogen; C_{1-6}alkyl, allyl eller $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$, og $R^{6'}$ er hydrogen, allyl eventuelt substituert med OH eller $-CH_2-COONa$, alkyl eventuelt substituert med hydroksy, eller CH_2COOCH_3;

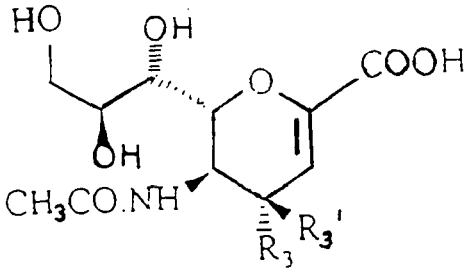
R^4 betyr NHR^6 eller OR^6, hvor R^6 er som ovenfor;

R^5 betyr $CH(OH)CH(OH)CH_2R^7$ hvor R^7 er OH, CN, N_3 eller $NH-CO-CH_3$;

og farmasøytisk akseptable salter eller derivater derav, forutsatt at i den generelle formel (I)

(i) når R^3 er OR^6, da kan R^4 ikke være O-acyl eller NH-acyl.

I henhold til en foretrukket utførelsesform fremstilles forbindelser med den generelle formel (II)

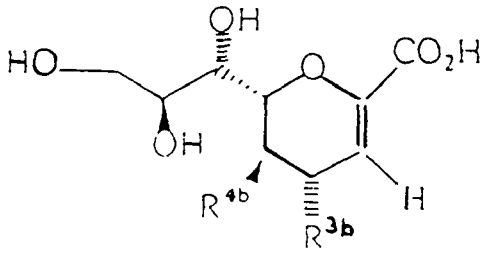


(II)

hvor $R^{3'}$ er hydrogen, og R^3 er $-N_3$, guanidino eller $-N.R^8.R^9$;

R^8 og R^9 er like eller forskjellige og hver betyr hydrogen eller alkyl med 1 til 6 karbonatomer,

I henhold til et særlig foretrukket aspekt tilveiebringer oppfinnelsen forbindelser med formel (Ib)



(Ib)

hvor R^{3b} er $NR^{6b}R^{7b}$, N_3 eller guanidino
R^{6b} er hydrogen eller C_{1-6}alkyl,
R^{7b} er hydrogen, C_{1-6}alkyl eller allyl;
R^{4b} er $NHCOCH_3$,
eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller derivat derav,

og farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene med formel (Ib) og deres farmasøytisk akseptable derivater.

Fortrinnsvis står R^3 for NH_2 eller guanidino.

Referanser til foretrukne definisjoner av grupper i forbindelser med formel (I) gjelder her etter passende tilpasning, de tilsvarende grupper i formel (Ib) og (II).

C_{1-4}alkyl som her benyttet, innbefatter både rettkjedede (f.eks. metyl, etyl) og forgrenede (f.eks. isopropyl, t-butyl) alkylgrupper.

Med et farmasøytisk akseptabelt derivat menes en hvilken som helst farmasøytisk akseptabel ester eller et salt av en slik ester av forbindelsene med formel (I) eller en annen forbindelse som etter administrasjon kan gi (direkte eller indirekte) en forbindelse med formel (I) eller en antiviral aktiv metabolitt eller rest derav.

Farmasøytisk akseptable derivater av særlig interesse er slike derivater som er forbindelser modifisert i C-1 karboksylfunksjonen, C-7- eller C-9-hydroksylfunksjonene, eller i aminogruppene. Interessante forbindelser innbefatter således C_{1-4}alkyl- (så som metyl, etyl eller propyl, f.eks. isopropyl) eller aryl- (f.eks. fenyl, benzoyl) estere av forbindelsene med formel (I), C-7- eller C-9-estere av forbindelser med formel (I), så som acetylestere derav, C-7- eller C-9-etere, så som fenyletere, benzyletere, p-tolyletere og acylerte amino-derivater, så som formyl, acetamido.

Fagmannen vil innse at de farmasøytisk akseptable derivatene av forbindelsene med formel (I) kan derivatiseres i mer enn én posisjon.

Farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene med formel (I) innbefatter forbindelser oppnådd fra farmasøytisk

akseptable, uorganiske og organiske syrer og baser. Eksempler på egnede syrer innbefatter salt-, hydrogenbromid-, svovel-, salpeter-, perklor-, fumar-, malein-, fosfor-, glykol-, melke-, salicyl-, rav-, toluen-p-sulfon-, vin-, eddik-, sitron-, metansulfon-, maur-, benzo-, malon-, naftalen-2-sulfon- og benzensulfonsyre. Andre syrer så som oksalsyre, som ikke selv er farmasøytisk akseptable, kan være nyttige i fremstillingen av salter egnet som mellomprodukter for å oppnå forbindelser i henhold til oppfinnelsen og deres farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter.

Salter oppnådd fra passende baser innbefatter alkalimetall- (f.eks. natrium), jordalkalimetall- (f.eks. magnesium), ammonium- og NR_4^+- (hvor R er C_{1-4}alkyl) salter.

I det følgende innbefatter henvisninger til en forbindelse fremstilt i henhold til oppfinnelsen, forbindelsene med formel (I) og farmasøytisk akseptable salter og derivater derav.

Særlig foretrukne forbindelser fremstilt i henhold til oppfinnelsen innbefatter:-

5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (også kjent som 5-(acetylamino)-4-amino-2,6-anhydro-3,4,5-trideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-ensyre), salter derav innbefattet natriumsaltet og 5-acetamido-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (også kjent som 5-(acetylamino)-2,6-anhydro-4-guanidino-3,4,5-trideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-ensyre) og salter derav, innbefattet ammoniumsaltet.

Forbindelsene med formel (I) har antiviral aktivitet. Særlig er disse forbindelsene hemmere av viral nevraminidase av orthomyxovirus og paramyxovirus, for eksempel den virale nevraminidase av influenza A- og B-, parainfluenza-, kusma-, samt Newcastle disease-, fuglepest- og Sendai-virus.

En forbindelse med formel (I) eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller derivat derav kan brukes som et aktivt terapeutisk middel, særlig som et antiviralt middel, for eksempel ved behandling av orthomyxovirus- og paramyxovirus-

infeksjoner.

En virusinfeksjon, for eksempel orthomyxovirus- og paramyxovirus-infeksjoner i pattedyr, innbefattet mennesket, kan behandles ved å administrere til pattedyret en effektiv mengde av en forbindelse med formel (I) eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller derivat derav.

Fagmannen vil innse at når det her er tale om behandling, gjelder dette profylakse så vel som behandling av etablerte infeksjoner eller symptomer.

Det er dessuten klart at den mengde av en forbindelse fremstilt i henhold til oppfinnelsen som trengs for behandling, vil avhenge ikke bare av den spesielt valgte forbindelse, men også med administrasjonsmåte, naturen av den tilstand som skal behandles og med pasientens alder og tilstand, og vil i siste instans være gjenstand for behandlende leges eller veterinærs avgjørelse. I alminnelighet vil imidlertid en passende dose ligge i området fra 0,01 til 750 mg/kg legemsvekt per dag, fortrinnsvis i området 0,1 til 100 mg/kg/dag og helst i området 0,5 til 25 mg/kg/dag.

Vi har dessuten registrert at de effektive doser av de undersøkte forbindelser er relatert til deres styrke in vitro. DANA (som har "IC_{50} plaque reduction" på 5 µg/ml) har således vist seg effektiv i doser på mellom 1 og 10 mg/kg per behandling. Den tilsvarende metylester av DANA (IC_{50} 50-100 µg/ml) er effektiv ved tilsvarende høyere doser.

Behandlingen startes fortrinnsvis før eller samtidig med infeksjonstidspunktet og fortsettes inntil det ikke lenger forekommer virus i luftveiene. Forbindelsene er imidlertid også effektive når de gis etter infeksjonen, for eksempel etter synlig etablerte symptomer.

Behandlingen gis hensiktsmessig 1-4 ganger daglig og fortsettes i 3-7, f.eks. 5 dager, etter infeksjonen, avhengig av hvilken forbindelse som benyttes.

Den ønskede dose kan forelegges som en enkelt dose eller som avdelte doser administrert med passende mellomrom, for eksempel som to, tre, fire eller flere mindre doser per dag.

Forbindelsen administreres hensiktsmessig i enhetsdose-

form, som for eksempel inneholder 10 til 1500 mg, hensiktsmessig 20 til 1000 mg og helst 50 til 700 mg virkestoff per enhetsdoseform.

Selv om det er mulig at en forbindelse fremstilt i henhold til oppfinnelsen, for terapeutisk anvendelse, kan administreres som det rå kjemikalium, foretrekkes presentasjon av virkestoffet som en farmasøytisk formulering.

En farmasøytisk formulering som omfatter en forbindelse med formel (I) eller (Ia), eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller derivat derav, sammen med et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel.

Bæremidlet må være "akseptabelt" i den forstand at det er forlikelig med de øvrige bestanddeler i formuleringen og ikke skadelig for mottageren.

De farmasøytiske formuleringene kan være i form av konvensjonelle formuleringer for den tiltenkte administrasjonsmåte.

For intranasal administrasjon kan nevraminidase-hemmerne administreres ved hjelp av metoder og formuleringer som benyttes for intranasal administrasjon.

I alminnelighet kan forbindelsene således administreres i form av en oppløsning eller suspensjon eller som et tørt pulver.

Oppløsninger og suspensjoner vil vanligvis være vandige, for eksempel fremstillet med vann alene (for eksempel sterilt eller pyrogenfritt vann) eller med vann og et fysiologisk akseptabelt med-oppløsningsmiddel (for eksempel etanol, propylenglykol og polyetylenglykoler, så som PEG 400).

Slike oppløsninger eller suspensjoner kan dessuten inneholde andre hjelpestoffer, for eksempel konserveringsmidler (så som benzalkoniumklorid), solubiliseringsmidler/overflateaktive midler, så som polysorbater (f.eks. Tween 80, Span 80, benzalkoniumklorid), buffere, isotonisitets-regulerende midler (for eksempel natriumklorid), absorpsjonsforbedrende midler og viskositetsforbedrende midler. Suspensjoner kan dessuten inneholde suspenderingsmidler (for eksempel mikrokrystallinsk cellulose, karboksymetylcellulose-natrium).

Oppløsninger eller suspensjoner tilføres nesehulen på konvensjonell måte, for eksempel med en dråpeteller, pipette eller som spray. Formuleringene kan tilberedes som enhetsdoser eller i flerdoseform. I sistnevnte tilfelle benyttes fortrinnsvis en anordning for avmåling av dosen. Når det gjelder dråpetellere eller pipetter, kan dette oppnås ved at pasienten selv administrerer et passende, forutbestemt volum, av oppløsningen eller suspensjonen. Når det gjelder spray, kan dette for eksempel oppnås ved hjelp av en forstøvningspumpe med måleanordning.

Intranasal administrasjon kan også oppnås ved hjelp av en aerosolformulering, idet forbindelsen befinner seg i en trykkbeholder med et passende drivmiddel, så som klorfluorkarbon (CFC), for eksempel diklordifluormetan, triklorfluormetan eller diklortetrafluoretan, karbondioksyd eller en annen egnet gass. Aerosolen kan hensiktsmessig også inneholde et overflateaktivt middel så som lecitin. Medikamentdosen kan kontrolleres ved anbringelse av en måleventil.

Som et alternativ kan forbindelsene tilberedes i form av et tørt pulver, for eksempel en pulverblanding av forbindelsen i et egnet pulvergrunnlag, så som laktose, stivelse, stivelses-derivater som hydroksypropylmetylcellulose og polyvinylpyrrolidin (PVP). Det vil være hensiktsmessig at pulverbæremidlet danner en gel i nesehulen. Pulverpreparatet kan tilberedes i enhetsdoseform, for eksempel i kapsler eller patroner av f.eks. gelatin, eller i foliepakninger, hvorfra pulveret kan administereres ved hjelp av en inhalator.

I de intranasale tilberedningene vil forbindelsen i alminnelighet ha liten partikkelstørrelse, for eksempel på 5 mikron eller mindre. Slike partikkelstørrelser kan oppnås på kjent måte, for eksempel ved mikronisering.

Om ønskes, kan formuleringene tilberedes slik at de gir forlenget virkestoff-frigjøring. Forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen kan også benyttes i kombinasjon med andre terapeutiske midler, for eksempel andre antiinfeksjonsmidler. Spesielt kan forbindelsen i henhold til oppfinnelsen benyttes sammen med andre antivirale midler.

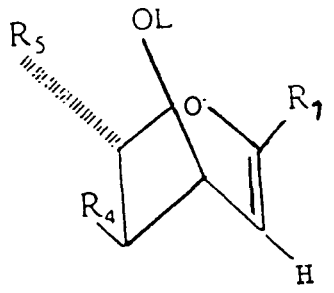
Egnede terapeutiske midler for bruk i slike kombinasjoner, innbefatter andre anti-infeksjonsmidler, særlig antibakterielle og antivirale midler, så som midler benyttet for behandling av respiratoriske infeksjoner. For eksempel kan andre forbindelser som er effektive mot influenzavirus, så som amantadin, rimantadin og ribavirin, inkluderes i slike kombinasjoner.

De enkelte komponenter i slike kombinasjoner kan administreres enten suksessivt eller simultant i separate eller kombinerte farmasøytiske formuleringer.

Når forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen benyttes sammen med et ytterligere terapeutisk middel som er virksomt mot det samme virus, kan dosen av hver forbindelse enten være den samme som når hver forbindelse benyttes alene, eller være forskjellig fra denne. Passende doseringer vil lett kunne velges av fagmannen.

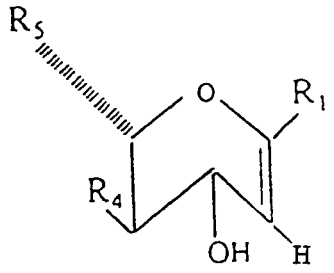
Forbindelsen med formel (I) og dens farmasøytisk akseptable salter og derivater, fremstilles i henhold til oppfinnelsen som følger:

Ifølge prosess (A) omsettes en forbindelse med formel (III)



hvor R^1, R^4 og R^5 er som definert i formel (I) og OL er en utgående gruppe (for eksempel en sulfonsyrerest, så som tosyl, mesyl, trifluormesyl) eller et beskyttet derivat derav, med den passende nukleofil, for eksempel azid, cyanid, et passende karbanion eller tioacetat.

Forbindelsene med formel (III) kan oppnås fra den tilsvarende forbindelse med formel (IV)



(IV)

ved inversjon av 4-OH-gruppen etter kjente fremgangsmåter, for eksempel ved omsetning med en Lewis-syre (så som BF_3-eterat) og påfølgende hydrolyse. Forbindelsen med formel (IV) er enten kjent på området eller oppnåelige gjennom fremgangsmåter analoge med dem som benyttes for fremstilling av de kjente forbindelsene.

Etter en annen metode (B) foretas omdannelse av en forbindelse med formel (I) til en annen forbindelse med formel (I), f.eks.

(i) omdannelse av en azidgruppe til en aminogruppe, eller

(ii) omdannelse av en aminogruppe til en guanidingruppe, og om nødvendig eller ønskelig, behandling av den resulterende forbindelse ved én eller to ytterligere omsetninger som omfatter:

(i) fjerning av eventuelle beskyttelsesgrupper;

(ii) omdannelse av en forbindelse med formel (I) eller et salt derav, til et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Forbindelser med formel (I) hvor R^3 er NH_2 kan således fremstilles ved reduksjon av den tilsvarende azido-analog.

Forbindelser hvor R^3 er NH-alkyl eller guanidino, kan fremstilles ved derivatisering av den tilsvarende forbindelse hvor R^3 er NH_2.

Forbindelser med formel (I) hvor R^1 er COOH, kan frem-

stilles ved hydrolyse av den tilsvarende ester under sure eller basiske betingelser, for eksempel ved pH 11-12 (ved å benytte en base som natrium- eller ammonium-hydroksyd) eller ved pH 2-3 (ved å benytte en syre, så som svovelsyre).

Som fagmannen vil innse, kan det på et hvilket som helst trinn i de ovenfor beskrevne prosesser, være nødvendig eller ønskelig å beskytte én eller flere følsomme grupper i molekylet for å hindre uønskede bireaksjoner. Beskyttelsesgruppene kan deretter fjernes på et hensiktsmessig trinn senere i reaksjonsfølgen.

Beskyttelsesgruppene benyttet ved fremstillingen av forbindelsen med formel (I) kan benyttes på konvensjonell måte. Se for eksempel "Protective Groups in Organic Chemistry" Ed. J.F.W. McOmie (Plenum Press 1973) eller "Protective Groups in Organic Synthesis" av Theodora W Greene (John Wiley and Sons 1981).

Konvensjonelle aminobeskyttende grupper kan innbefatte for eksempel aralkylgrupper, så som benzyl-, difenylmetyl- eller trifenylmetylgrupper; og acylgrupper, så som N-benzyloksykarbonyl eller t-butoksykarbonyl. Forbindelser med den generelle formel (I) hvor én eller begge gruppene R^2 og R^3 utgjør hydrogen, kan fremstilles ved å fjerne beskyttelsesgruppen fra en tilsvarende beskyttet forbindelse.

Hydroksygrupper kan beskyttes for eksempel med aralkylgrupper, så som benzyl-, difenylmetyl- eller trifenylmetylgrupper, med acylgrupper, så som acetyl; silikon-beskyttelsesgrupper, så som trimetylsilylgrupper eller som tetrahydropyranderivater.

Fjerning av eventuelt forekommende beskyttelsesgrupper kan oppnås gjennom konvensjonelle fremgangsmåter. En aralkylgruppe, så som benzyl, kan således avspaltes ved hydrogenolyse i nærvær av en katalysator (f.eks. palladium på kull). En acylgruppe, så som N-benzyloksykarbonyl, kan fjernes ved hydrolyse med for eksempel hydrogenbromid i eddiksyre eller ved reduksjon, for eksempel ved katalytisk hydrogenering. Silikon-beskyttende grupper kan fjernes, for eksempel ved behandling med fluorid-ion, mens tetrahydropyrangrupper kan

avspaltes ved hydrolyse under sure betingelser.

Når det er ønskelig å isolere en forbindelse fremstilt i henhold til oppfinnelsen som et salt, for eksempel som et syreaddisjonssalt, kan dette oppnås ved å behandle den frie base med den generelle formel (I) med en passende syre, fortrinnsvis med en ekvivalent mengde, eller med kreatininsulfat, i et egnet oppløsningsmiddel (f.eks. vandig etanol).

Den foreliggende oppfinnelse er ytterligere beskrevet gjennom de etterfølgende eksempler, som utelukkende tjener illustrative formål og ikke må oppfattes som en begrensning av oppfinnelsen.

Generell metodikk

De følgende generelle fremgangsmåter er anvendelige for syntesen av forbindelser i henhold til oppfinnelsen.

Deacetylering

Behandling av det acetylerte materialet med Amberlite IRA-400 (OH^-) under omrøring i en viss tid, i alminnelighet 2-3 timer, ved romtemperatur resulterer i fullstendig de-O-acetylering. Resinet frafiltreres og filtratet konsentreres til tørrhet for å gi det ønskede de-O-acetylerte materialet.

Fagmannen vil være kjent med at det finnes andre standardmetoder for fullstendig de-O-acetylering av det samme materiale, så som behandling med natriummetoksyd i metanol.

Esterspaltning

Det fullstendig de-O-acetylerte materiale tas opp i vandig natriumhydroksyd og omrøres ved romtemperatur i en viss tid, vanligvis i 2-3 timer. Blandingen justeres deretter til pH 7,0-7,5 med Dowex 50W x 8 (H^+) resin. Filtrering, etterfulgt av frysetørking av filtratet, fører til det ønskede avestrede materialet.

Fagmannen vil lett kunne se flere alternative muligheter for esterspaltning av det samme materiale, så som sur hydrolyse, alternativt basisk hydrolyse, f.eks. med ammoniumhydroksyd eller kaliumhydroksyd.

Mellomforbindelser referert til i eksemplene 1 til 15 er som følger:

FORBINDELSE 2

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-2,3,5-trideoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (4-epi-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 3

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-azido-2,3,5-trideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-azido-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 5

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-amino-2,3,4,5-tetra-deoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-amino-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 8

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N,N-diallylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N,N-diallylamino-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 10

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N-allylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N-allylamino-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 12

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-amino-2,3,4,5-tetra-deoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (4-epi-4-amino-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 13

Metyl 7,8,9-tri-O-acetyl-2,3,5-trideoksy-4',5'-dihydro-2'-metyloksazolo[5,4-d] D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (4-epi-4,5-oksazaloNeu7,8,9$Ac_3$2en1Me)

Forbindelse 15

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (4-epi-azido-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 16

Metyl 5-acetamido-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (4-epi-azidoNeu5Ac2en1Me)

Forbindelse 18

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N-metylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N-metylamino-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 19

Metyl 5-acetamido-4-N-metylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N-metylaminoNeu5Ac2en1Me)

Forbindelse 21

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N,N-dimetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N,N-dimetylamino-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 22

Metyl 5-acetamido-4-N,N-dimetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N,N-dimetylaminoNeu5Ac2en1Me)

Forbindelse 24

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N-metoksykarbonylmetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat
(4-N-metoksykarbonylmetylaminoNeu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 25

Metyl 5-acetamido-4-N-metoksykarbonylmetylamino-2,3,4,5-

tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N-metoksykarbonylmetylaminoNeu5Ac2en1Me)

Forbindelse 27

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N-2'-hydroksyetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N-2'-hydroksyetylaminoNeu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 28

Metyl 5-acetamido-4-N-2'-hydroksyetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N-2'-hydroksyetylaminoNeu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me)

Forbindelse 29

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N-2'-hydroksyetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N-2'-hydroksyetylaminoNeu5Ac2en1Me)

Forbindelse 30

3-deoksy-D-glycero-D-galakto-2-nonulopyranosonsyre (KDN)

Forbindelse 31

Metyl 3-deoksy-D-glycero-D-galakto-2-nonulopyranosonat (KDN1Me)

Forbindelse 32

Metyl (4,5,7,8,9-penta-O-acetyl-2,3-dideoksy-D-glycero-ß-D-galakto-2-nonulopyranosyl-klorid)onat (KDN4,5,7,8,9$Ac_5$2ßCl1Me)

Forbindelse 33

Metyl 4,5,7,8,9-penta-O-acetyl-2,3-dideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (KDN4,5,7,8,9$Ac_5$2en1Me)

Forbindelse 34

Metyl 2,3-dideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (KDN2en1Me)

Forbindelse 36

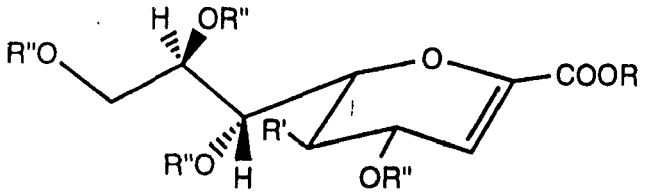
Hydrazinium 4,5-diamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (hydrazinium 4,5-diaminoNeu2en)

Forbindelse 37

4,5-diamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (4,5-diaminoNeu2en)

Eksempel 1 Fremstillingen av natrium 5-acetamido-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-azido-Neu5Ac2en) (4)

Det totale reaksjonsskjema er som følger:

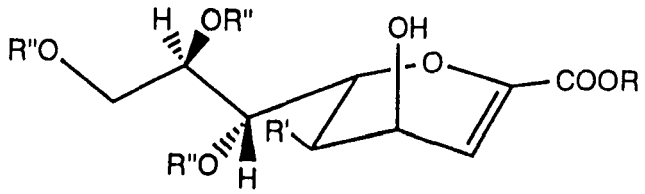


1

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

1) BF_3-Et_2O/MeOH/C_6H_6

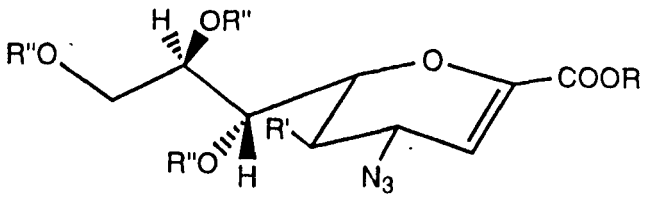
2) HOAc/etylacetat/H_2O



2

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

1) Tf_2O/pyridin
2) NaN_3/n-$Bu_4N.HSO_4$/DMF

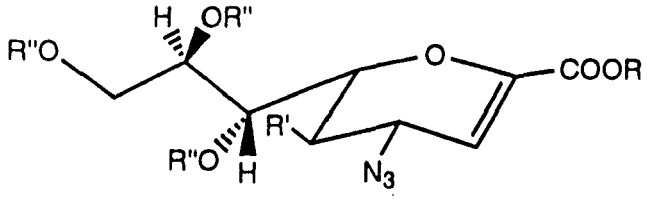


3

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

1) NaOMe/MeOH

2) OH^-



4

R = Na, R' = NHAc
R" = H

Fremstilling av (2)

Til en omrørt oppløsning av metyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2,3,5-trideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (1) (1500 mg, 3,17 mmol) i en blanding av benzen (50 ml) og metanol (300 mg) ble det i løpet av 30 minutter dråpevis tilsatt BF_3Et_2O (12 ml) under nitrogen-atmosfære ved romtemperatur. Hele blandingen fikk deretter omrøres ved romtemperatur i 16 timer. Oppløsningen ble fortynnet med etylacetat (250 ml), vasket suksessivt med mettet $NaHCO_3$-oppløsning (30 ml x 3) og vann (20 ml x 3) og deretter inndampet til et lite volum (ca. 10 ml) som ble tilsatt vann (0,5 ml) og eddiksyre (0,5 ml). Hele blandingen ble deretter omrørt ved romtemperatur i 2 dager før fortynning med etylacetat (200 ml). Etylacetat-oppløsningen ble vasket med 5% $NaHCO_3$-oppløsning (30 ml x 2) og vann (20 ml x 3) og deretter inndampet til tørrhet. Residuet ble kromatografert (silikagel, etylacetat som elueringsmiddel) for å gi ren forbindelse (2) (550 mg, 40%).

^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm); 1,95, 2,06, 2,08, 2,10, 2,35 (s, 15H, acetyl CH_3 x 5), 3,80 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,1-4,4 (m, 4H, H_4, H_5, H_6, H_9), 4,82 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 1,8Hz, $J_{9,9'}$ 12,3Hz, H_9), 5,27 (m, 1H, H_8), 5,45 (dd, 1H, $J_{7,8}$ 3,5Hz, H_7), 6,15 (d, 1H, $J_{3,4}$ 5,4Hz, H_3), 6,47 (d, 1H, $J_{NH,5}$ 8,8Hz, -CONH).

Fremstilling av (3)

Til en omrørt oppløsning av forbindelse (2) (800 mg, 1,67 mmol) i vannfri diklormetan (10 ml) og tørr pyridin (316 mg, 4 mmol) ble det ved -30° til -40°C dråpevis tilsatt en oppløsning av trifluormetansulfonsyreanhydrid (Tf_2O) (556 mg, 2 mmol) i diklormetan (2 ml) i løpet av 15 minutter. Reaksjonsblandingen ble deretter omrørt ved -30° i 5 timer og konsentrert til tørrhet i vakuum. Residuet ble deretter oppløst i tørr DMF (5 ml) som inneholdt en blanding av natriumazid (650 mg, 10 mmol) og tetrabutylammoniumhydrogensulfat (170 mg, 0,5 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer og deretter inndampet til tørrhet under høyvakuum. Residuet ble fordelt mellom etylacetat (200 ml) og

vann (50 ml). Det organiske lag ble fraskilt og vasket med vann (50 ml x 2), tørket over Na_2SO_4 og inndampet for å etterlate et residuum (780 mg), som ble underkastet dobbelt kromatografi (silikagel, det første oppløsningsmiddelsystem var etylacetat/aceton: 8/1; det andre oppløsningsmiddelsystem var diklormetan/vann: 10/1) for å gi en farveløs olje (3) (185 mg, 24%).
MS. (FAB) 457 (M^+ + 1), 414 (M^+ $-N_3$. $[\alpha]^{20}_D$ + 19,1°

(Cl, MeOH). ir. ($CHCl_3$) cm^{-1} 2100 (N-N_3). 1748 (karbonyl)
^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm) 2,04, 2,05, 2,06, 2,12 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 3,79 (s, 3H, $COOCH_3$), 3,91 (ddd, 1H, $J_{5,NH}$ 8,4Hz, $J_{5,4}$ 8,8Hz, $J_{5,6}$ 9,9Hz, H_5), 4,17 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 6,8Hz, $J_{9,9'}$ 12,5Hz, $H_{8'}$), 4,42 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 2,9Hz, $J_{4,5}$ 8,8Hz, H_4), 4,48 (dd, 1H, $J_{6,7}$ 2,3Hz, $J_{6,5}$ 9,9Hz, H_6), 4,46 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,7Hz, $J_{9,9'}$ 12,5Hz, H_9), 5,31 (m, 1H, $J_{8,7}$ 5,2Hz, $J_{8,9}$ 2,7Hz, $J_{8,9'}$ 6,8Hz, H_8), 5,45 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 2,3Hz, $J_{7,8}$ 5,2Hz, H_7), 5,96 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,9H, H_3), 6,13 (d, 1H, $J_{NH,5}$ 8,4Hz, -CONH)

^{13}C-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm)
20,7 (CH_3-CO-O-), 23,2 (CH_3CO-NH), 48,3 (C_5), 52,6 ($COOCH_3$), 57,8 (C_4), 62,1 (C_9), 67,7, 70,9 (C_7, C_8), 75,9 (C_6), 107,6 (C_3), 145,1 (C_2), 161,5 (C_1), 170,2, 170,3, 170,7, (acetyl -C = 0 x 4).

Fremstilling av (4)

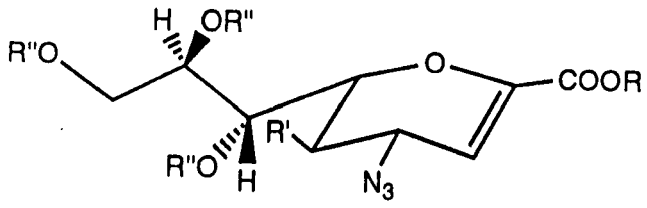
Forbindelse (3) (50 mg, 0,11 mmol) ble oppløst i vannfri metanol (5 ml) som inneholdt natriummetoksyd (8 mg, 0,15 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer og konsentrert til tørrhet i vakuum. Residuet ble tatt opp i vann (3 ml), omrørt ved romtemperatur i 1,5 timer, justert til pH 6-7 med Dowex 50 x 8 (H^+) resin og deretter lyofilisert for å gi tittelforbindelsen (4) (35 mg, 94%).
i.r. (KBr)cm^{-1} 3400 (br.-OH), 2100 (-N_3), 1714 (karbonyl)

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm). 2,06 (5, 3H, acetyl CH_3), 3,64 (dd, 1H,

$J_{9',8}$ 6,3Hz, $J_{9',9}$ 11,8Hz, H_9), 3,65 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 3,9Hz, $J_{7,8}$ 6,8Hz, H_7), 3,88 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,6Hz, $J_{9,9'}$ 11,8Hz, H_9), 3,94 (m, 1H, $J_{8,7}$ 6,8Hz, $J_{8,9}$ 2,6Hz, $J_{8,9'}$ 6,3Hz, H_8), 4,21 (dd, 1H, $J_{5,4}$ 10,4Hz, $J_{5,6}$ 8,9Hz, H_5), 4,31 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 2,2Hz, $J_{4,5}$ 2,2Hz, $J_{4,5}$ 10,4Hz, H_4), 4,34 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 8,9Hz, $J_{6,7}$ 3,9Hz, H_6), 5,82 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,2Hz, H_3).

Eksempel 2 Fremstillingen av natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-amino-Neu5Ac2en) (6)

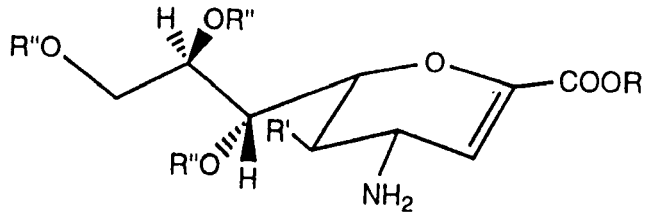
Det totale reaksjonsskjema er som følger:



3

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

1) H_2S/pyridin

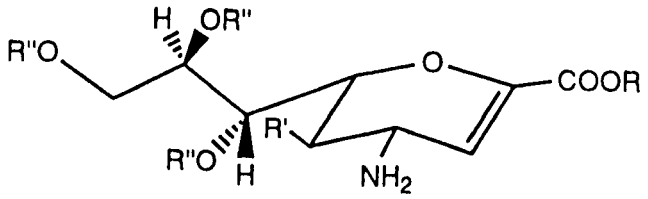


5

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

1) NaOMe/MeOH

2) OH^-



6

R = Na, R' = NHAc
R" = H

Fremstilling av (5)

I en oppløsning av metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (3), fremstillet som i Eksempel 1 (95 mg, 0,208 mmol) i pyridin (6 ml), ble det boblet inn H_2S i 16 timer ved romtemperatur. Oppløsningen ble deretter spylt med nitrogen i 15 minutter og inndampet under høyvakuum for å fjerne pyridin. Residuet ble kromatografert (silikagel, etylacetat/isopropanol/vann = 5/2/1) for å gi en farveløs forbindelse (5) (50 mg, 56%).
MS. (FAB) 431 (M^+ + 1), 414 (M^+ -NH_2), $[\alpha]^{20}_D$ +34,5° (Cl, MeOH). i.r. ($CHCl_3$)cm^{-1} 3400 (br.NH_2), 1740 (karbonyl).

^{1}H-nmr ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ (ppm). 1,96, 2,06, 2,07, 2,10 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 3,81 (s, 3H, -$COOCH_3$), 3,92 (brt, 1H, $J_{5,4}$ & $J_{5,6}$ 10Hz, H_5), 4,17 (dd, 1H, $J_{9',8}$ 7,2Hz, $J_{9',9}$ 12,3Hz, $H_{9'}$), 4,22 (br. dd, 2H, $J_{4,5}$ & $J_{6,5}$ 10Hz, $J_{4,3}$ & $J_{6,7}$ 2,1Hz, H_4 & H_6), 4,71 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,6Hz, $J_{9,9'}$ 12,3Hz, H_9), 5,31 (m, 1H, $J_{8,7}$ 4,9Hz, $J_{8,9}$ 2,6Hz, $J_{8,9'}$ 7,2Hz, H_8), 5,45 (d, 1H, $J_{7,6}$ 2,1Hz, $J_{7,8}$ 4,9Hz, H_7), 5,97 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,1Hz, H_3).

^{13}C-nmr ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ (ppm)
20,2, 20,3 (CH_3-CO-O-), 22,3 (CH_3-CO-NH), 48,2 (C_5), 50,4 (C_4), 52,0 ($COOCH_3$), 52,1 (C_9), 67,8, 71,2 (C_7, C_8), 76,5 (C_6), 112,5 (C_3), 143,5 (C_2), 162,0 (C_1), 170,2, 170,4, 170,8, 172,2 (acetyl -C = O x 4).

Fremstilling av (6)

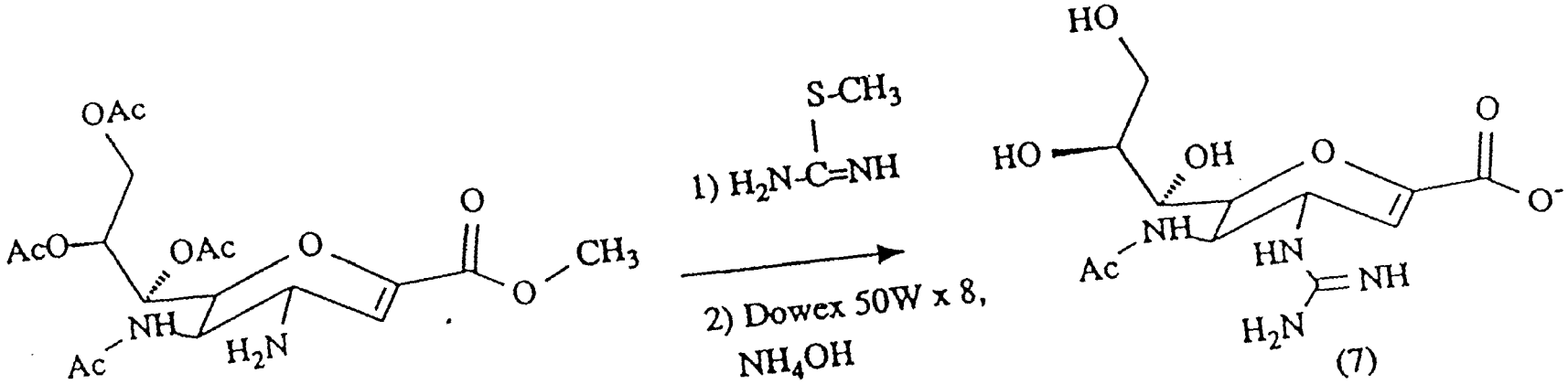
Forbindelse (5) (50 mg, 0,116 mmol) ble oppløst i vannfri metanol (5 ml) som inneholdt natriummetoksyd (12,4 mg, 0,23 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1,5 timer og inndampet til tørrhet i vakuum ved 30°C. Residuet ble omrørt i vann (3 ml) ved romtemperatur inntil TLC (silikagel, etylacetat/metanol/0,1N HCl = 5/4/1) indikerte at hydrolysen var fullstendig. Oppløsningen (pH ca. 10,5) ble deretter gradvis justert til ca. pH 7,5 med Dowex 50 x 8 (H^+) resin. Så

snart oppløsningens pH hadde nådd 7,5, ble suspensjonen raskt trykkfiltrert. Filtratet ble lyofilisert for å gi tittel-forbindelsen (6) (30 mg, 83%)

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm) 2,07 (s, 3H, acetyl CH_3), 3,59-3,70 (m, 2H, H_7 & $H_{9'}$), 3,89 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,6Hz, $-J_{9,9'}$ 11,8Hz, H_9), 3,95 (m, 1H, H_8), 3,99 (brd, 1H, $J_{4,5}$ 10,6Hz, H_4), 4,21 (brt, 1H, $J_{5,4}$ & $J_{5,6}$ 10,6Hz, H_5), 4,29 (brd, 1H, $J_{6,5}$ 10,6Hz, H_6), 5,66 (d, 1H, $J_{3,4}$ 1,9Hz, H_3).

Eksempel 3 Fremstillingen av ammonium 5-acetamido-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (7)

Det totale reaksjonsskjema er som følger:


OAc
AcO
OAc
O
O
O
CH3
NH
Ac
H2N
S-CH3
1) H2N-C=NH
2) Dowex 50W x 8,
NH4OH
HO
HO
OH
O
O
O-
NH
Ac
HN
NH
H2N

(5)

(7)

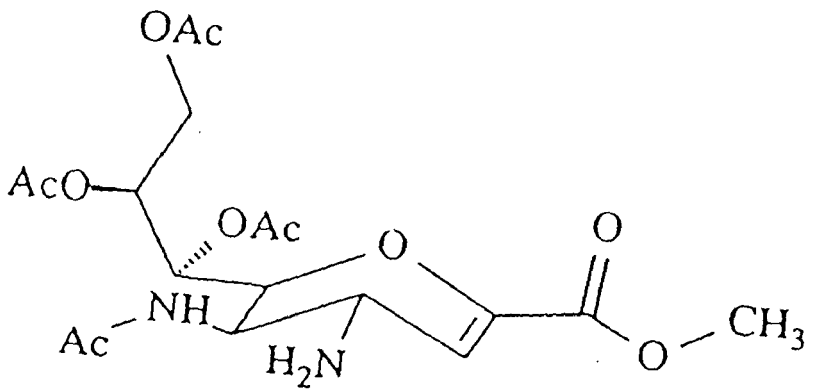
Til en oppløsning av S-metylisourea (546 mg, 3 mmol) i vann (15 ml) ble det ved isbadtemperatur tilsatt metyl-5,7,8,9-tri-O-acetyl-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (5) fremstillet som i Eksempel 2 (40 mg, 0,093 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 5°C i 7 dager og helt over på en kolonne av Dowex 50W X 8 (H^+) resin (35 ml). Kolonnen ble deretter vasket med kaldt vann (700 ml) og eluert med 1,5M NH_4OH-oppløsning. Eluatet (120 ml) ble konsentrert til tørrhet under høyvakuum. Det resulterende residuum ble kromatografert (silikagel; oppløsningsmiddelsystem 1: etylacetat/isopropanol/vann, 1/5/1; oppløsningsmiddelsystem 2: 75% isopropanol) for å gi tittelforbindelsen (7) (8 mg, 24,5%).

Forbindelse (7) ga en sterk, positiv Sakaguchi-reaksjon, som indikerte nærvær av en guanidingruppe. NMR-data for forbindelse (7) er angitt nedenfor.

^{1}H-nmr (D_2O + CD_3OD) δ (ppm) 2,06 (s, 2H, acetyl CH_3), 3,60 (br. d, 1H, $J_{7,8}$ 9,4Hz, H_7), 3,63 (dd, 1H, $J_{9',8}$ 6,2Hz, $J_{9',9}$ 11,8Hz, $H_{9'}$), 3,76 (br d, 1H, $J_{4,5}$ 9,4Hz, H_4), 3,87 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,6Hz, $J_{9,9'}$ 11,8Hz, H_9), 3,93 (ddd, 1H, $J_{8,7}$ 9,4Hz, $J_{8,9}$ 2,6Hz, $J_{8,9'}$ 6,2Hz, H_8), 4,01 (dd, 1H, $J_{5,4}$ 9,4Hz, $J_{5,6}$ 10,6Hz, H_5), 4,20 (br. d, 1H, $J_{6,5}$ 10,6Hz, H_6), 5,63 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,1Hz, H_3).

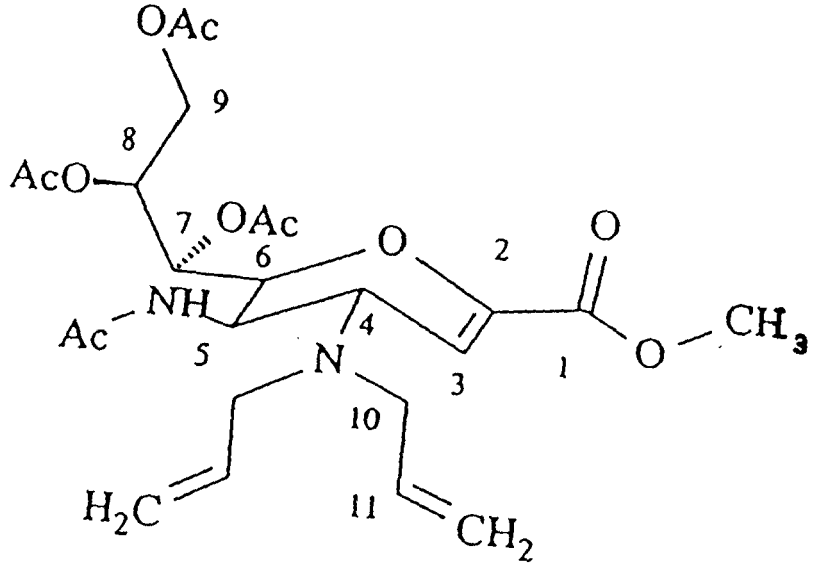
Eksempel 4 — Natrium 5-acetamido-4-N,N-diallylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (9).

Det totale reaksjonsskjema er som følger:



(5)

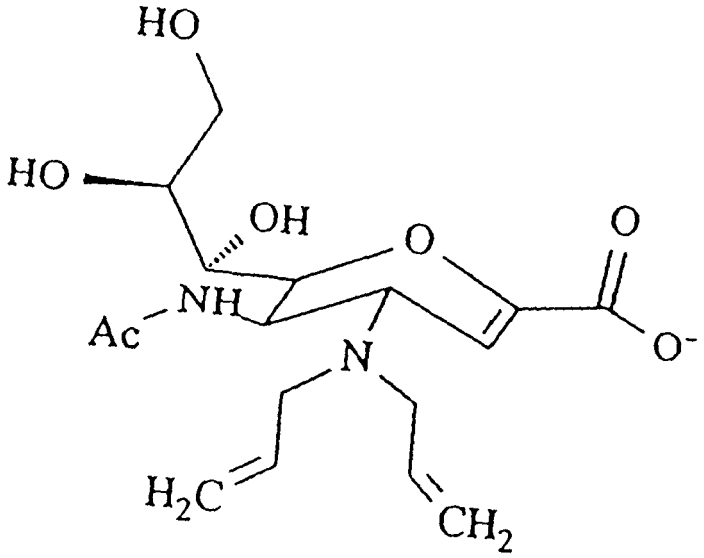
Allylbromid
Ag_2CO_3/CH_3CN



(8)

1) NaOMe/MeOH

2) OH^-



(9)

Til en oppløsning av allylbromid (60 mg, 0,5 mmol) og metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (5) (90 mg, 0,209 mmol) i acetonitril (5 ml) ble det tilsatt sølvkarbonat (116 mg, 0,418 mmol). Blandingen ble omrørt og beskyttet mot lys ved romtemperatur i 16 timer. Den resulterende suspensjon ble filtrert og filtratet inndampet til tørrhet. Residuet ble hurtigkromatografert (flash column chromatography) på silikagel, etylacetat inneholdende 10% metanol) for å gi metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N,N-diallylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (8) (85 mg, 80%).

^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm). 1,94, 2,05, 2,06, 2,11 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 2,97 (dd, 2H, $J_{10a,10b}$ & $J_{10'a,10'b}$ 14,3Hz, $J_{10a,11}$ & $J_{10'a,11'}$ 7,6Hz, H_{10a} & $H10'a$), 3,24 (dd, 2H, $J_{10b,10a}$ & $J_{10'b,10'a}$ 14,3Hz, $J_{10b,11}$ & $J_{10'b,11'}$ 4,9Hz, H_{10b} & $H_{10'b}$), 3,58 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 2,4Hz, $J_{4,5}$ 9,3Hz, H_4), 3,79 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,12-4,26 (m, 3H, H_6, H_9, , H_5), 4,70 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,6Hz, $J_{9,9'}$ 12,3Hz, H_9), 5,09 (dd, 2H, $J_{12cis,11}$ & $J_{12'cis,11'}$ 10,6Hz, J_{12gem} & $J_{12'gem}$ ~1,5Hz, H_{12cis} & $H_{12'cis}$), 5,14 (dd, 2H, $J_{12trans,11}$ & $J_{12'trans,11'}$ 17,7Hz, J_{12gem} & $J_{12'gem}$ ~1,5Hz, $H_{12trans}$ & $H_{12'trans}$), 5,27-5,32 (m, 2H, H_8 & -CONH-), 5,55 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 2,1Hz, $J_{7,8}$ 4,7Hz, H_7), 5,72 (m, 2H, H_{11} & $H_{11'}$), 6,07 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,4Hz, H_3).

Forbindelse (8) (80 mg, 0,156 mmol) ble oppløst i vannfri metanol (10 ml) som inneholdt natriummetoksyd (16,2 mg, 0,30 mmol).

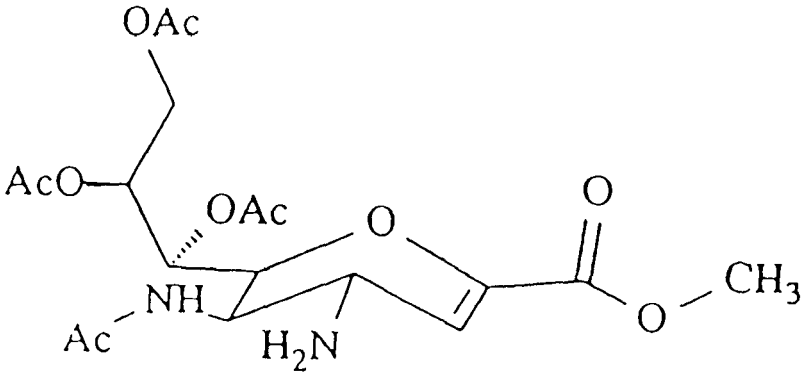
Oppløsningen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer og deretter inndampet til tørrhet. Residuet ble tatt opp i vann (5 ml) og hensatt ved romtemperatur i 2 timer. Den resulterende oppløsning ble nøytralisert med Dowex 50 x 8 (H^+) og frysetørket for å gi tittelforbindelsen (9) (49 mg, 80%).

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm) 1,94 (s, 3H, acetyl CH_3), 3,24-3,44 (m, 4H, H_{10} x 2 & $H_{10'}$ x 2), 3,48-4,33 (m, 7H, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9 & $H_{9'}$), 5,24-5,29 (m, 4H, H_{12} x 2 & $H_{12'}$ x 2), 5,69 (d,

1H, $J_{3,4}$ ~2Hz, H_3), 5,73-5,76 (m, 2H, H_{11} & $H_{11'}$).

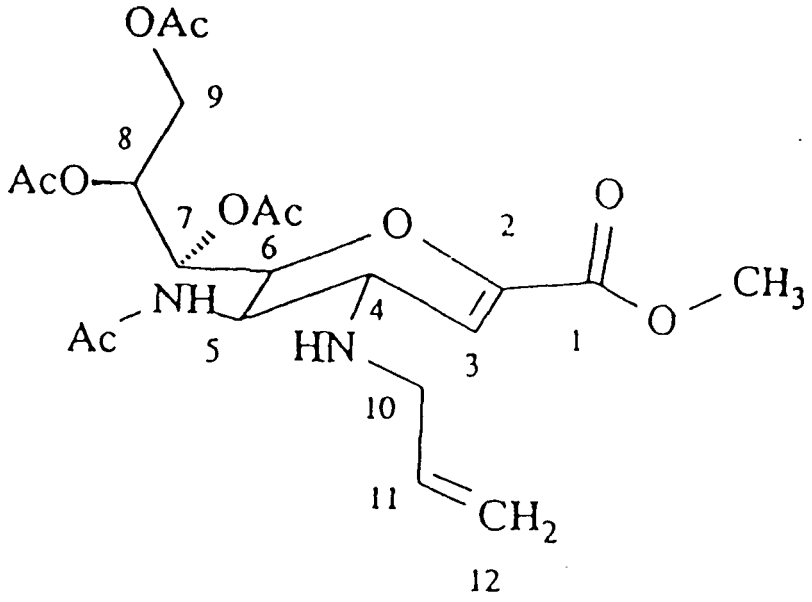
Eksempel 5 Natrium 5-acetamido-4-N-allylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (11)

Det totale reaksjonsskjema var som følger:



(5)

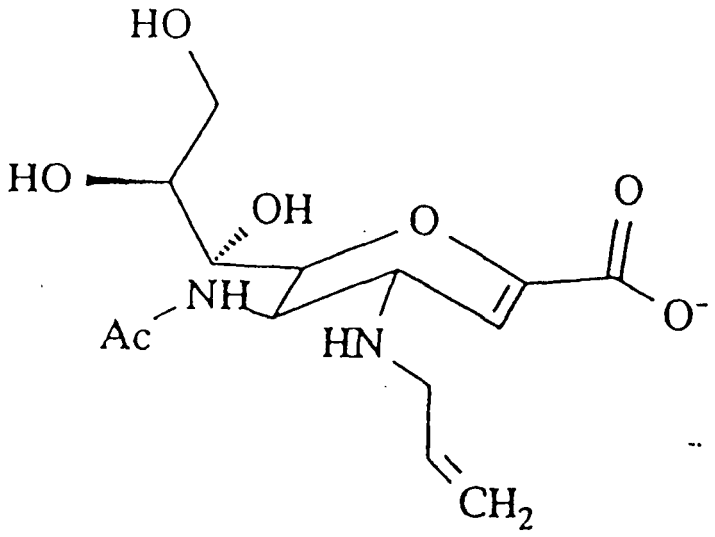
Allylbromid
Ag_2CO_3/CH_3CN



(10)

1) NaOMe/MeOH

2) OH^-



(11)

Til en oppløsning av allylbromid (48 mg, 0,40 mmol) og forbindelse (5) (155 mg, 0,36 mmol) i acetonitril (5 ml) ble det tilsatt sølvkarbonat (107 mg, 0,38 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer under beskyttelse mot lys. Den resulterende suspensjon ble frafiltrert og filtratet inndampet til tørrhet. Residuet ble kromatografert på en silikagelkolonne (etylacetat/isopropanol/vann = 5:2:1). Fraksjoner med en Rf-verdi på 0,5 ble kombinert og inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (10) (53 mg, 32%). Utgangsmaterialet (5) med en Rf-verdi på 0,3 (61 mg, 39%) og N,N-diallyl-derivatet (8) med en Rf-verdi på 0,9 (20 mg, 11%) ble gjenvunnet.

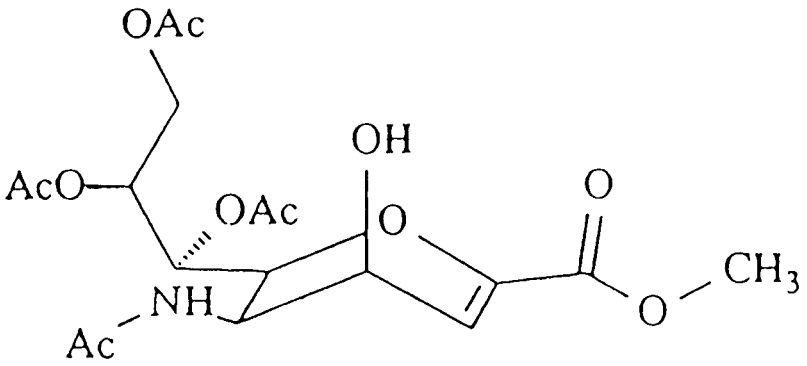
^{1}H-nmr ($CDCl_3$) av forbindelse (10) er som følger
δ (ppm) 1,96, 2,05, 2,06, 2,11 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 3,25 (dd, 1H, $J_{10a,10b}$ -14,1Hz, $J_{10a,11}$ 5,8Hz, H_{10a}), 3,37 (dd, 1H, $J_{10b,10a}$ -14,1Hz, $J_{10b,11}$ 5,9Hz, H_{10b}), 3,43 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 3,1Hz, $J_{4,5}$ 7,5Hz, H_4), 3,79 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,09 (ddd, 1H, $J_{5,4}$ 7,5Hz, $J_{5,NH9}$.1Hz, $J_{5,6}$ 8,1Hz, H_5), 4,21 (dd, 1H, $J_{9',8}$ 7,1Hz, $J_{9',9}$ -12,2Hz, $H_{9'}$), 4,30 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 8,1Hz, $J_{6,7}$ 4,1Hz, H_6), 4,63 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 3,2Hz, $J_{9,9'}$ -12,2Hz, H_9), 5,09 (dd, 1H, $J_{12cis,11}$ 10,2Hz, $J_{12cis,12trans}$ -1,3Hz, H_{12cis}), 5,18 (dd, 1H, $J_{12trans,11}$ 17,1Hz, $J_{12trans,12cis}$ -1,3Hz, $H_{12trans}$), 5,36 (ddd, 1H, $J_{8,7}$ 4,2Hz, $J_{8,9}$ 3,2Hz, $J_{8,9'}$ 7,1Hz, H_8), 5,57 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 4,1Hz, $J_{7,8}$ 4,2Hz, H_7), 5,65 (d, 1H, $J_{NH,5}$ 9,1Hz, -CONH-), 5,83 (dddd, 1H, $J_{11,12trans}$ 17,1Hz, $J_{11,12cis}$ 10,2Hz, $J_{11,10a}$ 5,8Hz, $J_{11,10b}$ 5,9Hz, H_{11}), 6,09 (d, 1H, $J_{3,4}$ 3,1Hz, H_3).

Forbindelse (10) (50 mg, 0,11 mmol) ble omrørt i vannfri metanol (5 ml) som inneholdt natriummetoksyd (12 mg, 0,225 mmol) ved romtemperatur i 2 timer og deretter inndampet til tørrhet. Residuet ble oppløst på nytt i vann (5 ml) og fikk stå ved romtemperatur i 2 timer før nøytralisering med Dowex 50 x 8 (H^+) resin. Den vandige oppløsningen ble frysetørket for å gi forbindelse (11) (31 mg, 78%).

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm) 2,02 (s, 3H, CH_3CO), 3,42 (dd, 1H, $J_{10a,10b}$ -13,4Hz, $J_{10a,11}$ 6,6Hz, H_{10a}), 3,52 (dd, 1H, $J_{10b,10a}$ -13,4Hz, $J_{10b,11}$ 6,3Hz, J_{10b}), 3,51-4,27 (m, 7H, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9 & $H_{9'}$), 5,30 (dd, 1H, $J_{12cis,12trans}$ ~1,5Hz, $J_{12cis,11}$ 10,3Hz, H_{12cis}), 5,34 (dd, 1H, $J_{12trans,12cis}$ ~1,5Hz, $J_{12trans,11}$ 17,7Hz, $H_{12trans}$), 5,72 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,4Hz, H_3), 5,89 (dddd, $J_{11,10a}$ 6,6Hz, $J_{11,10b}$ 6,3Hz, $J_{11,12cis}$ 10,3Hz, $J_{11,12trans}$ 17,7Hz, H_{11})

Eksempel 6 Natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (14)

Det totale reaksjonsskjema er som følger:



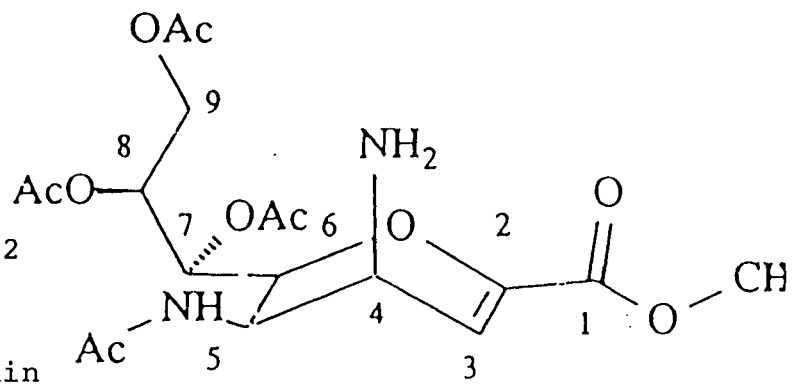
(2)

1) Tf_2O/ pyridin/CH_2Cl_2

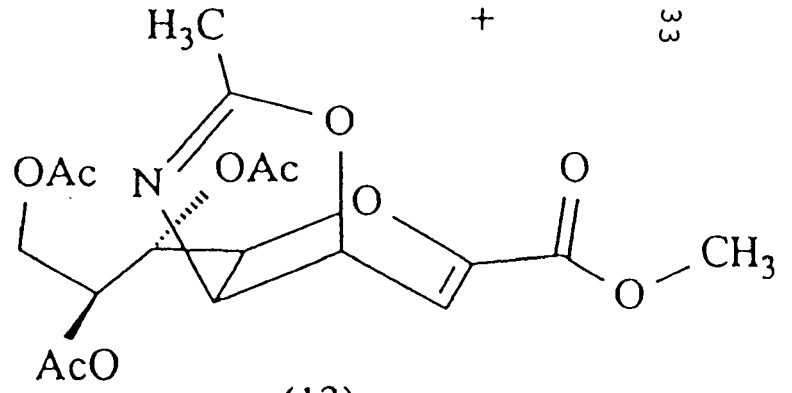
2) *N,N*-Diisopropyl etylamin

3) NaN_3/*n*-$Bu_4N.HSO_4$/ toluen/H_2O

4) H_2S/pyridin



(12)

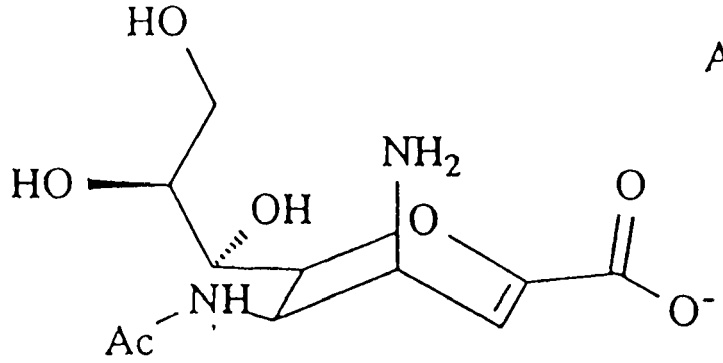


(13)

1) Amberlite IRA-400

(12)

2) OH^-



(14)

Til en omrørt oppløsning av forbindelse (2) (500 mg, 1,04 mmol) i vannfri diklormetan (8 ml) som inneholdt pyridin (205 mg, 2,6 mmol), ble det ved -30° dråpevis tilsatt en oppløsning av trifluormetansulfonsyreanhydrid (Tf2O) (367 mg, 1,3 mmol) i diklormetan (2 ml) i løpet av 20 minutter. Reaksjonsblandingen ble deretter omrørt ved -30° i 5 timer og tilslutt inndampet til tørrhet under redusert trykk. Det resulterende residuum ble omrørt i tørr DMF som inneholdt N,N-diisopropyletylamin (194 mg, 1,5 mmol), ved romtemperatur i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert under høyvakuum for å fjerne DMF. Residuet ble deretter omrørt i en tofaseblanding av toluen (5 ml) og vann (5 ml) som inneholdt tetranbutylammonium-hydrogensulfat (950 mg, 2,8 mmol) og natriumazid (137 mg, 2,1 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer og deretter inndampet til tørrhet. Residuet ble fordelt mellom etylacetat (50 ml) og vann (15 ml), hvorunder det organiske lag ble vasket suksessivt med vann (5 ml x 2) og deretter inndampet til tørrhet. Residuet ble tatt opp i pyridin (5 ml), gjennomboblet med H_2S og deretter inndampet til tørrhet. Residuet ble hurtigkromatografert (silikagel, det første oppløsningsmiddelsystem var etylacetat, det andre oppløsningsmiddelsystem var etylacetat/isopropanol/-H_2O:5/2/1). Etylacetat-eluatet inneholdt forbindelse (13) (260 mg, 53%). Fraksjoner med positiv ninhydrinreaksjon, oppsamlet fra det andre oppløsningsmiddelsystem, ble kombinert og inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (12) (32 mg, 6,5%).
MS (FAB), 431 (M^+ + 1), 414 (M^+ - NH_2).

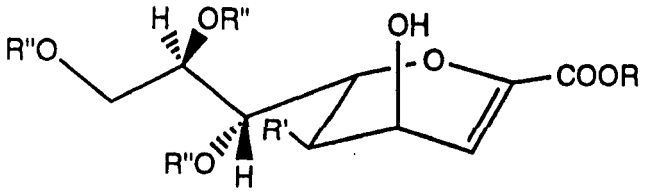
^{1}H-nmr ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ (ppm) 1,96, 2,06, 2,08, 2,09 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 3,52 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 5,5Hz, $J_{4,5}$ 4,5Hz, H_4), 3,80 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,16 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 10,2Hz, $J_{6,7}$ 2,3Hz, H_6), 4,17 (dd, 1H, $J_{9',9}$ -12,4Hz, $J_{9',8}$ 7,3Hz, $H_{9'}$), 4,23 (dd, 1H, $J_{5,6}$ 10,2Hz, $J_{5,4}$ 4,5Hz, H_5), 4,73 (dd, 1H, $J_{9,9'}$ -12,4Hz, $J_{9,8}$ 2,7Hz, H_9), 5,34 (ddd, 1H, $J_{8,7}$ 4,7Hz, $J_{8,9'}$ 7,3Hz, H_8), 5,45 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 2,3Hz, $J_{7,8}$ 4,7Hz, H_7), 6,12 (d, 1H, $J_{3,4}$ 5,5Hz, H_3).

^{13}C-nmr ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ (ppm) 20,7 ($CH_3C(O)O$-), 23,1 ($CH_3C(O)N$-), 43,8 (C_5), 46,2 (C_4), 52,4 ($COOCH_3$), 62,3 (C_9), 68,3, 71,8 (C_7, C_8), 73,0 (C_6), 111,5 (C_3), 143,8 (C_2), 162,4 (C_1), 170,3 & 170,8 (CH_3CO x 4).

Forbindelse (12) ble omrørt i 3 timer i vannfri metanol (5 ml) som inneholdt Amberlite IRA-400 (OH-) resin (100 mg) ved romtemperatur. Etter filtrering ble filtratet inndampet til tørrhet. Residuet ble oppløst i vann (5 ml) og justert til pH 13 med 0,1M NaOH. Den vandige oppløsningen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer og deretter nøytralisert med Dowex 50 x 8 (H^+) resin. Etter filtrering ble filtratet lyofilisert for å gi forbindelse (14) (16 mg, 70%) som ga positiv ninhydrinreaksjon.

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm) 2,10 (s, 3H, CH_3CO), 3,67-3,76 (m, 2H, H_4 & $H_{9'}$), 3,92 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,8Hz, $J_{9,9'}$ -11,9Hz, H_9), 3,90-4,02 (m, 2H, H_7 & H_8), 4,37-4,44 (m, 2H, H_5 & H_6), 5,81 (d, 1H, $J_{3,4}$ 5,14Hz, H_3).

Eksempel 7 Natrium 5-acetamido-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (17).

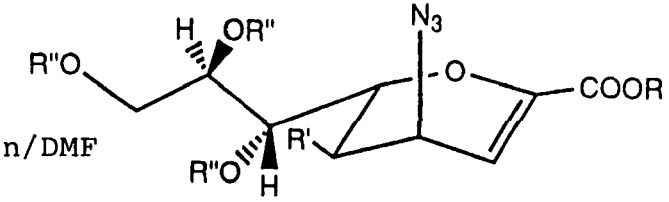


2

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

1) Tf_2O/pyridin /CH_2Cl_2
2) *N,N*- diisopropyletylamin/DMF

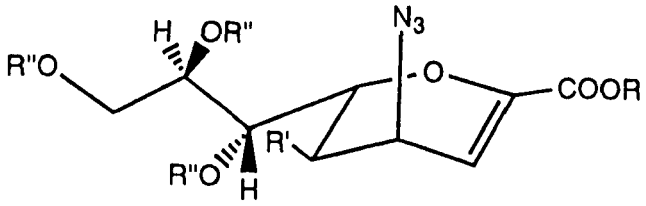
3) NaN_3/n-$Bu_4N.HSO_4$/ toluen/H_2O
4) 0.1 M HCl



15

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

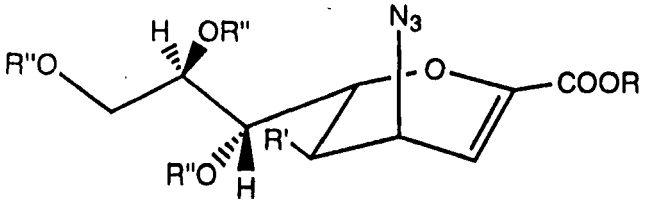
NaOMe/MeOH



16

R =Me, R' = NHAc
R" = H

$NaOH/H_2O$



17

R = Na, R' = NHAc
R" = H

Til en omrørt oppløsning av forbindelse (2) (500 mg, 1,04 mmol) i vannfri diklormetan (8 ml) inneholdende pyridin (205 mg, 2,6 mmol) ble det ved -30°C dråpevis tilsatt en oppløsning av trifluormetansulfonsyreanhydrid (Tf_2O) (367 mg, 1,3 mmol) i diklormetan (2 ml) i løpet av 20 minutter. Reaksjonsblandingen ble deretter omrørt ved 3°C i 5 timer og tilslutt inndampet til tørrhet under redusert trykk. Det resulterende residuum ble omrørt i tørr DMF inneholdende N,N-diisopropyletylamin (194 mg, 1,5 mmol), ved romtemperatur i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert under høyvakuum for å fjerne DMF. Residuet ble deretter omrørt i en tofaseblanding av toluen (5 ml) og vann (5 ml) som inneholdt tetra-n-butylammonium-hydrogensulfat (950 mg, 2,8 mmol) og natriumazid (137 mg, 2,1 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer og deretter fortynnet med 0,2M HCl (5 ml). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 48 timer. Denne reaksjonsblandingen ble tilsatt etylacetat (50 ml) og 2M HCl (1 ml). Det organiske lag ble fraskilt og vasket med vann (5 ml x 3) og deretter inndampet til tørrhet. Residuet ble hurtigkromatografert (silikagel, etylacetat/heksan=2/1). Fraksjoner med R_f-verdi på 0,32 (etylacetat/heksan=2/1 som elueringsmiddel) ble kombinert og inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (15) (40 mg, 8,4%). Kolonnen ble deretter eluert med etylacetat/metanol=10/1 for å gjenvinne utgangsmaterialet (2) (280 mg, 56%). Forbindelse (15) ble isolert som et hvitt skum.

MS (FAB) 457 ($M^+ + 1$), 414 ($M^+ - N_3$),

i.r. ($CHCl_3$) cm^{-1} 2108 ($-N_3$), 1748 (karbonyl)

^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm) 1,97, 2,04, 2,06, 2,07 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 3,82 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,12 ~4,20 (m, 3H, C_6, C_4 & C_9), 4,51 (ddd, 1H, $J_{5,4}$ 4,4Hz, $J_{5,6}$ 10,7Hz, $J_{5,NH}$ 10,1Hz, H_5), 4,69 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,6Hz, $J_{9,9'}$ 12,4Hz, H_9), 5,31 (m, 1H, $J_{8,7}$ 4,9Hz, $J_{8,9}$ 2,6Hz, $J_{8,9'}$ 7,0Hz, H_8), 5,45 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 2,1Hz, $J_{7,8}$ 4,9Hz, H_7), 5,68 (d, 1H, $J_{NH,5}$ 10,1Hz, CONH), 6,15 (d, 1H, $J_{3,4}$ 5,7Hz, H_3).

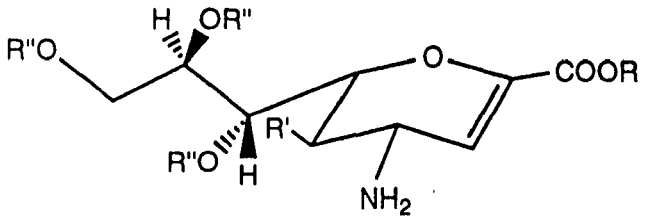
^{13}C-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm)
20,7, 20,8, (CH_3CO-O x 3), 23,1 (O CH_3 CO-NH), 44,8 (C_5), 52,6 ($COOCH_3$), 54,8 (C_4), 62,1 (C_9), 67,6, 71,3 (C_7, C_8), 73,5 (C_6), 104,5 (C_3), 146,3 (C_2), 161,5 (C_1), 169,9, 170,2, 170,5 (acetyl, -C=O x 4)

Forbindelse (15) (40 mg, 0,088 mmol) ble oppløst i vannfri metanol (4 ml) som inneholdt natriummetoksyd (6,4 mg, 0,12 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer og konsentrert til tørrhet i vakuum for å gi forbindelse (16), som deretter ble oppløst i vann (3 ml), omrørt ved romtemperatur i 2 timer, justert til pH 6-7 med Dowex 50 x 8 (H^+) resin og deretter lyofilisert for å gi tittelforbindelsen (17) som et gulaktig pulver (25 mg, 83%)

i.r. (KBr) cm^{-1} 3400 (br, -OH), 2108 ($-N_3$), 1714 (karbonyl),

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm) 1,97 (s, 3H, acetyl), 3,5~4,4 (m, 7H, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9 & $H_{9'}$), 6,07 (d, $J_{3,4}$ 5,6Hz, H_3)

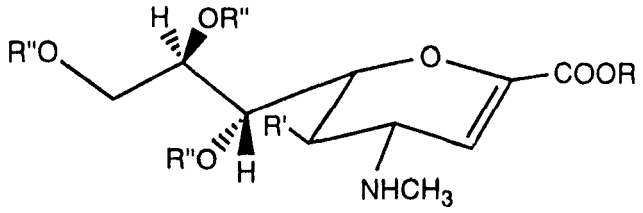
Eksempel 8 Natrium 5-acetamido-4-N-metylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (20)



5

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

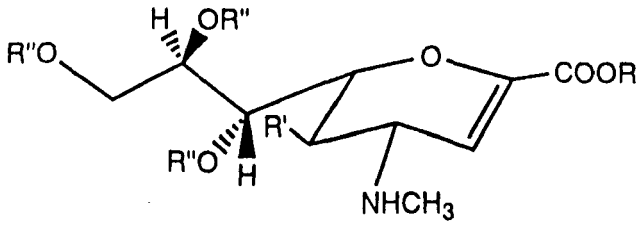
$MeI/Ag_2CO_3/CH_3CN$



18

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

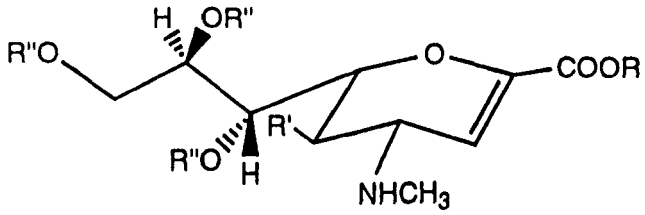
NaOMe/MeOH



19

R =Me, R' = NHAc
R" = H

$NaOH/H_2O$



20

R = Na, R' = NHAc
R" = H

Til en oppløsning av metyljodid (15 mg, 0,10 mmol) og forbindelse (5) (48 mg, 0,11 mmol) i acetonitril (6 ml) ble det tilsatt sølvkarbonat (42 mg, 0,15 mmol). Blandingen ble omrørt under beskyttelse mot lys, ved romtemperatur i 16 timer. Den resulterende suspensjon ble frafiltrert og filtratet inndampet til tørrhet. Residuet ble kromatografert (silikagel, etylacetat/isopropanol/vann=5/2/1). Fraksjoner med R_f-verdi på 0,36 ble kombinert og konsentrert i vakuum til tørrhet for å gi forbindelse (18) (25 mg, 51%).

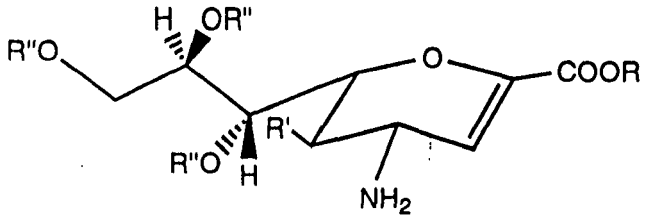
MS (FAB) 445 ($M^+ + 1$), 414 ($M^+ - NHCH_3$)

^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm) 1,95, 2,05, 2,06, 2,12 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 2,45 (s, 3H, N-CH_3), 3,72 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 2,3Hz, $J_{4,5}$ 9,2Hz, H_4), 3,89 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,16 (dd, 1H, $J_{9',8}$ 7,2Hz, $J_{9',9}$ 12,3Hz, $H_{9'}$), 4,26 (ddd, 1H, $J_{5,4}$ 9,2Hz, $J_{5,NH}$ 9,1Hz, $J_{5,6}$ 9,0Hz, H_5), 4,36 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 9,0Hz, $J_{6,7}$ 2,7Hz, H_6), 4,64 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,9Hz, $J_{9,9'}$ 12,3Hz, H_9), 5,34 (m, 1H, $J_{8,7}$ 4,8Hz, $J_{8,9}$ 2,9Hz, $J_{8,9'}$ 7,2Hz, H_8), 5,51 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 2,7Hz, $J_{7,8}$ 4,8Hz), 6,05 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,3Hz, H_3)

Forbindelse (18) (25 mg, 0,056 mmol) ble omrørt i vannfri metanol (5 ml) som inneholdt natriummetoksyd (5,4 mg, 0,1 mmol), ved romtemperatur i 2 timer og deretter inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (19), som ble oppløst på nytt i vann (5 ml) og fikk stå ved romtemperatur i 2 timer før nøytralisering med Dowex 50 x 8 (H^+) resin. Filtratet ble lyofilisert for å gi forbindelse (20) (15 mg, 82%)

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm) 1,94 (s, 3H, CH_3CO), 2,43 (s, 3H, N-CH_3), 3,5~4,3 (m, 7H, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9 & $H_{9'}$), 5,65 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2Hz, H_3)

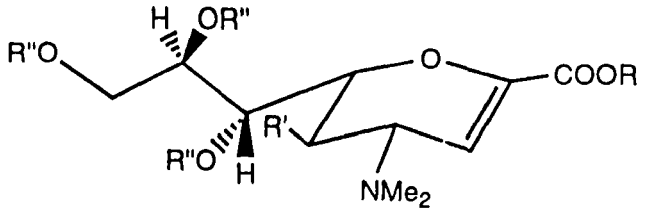
Eksempel 9 Natrium 5-acetamido-4-N,N-dimetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (23)



5

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

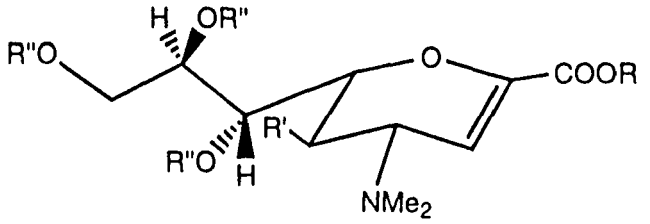
$MeI/Ag_2CO_3/CH_3CN$



21

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

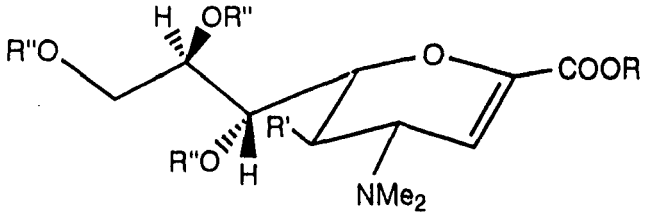
Amberlite IRA-400 (OH^-)
MeOH



22

R =Me, R' = NHAc
R" = H

$NaOH/H_2O$



23

R = Na, R' = NHAc
R" = H

302751

Til en oppløsning av metyljodid (65 mg, 0,46 mmol) og forbindelse (5) (100 mg, 0,23 mmol) i acetonitril (15 ml) ble det tilsatt sølvkarbonat (127 mg, 0,46 mmol). Blandingen ble omrørt og beskyttet mot lys ved romtemperatur i 16 timer. Den resulterende suspensjon ble filtrert og filtratet inndampet til tørrhet. Residuet ble hurtigkromatografert (silikagel, etylacetat/isopropanol/vann=5/2/1) for å gi forbindelse (21) (30 mg, 28%) som et farveløst skum.

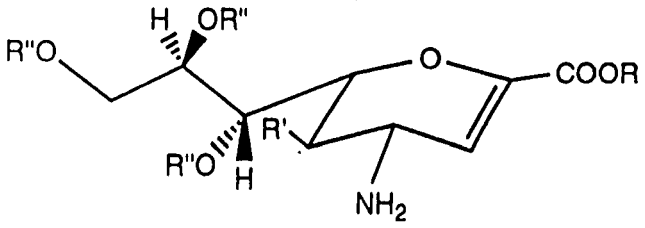
MS (FAB) 459 (M^+ + 1), 414 (M^+ -$N(CH_3)_2$)

^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,98, 2,05, 2,06, 2,12 (s, 12H, acetyl, CH_3 x 4), 2,33 (br s, 6H, $N(CH_3)_2$), 3,42 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 2,8Hz, $J_{4,5}$ 8,6Hz, H_4), 3,79 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,17 (dd, 1H, $J_{9'8}$ 7,4Hz, $J_{9',9}$ 12,3Hz, $H_{9'}$), 4,18 (ddd, 1H, $J_{5,4}$ 8,5Hz, $J_{5,NH}$ 8,9Hz, $J_{5,6}$ 9,0Hz, H_5), 4,31 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 9,0Hz, $J_{6,7}$ 2,9Hz, H_6), 4,68 (dd, 1H, J9,8 3,0Hz, $J_{9,9'}$ 12,3Hz, H_9), 5,31 (m, 1H, $J_{8,7}$ 4,4Hz, $J_{8,9}$ 3,0Hz, $J_{8,9'}$ 7,4Hz, H_8), 5,51 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 2,9Hz, $J_{7,8}$ 4,4Hz, H_7), 5,79 (d, 1H, $J_{NH,5}$ 8,9Hz, CONH), 6,09 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,8Hz, H_3)

Forbindelse (21) (30 mg, 0,066 mmol) ble omrørt i vannfri metanol (4 ml) som inneholdt tørr Amberlite IRA 400 (OH^-) resin (90 mg) ved romtemperatur i 3 timer, hvorpå resinet ble frafiltrert. Filtratet og vaskevæskene ble kombinert og inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (22) (20 mg), som ble omrørt i vann (5 ml) ved pH 12 ved romtemperatur i 2 timer og deretter justert til pH 7,5 med Dowex 50 x 8 (H^+) før filtrering. Filtratet ble lyofilisert for å gi forbindelse (23) (15 mg, 66%) som et hvitt pulver.

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm)
1,97 (s, 3H, acetyl), 2,33 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 3,50~4,26 (m, 7H, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9 & $H_{9'}$), 5,71 (d, $J_{3,4}$ 1,8Hz, H_3)

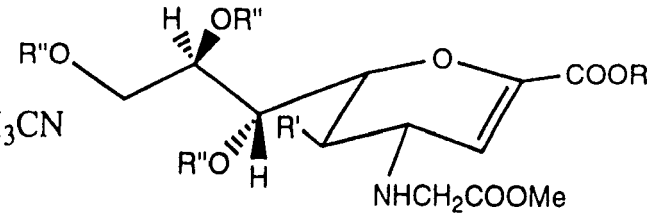
Eksempel 10 Dinatrium 5-acetamido-4-N-oksykarbonylmetyl-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (26)



5

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

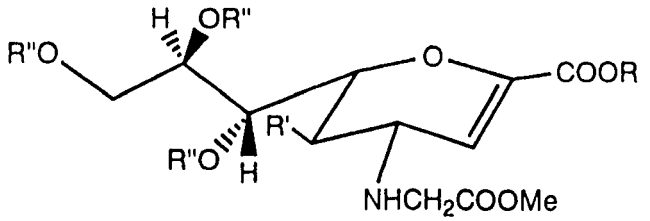
$BrCH_2COOMe/Ag_2CO_3/CH_3CN$



24

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

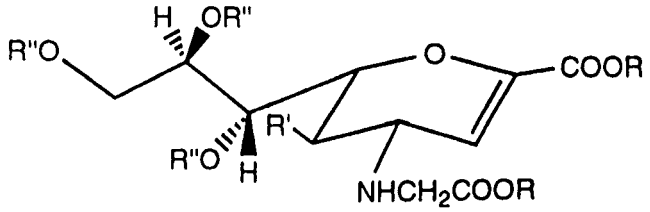
NaOMe/MeOH



25

R =Me, R' = NHAc
R" = H

$NaOH/H_2O$



26

R = Na, R' = NHAc
R" = H

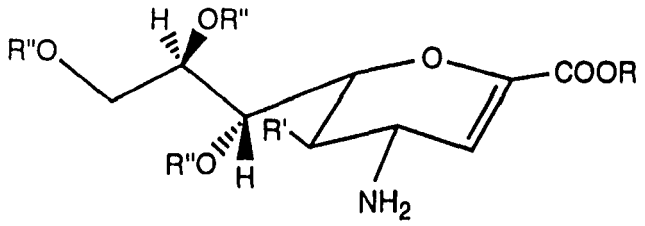
Til en oppløsning av metyl α-bromacetat (36 mg, 0,23 mmol) og forbindelse (5) (100 mg, 0,23 mmol) i acetonitril (12 ml) ble det tilsatt sølvkarbonat (64 mg, 0,23 mmol). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer under beskyttelse mot lys og deretter filtrert. Filtratet ble inndampet til tørrhet. Residuet ble kromatografert på en silikagelkolonne (etylacetat/isopropanol/vann=5/2/1). Fraksjoner med R_f-verdi på 0,60 ble oppsamlet og inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (24) (80 mg, 68,5%)

^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,97, 2,044, 2,047, 2,11 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 3,49 (AB, 2H, J_{AB} 17,6Hz, H_{10} x 2), 3,50 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 2,9Hz, $J_{4,5}$ 8,4Hz, H_4), 3,71 (s, 3H, C_{11}OOMe), 3,79 (s, 3H, C_1OOMe), 4,09 (ddd, 1H, $J_{5,4}$ 8,4Hz, $J_{5,NH}$ 8,8Hz, $J_{5,6}$ 8,1Hz, H_5), 4,17 (dd, 1H, $J_{9',8}$ 7,4Hz, $J_{9',9}$ 12,3Hz, $H_{9'}$), 4,32 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 8,1Hz, $J_{6,7}$ 4,1Hz, H_6), 4,63 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 3,1Hz, $J_{9,9'}$ 12,3Hz, H_9), 5,37 (m, 1H, $J_{8,7}$ 4,1Hz, $J_{8,9}$ 3,1Hz, $J_{8,9'}$ 7,4Hz, H_8), 5,56 (t, 1H, $J_{7,6}$ 4,1Hz, $J_{7,8}$ 4,1Hz, H_7), 6,03 (d, 1H, $J_{NH,5}$ 8,8Hz, CONH), 6,04 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,9Hz, H_3)

Forbindelse (24) (80 mg, 0,159 mmol) ble omrørt i vannfri metanol (20 ml) som inneholdt natriummetoksyd (18 mg, 0,32 mmol) ved romtemperatur i 2 timer og deretter inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (26), som ble oppløst på nytt i vann (15 ml). Oppløsningen fikk stå ved romtemperatur i 2 timer før justering av pH til 7 med Dowex 50 x 8 (H^+) resin. Filtratet ble frysetørket for å gi forbindelse (25) som et hvitt pulver (59 mg, 94,6%)

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm)
2,04 (s, 3H, acetyl), 3,58 (AB, 2H, J_{AB} 17,6Hz, H_{10} x 2), 3,50~4,40 (m, 7H, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9 & $H_{9'}$), 5,68 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,1Hz, H_3).

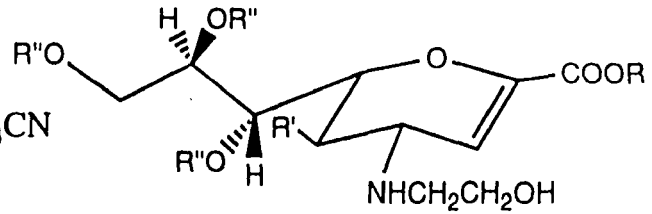
Eksempel 11 Natrium 5-acetamido-4-N-2'-hydroksyetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (29)



5

R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

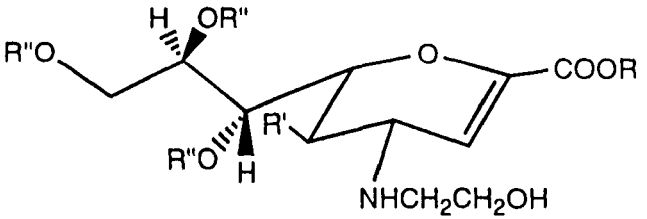
$BrCH_2CH_2OH/Ag_2CO_3/CH_3CN$



27

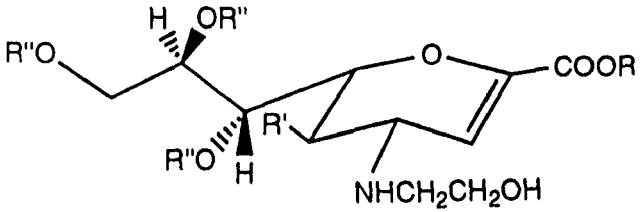
R = Me, R' = NHAc
R" = Ac

Amberlite IRA-400 (OH^-)
MeOH



28
R =Me, R' = NHAc
R" = H

$NaOH/H_2O$



29
R = Na, R' = NHAc
R" = H

Til en oppløsning av brometanol (158 mg, 1,26 mmol) og forbindelse (5) (84 mg, 0,195 mmol) i acetonitril (10 ml) ble det tilsatt sølvkarbonat (100 mg, 0,36 mmol). Blandingen ble beskyttet mot lys og omrørt ved romtemperatur i 7 dager. Den ble deretter filtrert og filtratet inndampet til tørrhet. Residuet ble kromatografert på en silikagelkolonne (etylacetat/isopropanol/vann=5/2/1). Fraksjoner med R_f-verdi på 0,4 ble kombinert og inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (27) (40 ml, 40%)

MS (FAB) 475 (M^+ + 1), 414 (M^+ -$NHCH_2CH_2OH$)

^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,96, 2,05, 2,10 (s, 12H, acetyl CH_3 x 4), 2,29 (br s, 2H, NH & OH), 2,76 (ABm, 2H, H_{10} x 2), 3,47 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 2,9Hz, $J_{4,5}$ 7,5Hz, H_4), 3,62 (t, 2H, $J_{11,10}$ 4,9Hz, H_{11} x 2), 3,79 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,15 (ddd, 1H, $J_{5,4}$ 7,5Hz, $J_{5,6}$ 8,4Hz, $J_{5,NH}$ 8,3Hz, H_5), 4,19 (dd, 1H, $J_{9',8}$ 7,5Hz, $J_{9',9}$ 12,3Hz, $H_{9'}$), 4,29 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 8,4Hz, $J_{6,7}$ 3,8Hz, H_6), 4,65 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 2,9Hz, $J_{9,9'}$ 12,3Hz, H_9), 5,36 (m, 1H, $J_{8,7}$ 4Hz, $J_{8,9}$ 2,9Hz, $J_{8,9'}$ 7,5Hz, H_8), 5,55 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 3,8Hz, $J_{7,8}$ 4Hz, H_7), 6,08 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,9Hz, H_3), 6,09 (d, 1H, $J_{NH,5}$ 8,3Hz, CONH)

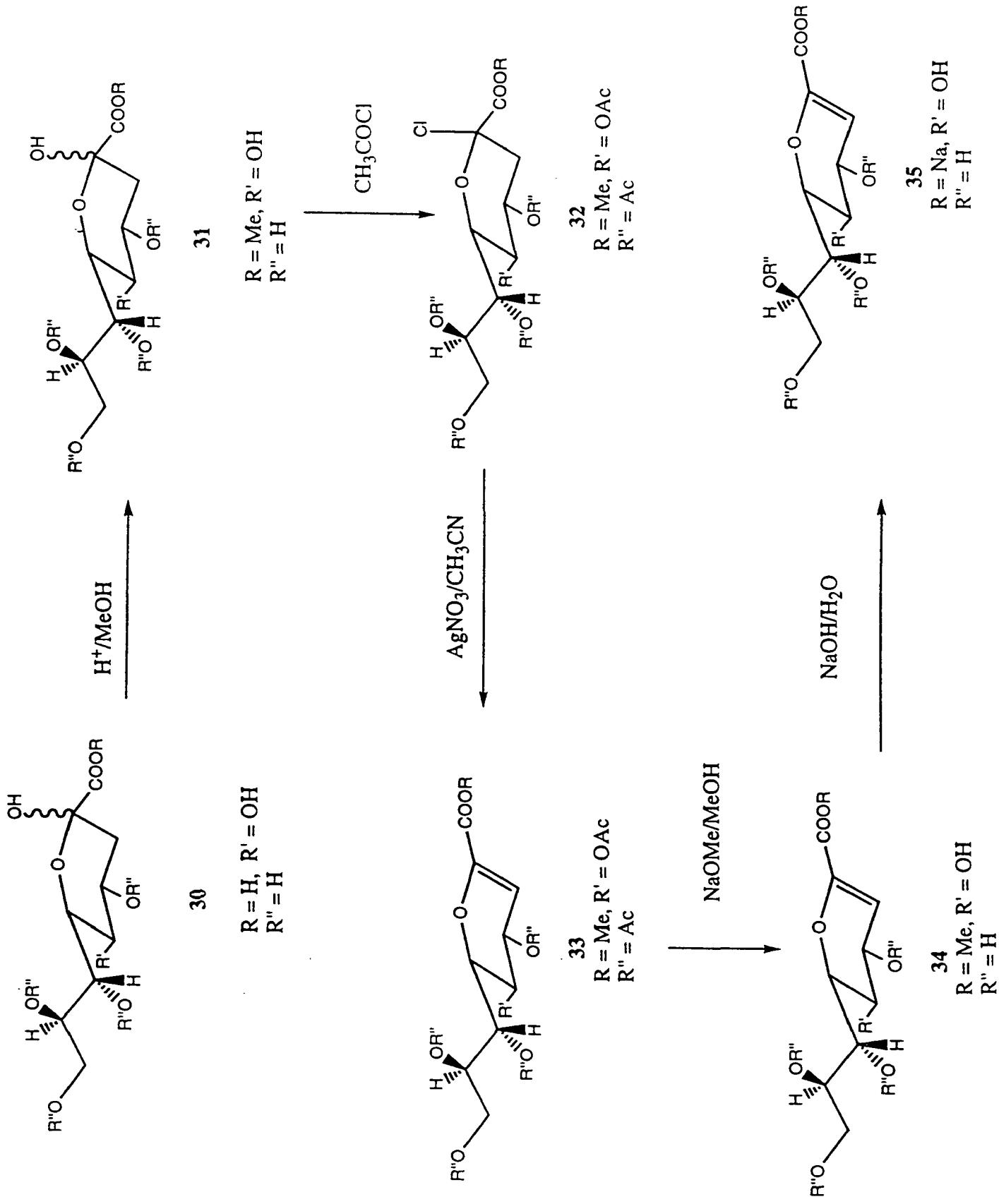
^{13}C-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm)
20,6, 20,8 (CH_3-CO-O- x 3), 23,10 (CH_3-CO-NH), 46,5 (C_5), 47,2 (C_{10}), 52,3 (CH_3COOCH_3), 55,6 (C_4), 61,1 (C_{11}), 62,1 (C_9), 68,1, 71,1, (C_7, C_8), 76,7 (C_6), 111,6 (C_3), 143,7 (C_2), 162,1 (C_1), 170,1, 170,3, 170,6, 171,0 (acetyl karbonyl x 4)

Forbindelse (27) (40 mg, 0,084 mmol) ble ved romtemperatur omrørt i vannfri metanol (10 ml) som inneholdt tørr Amberlite IRA-400 (OH^-) (120 mg) i 4 timer og deretter filtrert. Filtratet og vaskevæskene ble kombinert og inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (28) som ble oppløst på nytt i vann (10 ml) og justert til pH 13 ved tilsetning av NaOH. Den vandige oppløsningen ble hensatt ved romtemperatur i 3 timer før justering av pH til 6-7 med Dowex 50 x 8 (H^+) resin.

Etter filtrering ble oppløsningen lyofilisert for å gi forbindelse (29) som et hvitt pulver (20 mg, 66%)

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm)
1,99 (s, 3H, acetyl), 2,91 (AB, 2H, H_{10} x 2), 3,53~4,25 (m, 9H, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9, $H_{9,,}$ H_{11} x 2), 5,65 (d, $J_{3,4}$ 2,24Hz, H_3)

Eksempel 12 Natrium 2,3-dideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (35)


H+/MeOH
CH3COCl
AgNO3/CH3CN
NaOMe/MeOH
NaOH/H2O
30
R = H, R' = OH
R'' = H
31
R = Me, R' = OH
R'' = H
32
R = Me, R' = OAc
R'' = Ac
33
R = Me, R' = OAc
R'' = Ac
34
R = Me, R' = OH
R'' = H
35
R = Na, R' = OH
R'' = H

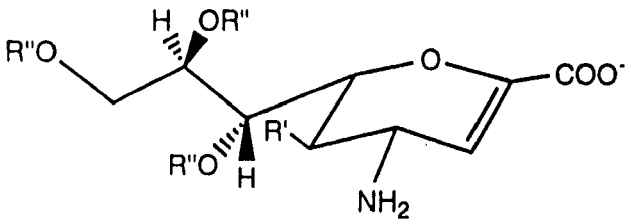
Forbindelse (30) (332 mg, 1,24 mmol) ble ved romtemperatur omrørt i vannfri metanol (40 ml) som inneholdt Dowex 50 x 8 (H^+) resin (50 mg) i 16 timer før filtrering. Filtratet ble inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (31) (320 mg, 1,13 mmol, 91,5%) som ble omrørt i acetylklorid (5 ml) ved romtemperatur i 3 dager og deretter inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (32) (539 mg, 1,057 mmol, 93,6%). Residuet ble oppløst i acetonitril (20 ml) som inneholdt sølvnitrat (500 mg, 2,94 mmol) og kaliumkarbonat (90 mg, 0,65 mmol), beskyttet mot lys og omrørt ved romtemperatur i 16 timer og deretter filtrert. Filtratet ble inndampet til et lite volum og fordelt mellom etylacetat (75 ml) og vann (15 ml). Det organiske lag ble vasket med vann (10 ml x 3) og inndampet til tørrhet. Residuet ble kromatografert på en silikagelkolonne (etylacetat/heksan=2/1) for å gi ren forbindelse (33) (200 mg, 0,423 mmol, 40%)

^{1}H-nmr ($CDCl_3$) δ (ppm)
2,062, 2,070, 2,073, 2,094, 2,096 (s, 15H, acetyl CH_3 x 5), 3,80 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,19 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 5,9Hz, $J_{9',9}$ 12,3Hz, $H_{9'}$), 4,33 (dd, 1H, $J_{6,5}$ 9,4Hz, $J_{6,7}$ 3,0Hz, H_6), 4,57 (dd, 1H, $J_{9,8}$ 1,9Hz, $J_{9,9'}$ 12,3Hz, H_9), 5,20 (dd, 1H, $J_{5,4}$ 7,0Hz, $J_{5,6}$ 9,4Hz, H_5), 5,38 (m, 1H, $J_{8,7}$ 5,1Hz, $J_{8,9}$ 1,9Hz, $J_{8,9'}$ 5,9Hz, H_8), 5,49 (dd, 1H, $J_{7,6}$ 3,0Hz, $J_{7,8}$ 5,1Hz, H_7), 5,57 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 3,1Hz, $J_{4,5}$ 7,0Hz, H_4), 5,97 (d, 1H, $J_{3,4}$ 3,1Hz, H_3).

Forbindelse (33) (100 mg, 0,211 mmol) ble omrørt i vannfri metanol (10 ml) som inneholdt natriummetoksyd (24 mg, 0,423 mmol), ved romtemperatur i 3 timer og deretter inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (34) (50 mg, 90%) som ble oppløst på nytt i vann (5 ml) og hensatt ved romtemperatur i 3 timer før justering av pH til 7 med Dowex 50 x 8 (H^+) resin. Oppløsningen ble frysetørket for å gi forbindelse (35) (47 mg, 91%)

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm)
3,69 (dd, 1H, $J_{9',8}$ 5,6Hz, $J_{9',9}$ 12,0Hz, $H_{9'}$), 3,76 (dd, 1H, $J_{5,4}$ 7,8Hz, $J_{5,6}$ 10,5Hz, H_5), 3,87~3,99 (m, 3H, H_7, H_8, H_9), 4,13 (d, 1H, $J_{6,5}$ 10,5Hz, H_6), 4,40 (dd, 1H, $J_{4,3}$ 2,3Hz, $J_{4,5}$ 7,8Hz, H_4), 5,67 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,3Hz, H_3)

Eksempel 13 Natrium 4,5-diamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (38)

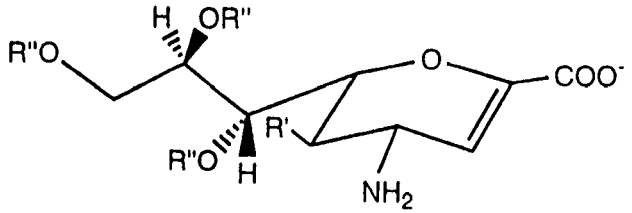


6

R' = NHAc
R" =H

$NH_2NH_2.H_2O$

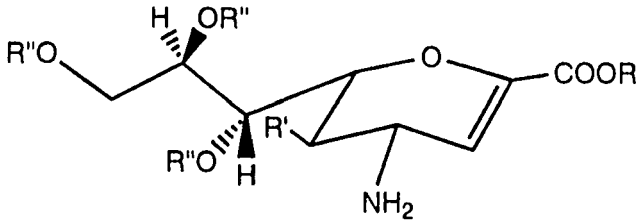
Varme



36

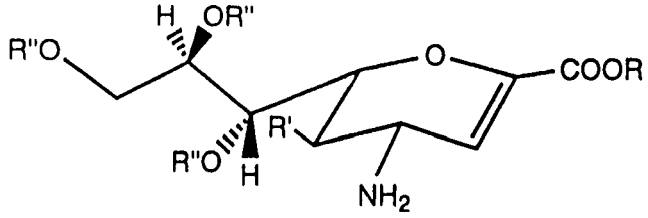
R' = NH_2
R" = H

1) Amberlite IRA-400 ($HCOO^-$)
2) 1.5 M HCOOH
3) Amberlite IR-4B (OH^-)



37
R =H, R' = NH_2
R" = H

NaOH



38
R = Na, R' = NH_2
R" = H

En oppløsning av forbindelse (6) (125 mg, 0,40 mmol) i hydrazinhydrat (5 ml) ble oppvarmet til 85°C under argon i 3 dager og den resulterende blanding vakuuminndampet til tørrhet. Residuet ble oppløst i vann (15 ml) og sendt gjennom en kolonne av Amberlite IRA-400 ($HCOO^-$) og deretter eluert med 1,5M HCOOH. Eluatet (200 ml) ble inndampet til tørrhet. Residuet ble kromatografert på silikagel som var deaktivert med 10% vann (elueringsmiddel; isopropanol/vann=4/1). Fraksjoner med R_f-verdi på 0,1 ble kombinert og inndampet til tørrhet og deretter frysetørket. Residuet, forbindelse (36), ble oppløst i vann (10 ml) og sendt gjennom en liten kolonne av Amberlite IR-4B (OH^-) (10 ml). Effluenten ble inndampet til tørrhet for å gi forbindelse (37), MS (FAB) for denne var 249 ($M^+ + 1$). Forbindelse (37) ble oppløst i vann og justert til pH 7,5 med 0,1M NaOH og deretter frysetørket for å gi forbindelse (38) (20 mg, 20%) som et hvitt pulver.

^{1}H-nmr (D_2O) δ (ppm)
3,01 (dd, 1H, $J_{5,4}$ 9,7Hz, $J_{5,6}$ 10,2Hz, H_5), 3,58 (m, 2H, H_9 & H_7), 3,80-3,89 (m, 3H, H_4, H_8 & H_9), 4,06 (d, 1H, $J_{6,5}$ 10,2Hz, H_6), 5,54 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,4Hz, H_3)

Eksempel 14 Metyl 5-acetamido-2,3,5-trideoksy-9-(p-toluensulfonyl)-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (39).

En oppløsning av metyl 5-acetamido-2,3,5-trideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (1000 mg, 3,16 mmol) i tørr pyridin (85 ml) ble avkjølt i et isbad. p-toluensulfonylklorid (660 mg, 3,46 mmol) ble tilsatt og den blekgule homogene oppløsningen omrørt over natten ved 4°C.

Mer p-toluensulfonylklorid (220 mg, 1,15 mmol) ble tilsatt og oppløsningen omrørt i ytterligere 4 timer ved romtemperatur.

Opparbeidning skjedde ved tilsetning av vann (1 ml) etterfulgt av rotasjonsinndampning for å gi en viskøs gul olje, som ble hurtigkromatografert (SiO_2, EtOAc/i-PrOH/H_2O, 6/2/1, volumdeler) for som hovedproduktet, å gi 1,19 g (80%

utbytte) av forbindelse (39)

i.r. (KBr): ν_{maks} (cm^{-1}) 2964 (OH), 1730 (CO_2CH_3), 1656 (NHAc), 1358, 1174 (SO_2), 810, 662, 550 (Ar)

MS (FAB); 460 $(M+H)^+$

^{1}H-nmr (300MHz, CD_3OD/TMS); δ (ppm) = 2,03 (s, 3H, NHAc), 2,45 (s, 3H, $ArCH_3$), 3,49 (d, 1H, $J_{6,7}$ 1,70, H_6), 3,76 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,91 (dd, 1H, $J_{5,6}$ 10,80, H_5), 3,98-4,13 (m, 3H, H_8, H_9 og $H_{9'}$), 4,28 (dd, 1H, $J_{7,8}$ 9,55, H_7), 4,39 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 8,64, H_4), 5,92 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,49, H_3), 7,74 (d, 2H, ArH), 7,79 (d, 2H, ArH)

Eksempel 15 Metyl 5-acetamido-9-azido-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (40)

Metyl 5-acetamido-2,3,5-trideoksy-9-(p-toluensulfonyl)-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (39) (600 mg, 1,27 mmol) og litiumazid (186 mg, 3,80 mmol) ble oppløst i tørr DMF (20 ml) og den gule homogene oppløsningen oppvarmet til 80°C. Etter 2 timer ble mer litiumazid (186 mg, 3,80 mmol) tilsatt og oppløsningen hensatt ved 80°C over natten. Oppløsningsmidlet ble fjernet ved rotasjonsfordampning og den gjenværende mørkebrune olje oppløst i pyridin (2 ml) og hurtigkromatografert (SiO_2, 5/2/1 EtOAc/i-PrOH/H_2O). Hovedproduktet var forbindelse (40) (370 mg, 88% utbytte) oppnådd som et hvitt skum.

i.r. (KBr): ν_{maks} (cm^{-1}) 3428 (s, OH), 2104 (s, N_3), 1730 (s, CO_2CH_3), 1656 (s, NHAc)

MS (FAB): 331 $(M+H)^+$

^{1}H-nmr (300 MHz, D_2O): δ (ppm) = 1,94 (s, 3H, NHAc), 3,37 (dd, 1H, $H_{9'}$), 3,48-3,57 (m, 2H, $J_{8,9'}$ 5,77, H_8 og $J_{9,9'}$ 13,16, H_9), 3,66 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,91-3,98 (m, 2H, H_5 og H_6), 4,15

(d, 1H, $J_{7,8}$ 10,86, H_7), 4,38 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 8,88, H_4), 5,91 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,44, H_3)

Eksempel 16 Metyl 5,9-diacetamido-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (41)

Tioleddiksyre (130 ml, 1,82 mmol) ble tilsatt til metyl 5-acetamido-9-azido-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (70 mg, 0,21 mmol) for å gi en blekgul oppløsning som fikk omrøres over natten ved romtemperatur.

Overskudd av tioleddiksyre ble deretter inndampet under lavt trykk og det gjenværende faststoff gjentatte ganger behandlet med vann etterfulgt av inndampning (3 x 3 ml). Det gjenværende faststoff ble oppløst i metanol (4 ml), filtrert og filtratet påsatt en preparativ tlc-plate (SiO_2, 20 cm x 20 cm x 2 mm, eluert med 5/2/1 EtOAc/i-PrOH/H_2O). Båndet med R_f = 0,47 ble opparbeidet for å gi 51 mg (70% utbytte) av forbindelse (41) som et hvitt pulver.

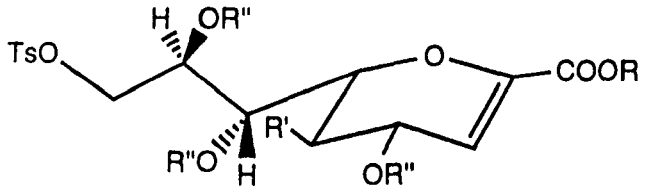
i.r. (KBr): ν_{maks} (cm^{-1}) 3400 (s, OH), 1728 (s, CO_2CH_3), 1656 (s, NHAc)

MS (FAB): 347 $(M + H)^+$

^{1}H-nmr (300 MHz, D_2O): δ (ppm) = 1,96 (s, 3H, NHAc), 2,00 (s, 3H, NHAc), 3,23 (dd, 1H, $H_{9'}$), 3,48 (d, 1H, H_6), 3,56 (dd, 1H, $J_{9,9'}$ 14,17, H_9), 3,75 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,89 (m, 1H, $J_{8,9}$ 2,90, $J_{8,9'}$ 7,40, H_8), 4,02 (dd, 1H, $J_{5,6}$ 9,10, H_5), 4,22 (d, 1H, $J_{7,8}$ 10,85, H_7), 4,45 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 8,94, H_4), 5,61 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,47, H_3)

Eksempel 17 5,9-diacetamido-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (42)

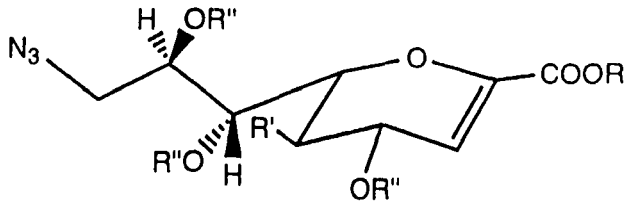
Fremstillingen av forbindelse (42) fra forbindelse (39) er sammenfattet nedenfor:



39

R = Me, R' = NHAc
R" = H

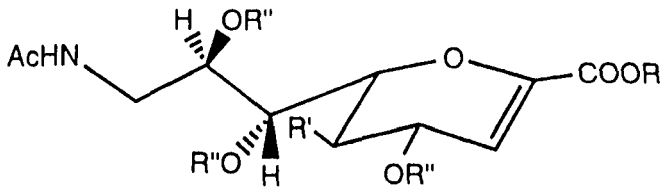
1) LiN_3/DMF/80° C



40

R = Me, R' = NHAc
R" = H

CH_3COSH

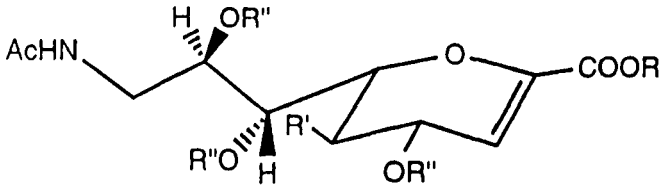


41

R = Me, R' = NHAc
R" = H

1) OH^-

2) H^+



42

R = H, R' = NHAc
R" = H

En oppløsning av metyl 5,9-diacetamido-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (41) (46 mg, 0,13 mmol) oppløst i 0,1M vandig natriumhydroksyd (5 ml), ble omrørt ved romtemperatur i 2,5 timer. Oppløsningen ble deretter justert til pH 5 med Dowex 50W-X8 (H^+), resinet frafiltrert og filtratet lyofilisert for å gi 40 mg (91% utbytte) av forbindelse (42) som et hvitt pulver.

i.r. (KBr): ν_{maks} (cm^{-1}) 3376 (s, OH), 1652 (s, NHAc)

MS (FAB): 333 $(M + H)^+$

^{1}H-nmr (300 MHz, D_2O): δ (ppm) = 1,89 (s, 3H, NHAc), 1,93 (s, 3H, NHAc), 3,15 (dd, 1H, $H_{9'}$), 3,40 (d, 1H, H_6), 3,48 (dd, 1H, $J_{9,9'}$ 14,18, H_9), 3,82 (m, 1H, $J_{8,9}$ 3,01, $J_{8,9'}$ 7,43, H_8), 3,94 (dd, 1H, $J_{5,6}$ 10,42, H_5), 4,13 (d, 1H, $J_{7,8}$ 10,91, H_7), 4,36 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 8,80, H_4), 5,81 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,41, H_3)

Eksempel 18 Metyl 5-acetamido-9-cyano-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (43)

En oppløsning av metyl 5-acetamido-2,3,5-trideoksy-9-(p-toluensulfonyl)-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (39) (80 mg, 0,17 mmol), tert-butylammoniumcyanid (2 mg) og natriumcyanid (12 mg, 0,25 mmol) i tørr DMSO (1,25 ml) ble omrørt ved romtemperatur i 5 dager.

Opparbeidning ved preparativ tynnskiktkromatografi (SiO_2, 20 cm x 20 cm x 2 mm, eluert med EtOAc/i-PrOH/H_2O, 5/2/1) ga som hovedkomponent 30 mg (61% utbytte) av forbindelse (43) som et kremgult pulver.

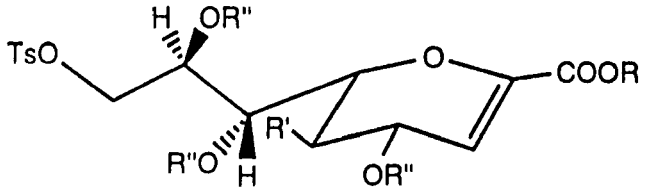
(R_f= 0,74)
i.r. (KBr): ν_{maks} (cm^{-1}) 3440 (s, OH), 2256 (w, CN), 1726 (s, CO_2CH_3), 1638 (s, NHAc)

MS (FAB): 315 $(M + H)^+$

^{1}H-nmr (300 MHz, D_2O): δ (ppm) = 1,92 (s, 3H, NHAc), 2,75 (dd, 1H, $H_{9'}$), 2,93 (dd, 1H, $J_{9,9'}$ 17,22, H_9), 3,55 (dd, 1H, $J_{6,7}$ 1,17, H_6), 3,67 (s, 3H, CO_2CH_3), 4,02 (dd, 1H, $J_{5,6}$ 9,05, H_5), 4,13-4,19 (m, 1H, $J_{8,9}$ 3,91, $J_{8,9'}$ 6,56, H_8), 4,16 (dd, 1H, $J_{7,8}$ 10,90, H_7), 4,37 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 8,95, H_4), 5,90 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,42, H_3)

Eksempel 19 5-acetamido-9-cyano-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (44)

Metodikken benyttet for å fremstille 5-acetamido-9-cyano-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (44) er sammenfattet nedenfor:

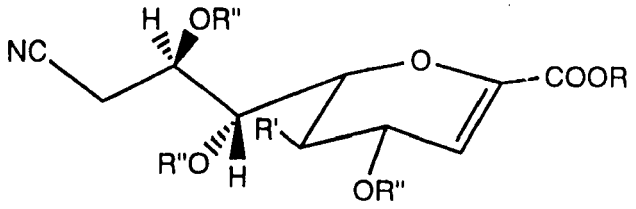


39

R = Me, R' = NHAc
R" = H

1) NaCN/t-Bu_4NCN

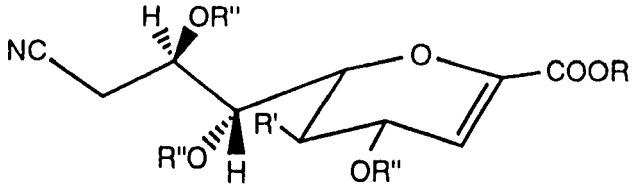
DMSO/5 dager



43

R = Me, R' = NHAc
R" = H

1) vandig NaOH
2) H^+ harpiks



44

R = H, R' = NHAc
R" = H

Metyl 5-acetamido-9-cyano-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (43) (80 mg, 0,25 mmol) ble oppløst i 0,1M natriumhydroksyd (10 ml) og den resulterende oppløsning omrørt ved romtemperatur i 3 timer.

pH ble deretter justert til 4 med Dowex 50W-X8 (H^+), resinet frafiltrert og filtratet lyofilisert for å gi 75 mg (98% utbytte) av forbindelse (43) som et luftig hvitt pulver.

i.r. (KBr): ν_{maks} (cm^{-1}) 3370 (s, OH), 2254 (w, CN), 1656 (s, NHAc)

MS (FAB) : 301 (M + H^+)
^{1}H-nmr (300 MHz, D_2O): δ (ppm) = 1,98 (s, 3H, NHAc), 2,70 (dd, 1H, $H_{9'}$), 2,88 (dd, 1H, $J_{9,9'}$ 17,27, H_9), 3,48 (d, 1H, H_6), 3,97 (dd, 1H, $J_{5,6}$ 9,84, H_5), 4,09-4,24 (m, 2H, H_7 og H_8, $J_{8,9}$ 3,90, $J_{8,9'}$ 6,53), 4,41 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 8,87, H_4), 5,80 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,42, H_3)

Eksempel 20 Hemming av influenzavirus-nevraminidase

En in vitro-undersøkelse av de ovenfor beskrevne forbindelser mot N2-influenzavirus-nevraminidase ble utført etter Warner & O'Brien, Biochemistry, 1979 18 2783-2787. Til sammenligning, ble K_i for 2-deoksy-N-acety-α-D-nevraminsyre bestemt i det samme forsøk til 3 x 10^{-4}M.

Verdier for K_i ble målt ved hjelp av en spektrofluorimetrisk teknikk som benytter det fluorogene substrat 4-metylumbelliferyl-N-acetylnevraminsyre (MUN), som beskrevet av Meyers et al., Anal. Biochem. 1980 101 166-174. For begge enzymer inneholdt forsøksblandingen testforbindelsen i flere konsentrasjoner mellom 0 og 2 mM og ca. 1 mU enzym i buffer (32,5 mM MES, 4 mM $CaCl_2$, pH 6,5 for N_2; 32,5 mM acetat, 4 mM $CaCl_2$, pH 5,5 for V. cholerae nevraminidase).

Reaksjonen ble startet ved tilsetning av MUN til sluttkonsentrasjoner på 75 eller 40 μM. Etter 5 minutter ved 37°C, ble 2,4 ml 0,1M glycin-NaOH, pH 10,2, tilsatt til 0,1 ml reaksjonsblanding for å avbryte reaksjonen. Fluorescensen ble

avlest ved en eksitasjon på 365 nm og en emisjon på 450 nm og respektive MUN-blindverdier (uten enzyminnhold) ble subtrahert fra avlesningene. K_i-verdien ble bestemt gjennom Dixon-diagrammer (1/fluorescens mot konsentrasjon av forbindelse). Resultatene er sammenfattet i Tabell I og viser, om intet annet er angitt, til hemmingen av N_2-nevraminidase.

Tabell 1

Hemming av influenzavirus-nevraminidase in vitro

Forbindelse	Ki (M)
2-deoksy-N-acetyl-α-D-nevraminsyre	3×10^{-4}
Natrium 5-acetamido-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4)	2×10^{-6}
Natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (6)	6×10^{-8} $1,9 \times 10^{-7}$ (N9 nevraminidase, pH 6,5) 1×10^{-8} (N2 virus, pH 7,5)
Ammonium 5-acetamido-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (7)	$1,7 \times 10^{-8}$
	$> 5 \times 10^{-8}$ (N9 nevraminidase)

$4,5 \times 10^{-4}$

(V. cholerae nevraminidase; pH 5,8)

$> 10^{-2}$

(nevraminidase fra sau; pH 4,5)

Natrium 5-acetamido-4-N,N-diallylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (9) 4×10^{-6}

Natrium 5-acetamido-4-N-allylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (11) $2,5 \times 10^{-6}$

(N2 og N9 nevraminidase)

Metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (12) ca. 3×10^{-3}

Metyl 7,8,9-tri-O-acetyl-2,3,5-trideoksy-4',5'-dihydro-2'-metyl-oksazolo [5,4-d] D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (13) 3×10^{-5}

Natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (14) 1×10^{-7}

(N2 og N9 nevraminidase)

Natrium 5-acetamido-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (17)	$2,8 \times 10^{-5}$
Natrium 5-acetamido-4-N-metylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (20)	$1,15 \times 10^{-6}$
Natrium 5-acetamido-4-N,N-dimetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (23)	7×10^{-7}
Metyl 5-acetamido-4-N-metoksykarbonylmetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (25)	7×10^{-6}
Natrium 5-acetamido-4-N-2'-hydroksyetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (29)	$1,6 \times 10^{-6}$
(N2 og N9 nevraminidase)	
Natrium 2,3-dideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (35)	$4,8 \times 10^{-4}$
Natrium 4,5-diamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (38)	$6,5 \times 10^{-7}$
Metyl 5,9-diacetamido-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (41)	$3,6 \times 10^{-5}$

5,9-diacetamido-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (42)	$1,45 \times 10^{-5}$
Metyl 5-acetamido-9-cyano-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (43)	ca. 3×10^{-3}
5-acetamido-9-cyano-2,3,5,9-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre (44)	3×10^{-6}

Eksempel 21 Hemming av influenzavirus-replikasjon in vitro

Hemming av influenza A/Singapore/1/57 (H2N2) og influenza B/Victoria/102/85 replikasjon in vitro ble målt ved reduksjon av viral plakk-dannelse i MDCK-(Madin Darby canine kidney) celler.

Monolag av konfluerende MDCK-celler, dyrket i seks-brønns vevskulturplater, ble inokulert med 0,3 ml virus fortynnet til å gi ca. 50-100 plakk/brønn. Virus var fortynnet i serumfritt MEM (minimal essential medium) inneholdende 2 µg/ml trypsin (Worthington Enzymes), behandlet med N-tosyl-1-fenylalanin-klormetylketon (TPCK), og testforbindelse.

Virus ble adsorbert ved romtemperatur i 1 time og cellene deretter dekket med definert cellekultur-medium, version 1 (DCCM-1)/agar-topplag inneholdende testforbindelse, 4 ml/brønn. DCCM-1 er et serumfritt komplett cellevekst-medium (Biological Industries) som ble tilsatt TPCK-behandlet trypsin og DEAE-dekstran til sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 2 µg/ml og 0,001%. Agar (5%) (Indubiose) ble fortynnet 1:10 i topplaget før tilsetning til platen.

Etter anbringelse av topplaget ble platene inkubert ved 37°C, 5% CO_2 i 3 dager. Cellene ble deretter fiksert med 5% glutaraldehyd, farvet med karbolfuksin og de virale plakk tellet. Resultatet var som følger:

Tabell 2

Forbindelse	"IC_{50} plaque reduction" (μM) Influenza A	Influenza B
Natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-amino-Neu5Ac2en) (6)	1,6	1,6
Natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (14)	3,0	1,2
Ammonium 5-acetamido-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (7)	1,6	1,6
Natrium 5-acetamido-4-N-2'-hydroksyetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (29)	60	7
Natrium 5-acetamido-4-N-allyl-N-hydroksy-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (45)	4,7	2,7
Natrium 4,5-diamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (38)	11	6,8

Natrium 5-acetamido-4-N-allyl-N-hydroksy-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (45) kan lett fremstilles fra forbindelse (11) beskrevet i Eksempel 5, ved å benytte oksydasjonsmetoder.

Eksempel 22 Antiviral aktivitet in vivo

Forbindelsene fra Eksempel 2, 3 og 6 (4-amino, 4-guanidino og 4-epi-amino), så vel som forbindelsen DANA (2-deoksy-N-acetyl-α-D-nevraminsyre), som i Eksempel 20 ble vist å ha anti-nevraminidase-aktivitet in vitro, ble undersøkt med henblikk på antiviral aktivitet gjennom en standard in vivo-bestemmelse. Ved intranasal administrasjon til mus før og under smitte med influenza A-virus, reduserte disse forbindelsene virustiter i lungevev 1 til 3 dager etter infeksjonen.

Musene ble infisert intranasalt med 50 μl 10^3 $TCID_{50}$ enheter/mus H2N2 influenza A-virus (A/Sing/1/57). Testforbindelsen ble administrert intranasalt ved en dosering på enten 12,5 eller 25 mg/kg kroppsvekt (50 μl vandig oppløsning/mus) som følger: 24 timer og 3 timer før infeksjon; 3 timer etter infeksjon og deretter to ganger per dag hver av dagene 1, 2 og 3 etter infeksjon. De strukturelt ubeslektede forbindelsene ribavirin og amantadin ble også benyttet som sammenligning.

Musene ble avlivet på dagene 1, 2 og 3 etter infeksjonen, lungene tatt ut og lungenes virustiter målt. Titeret ble avsatt i et diagram og uttrykt som det prosentuelle areal under kurven (AUC) sammenlignet med tilsvarende for ubehandlet mus. Resultatene er sammenfattet nedenfor.

Tabell 3

Effekt på mus infisert med influenzavirus

Forsøk Nummer	Forbindelse	Dose (mg/kg kroppsvekt)	% AUC
1	Natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-amino-Neu5Ac2en) (6)	25	0,06
	Amantadine	25	0,08
	DANA	25	0,18
2	Ammonium 5-acetamido-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (7)	12,5	0,03
	Ribavirin	25	29,8
	Amantadine	25	0,2
		12,5	0,03
	DANA	12,5	2,0
3	Natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (14)	12,5	21,1
	Amantadine	12,5	8,8
	DANA	12,5	48,0

Alle tre undersøkte forbindelser oppviste større styrke enn DANA.

Eksempel 23 De følgende formuleringer er representative for preparatene i henhold til oppfinnelsen:

Vandig oppløsning

		% vekt/vekt
Forbindelse med formel (I)		10,0
Benzalkoniumklorid		0,04
Fenyletylalkohol		0,40
Renset vann	til	100% vekt/vekt

Vandig oppløsning med med-oppløsningsmiddel

		% vekt/vekt
Forbindelse med formel (I)		10,0
Benzalkoniumklorid		0,04
Polyetylenglykol 400		10,0
Propylenglykol		30,0
Renset vann	til	100% vekt/vekt

Aerosolformulering

	% vekt/vekt
Forbindelse med formel (I)	7,5
Lecitin	0,4
"Propellant 11"	25,6
"Propellant 12"	66,5

Tørrpulver formulering

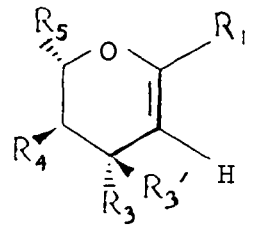
	% vekt/vekt
Forbindelse med formel (I)	40,0
Laktose	60,0

Disse formuleringene fremstilles ved å blande virkestoffet og hjelpestoffene ved hjelp av konvensjonelle farmasøytiske metoder.

Det skal understrekes at oppfinnelsen generelt ikke er begrenset til de ovenfor omtalte spesifikke detaljer.

Patentkrav

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av en terapeutisk aktiv forbindelse med formel (I)

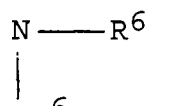


(I)

hvor

R^1 betyr COOH;

$R^{3'}$ er hydrogen og R^3 er N_3, OR^6, guanidino,



hvor

R^6 er hydrogen; C_{1-6}alkyl, allyl eller  , og $R^{6'}$ er hydrogen, allyl eventuelt substituert med OH eller $-CH_2-COONa$, alkyl eventuelt substituert med hydroksy, eller CH_2COOCH_3;

R^4 betyr NHR^6 eller OR^6, hvor R^6 er som ovenfor;

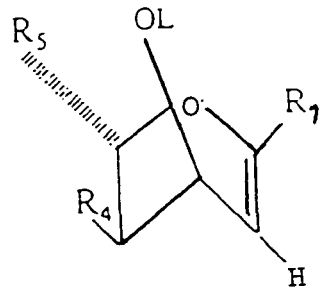
R^5 betyr $CH(OH)CH(OH)CH_2R^7$ hvor R^7 er OH, CN, N_3 eller $NH-CO-CH_3$;

og farmasøytisk akseptable salter eller derivater derav, forutsatt at i den generelle formel (I)

(i) når R^3 er OR^6, da kan R^4 ikke være O-acyl eller NH-acyl,

k a r a k t e r i s e r t v e d:

(A) omsetning av en forbindelse med formel (III)



(III)

hvor R^1, R^4 og R^5 er som definert ovenfor, og OL er en utgående gruppe, med en nukleofil f.eks. N_3^-; eller

(B) omdannelse av en forbindelse med formel (I) til en annen forbindelse med formel (I), f.eks.

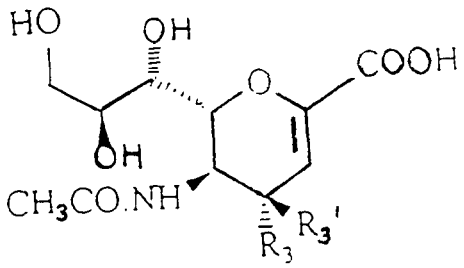
(i) omdannelse av en azidgruppe til en aminogruppe, eller

(ii) omdannelse av en aminogruppe til en guanidingruppe, og om nødvendig eller ønskelig, behandling av den resulterende forbindelse ved én eller to ytterligere omsetninger som omfatter:

(i) fjerning av eventuelle beskyttelsesgrupper;

(ii) omdannelse av en forbindelse med formel (I) eller et salt derav, til et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av en forbindelse med formel (II)



(II)

hvor $R^{3'}$ er hydrogen, og R^3 er $-N_3$, guanidino eller $-N.R^8.R^9$;

R^8 og R^9 er like eller forskjellige og hver betyr hydrogen eller alkyl med 1 til 6 karbonatomer,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2 for fremstilling av en forbindelse hvor R^3 er $NR^6R^{6'}$

k a r a k t e r i s e r t v e d ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 3 for fremstilling av en forbindelse hvor R^3 er NH_2,

k a r a k t e r i s e r t v e d ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av en forbindelse valgt blant:

natrium 5-acetamido-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-azido-Neu5Ac2en);

natrium 5-acetamido-4-N-allylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat;

natrium 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (4-epi-amino-Neu4Ac2en);

metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N,N-diallylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N,N-diallylamino-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me);

natrium 5-acetamido-4-N,N-diallylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat;

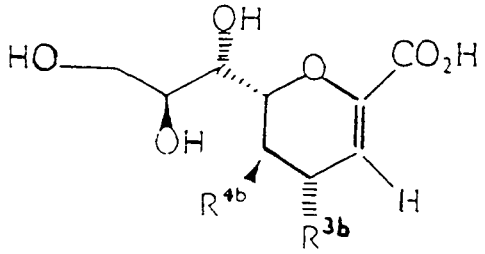
metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-N-allylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat (4-N-allylamino-Neu5,7,8,9$Ac_4$2en1Me);

natrium 5-acetamido-4-N,N-dimetylamino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat;

natrium 2,3-dideoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonat; og

metyl 5-acetamido-7,8,9-tri-O-acetyl-4-azido-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-talo-non-2-enopyranosonat (4-epi-azidoNeu5,7,8,9Ac$_4$2en1Me),
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av en forbindelse med formel (Ib)



(Ib)

hvor R^{3b} er $NR^{6b}R^{7b}$, N_3 eller guanidino
R^{6b} er hydrogen eller C_{1-6}alkyl,
R^{7b} er hydrogen, C_{1-6}alkyl eller allyl;
R^{4b} er $NHCOCH_3$,
eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller derivat derav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, for fremstilling av en forbindelse, hvor R^{3b} er NH_2 k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 6 for fremstilling av en forbindelse valgt fra 5-acetamido-4-amino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre og farmasøytisk akseptable salter og derivater derav, og 5-acetamido-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoksy-D-glycero-D-galakto-non-2-enopyranosonsyre og farmasøytisk akseptable salter og derivater derav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.