

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 853226 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **853226**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12P 37/00

C07D499/44

C07K 5/06

A61K 31/43

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.08.1985**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **22.08.1985**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.02.1986**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

22.08.1984 GB 8421279

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •National Research Development, 101 Newington Causeway London SE1 6BU, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Baldwin, Jack Edward, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

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

Antibiootit.

Antibiotika.

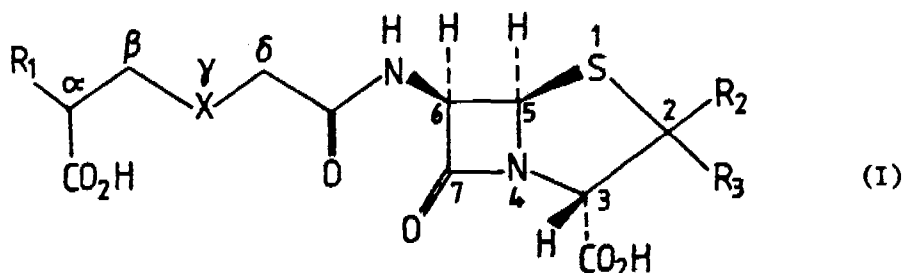
Antibiootit Antibiotika

Keksintö koskee antibiootteja ja erityisesti uusia beetalaktaamiantibiootteja ja niiden tuottamista.

Beetalaktaamit muodostavat erityisen kiinnostavan antibioottien ryhmän, jota on laajalti tutkittu tavoitteena uusien antibioottisten yhdisteiden tuottaminen.

Isopenisilliini N:n biosynteesi D-valiinista, L-kysteiinistä ja L- α -aminoadipiinihaposta etenee δ -(L- α -aminoadipyyli-L-kysteinyyli-D-valiini tripeptidin kautta (tässä selityksessä "adipyyliä" käytetään ilmaisemaan adipiinihaposta peräisin olevaa yksiarvoista radikaalia) isopenisilliini N syntetaasi entsyymin vaikuttaessa tähän tripeptidiin. Isopenisilliini N syntetaasin vaikutusta vaihtoehtoisin tripeptideihin, δ -(L- α -aminoadipyyyli)-L-kysteinyyli-D-isoleusiiniin, δ -(L- α -aminoadipyyyli)-L-kysteinyyli-D-alloisoleusiiniin ja δ -(L- α -aminoadipyyyli)-L-kysteinyyli-D-(α -aminobutyraattiin) ovat tutkineet Bahadur, Baldwin ja Usher, J.A.C.S., 1981, 103, 7650, tämän muuntumisen substraattispesifisyyden arvioimiseksi, mutta vaikka entsyymi muutti jokaisen näistä peptideistä penisilliinimolekyyliksi, ja vaikka GB-patenttijulkaisu 2052486A kattaa tällaiset yhdisteet, oli näiden uusien isopenisilliini N alkyylianalogien spesifinen bakteerivaikutus merkitsevästi alhaisempi kuin isopenisilliini N:n itsensä vaikutus. Olen nyt havainnut, että on mahdollista käyttämällä tiettyä, huolellisesti valikoitua uusien tripeptidien ryhmää substraattina isopenisilliini N syntetaasille, valmistaa uusia antibioottisia molekyylejä, joilla on yleensä korkeampi spesifinen bakteerivaikutus kuin näillä aikaisemmilla analogeilla.

Tämän keksinnön mukaisesti keksintö käsittää kaavan



mukaisen yhdisteen, missä X on rikki tai metyleeni, R_1 on vety, amino tai asyloitu tai karbamyloitu aminoryhmä, R_2 on vety tai alkyyliryhmä ja R_3 on alkoksiryhmä.

Tällaiset penisilliiniyhdisteet (I) ovat tietenkin hyvin epätavallisia siinä mielessä, että ne sisältävät alkoksiryhmän ja joko vedyn tai alkyyliryhmän penamirakenteen 2-asemassa siinä tavallisesti esiintyvien kahden alkyyliryhmän (metyyliryhmän) sijasta.

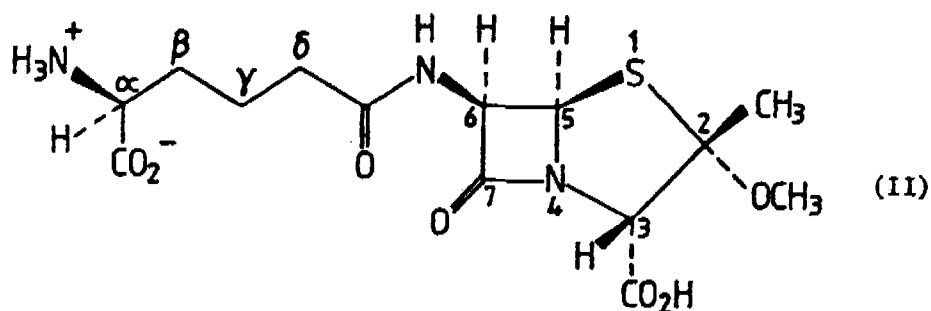
Penisilliinien (I) keskuudessa X on mieluummin metyleeniryhmä kuin rikki. Erityisen kiinnostavia ovat yhdisteet, joissa R_1 on amino tai asyloitu tai karbamyloitu aminoryhmä. Substituoiduilla aminoryhmillä on mieluummin kaava $RCONH-$ tai $RNHCONH-$, missä R on vety tai alempi alkyyliryhmä ($C_1...C_5$ ja mieluummin $C_1...C_3$), tai vaihtoehtoisesti fenyyli tai substituoitu fenyyli. Tällaiset substituoidut fenyyliyhdisteet voivat sisältää yhden tai useampia erilaisia substituenttityyppejä mukaanluetuna alkyyliryhmät, esim. sellaiset, jotka ovat tai jotka sisältävät 1, 2 tai 3 tai useamman hiiliatomin alkyyliryhmä, kuten alla kuvataan R_2 :n suhteen ja varsinkin metyyli ja metoksyryhmä, substituenttien ollessa tai sisältäessä halogeenitähteen, esim. bromin, kloorin ja fluorin ja halogeenisubstituoituja alkyyliryhmä, kuten CF_3 , vapaita ja substituoituja aminoryhmä, esim. dimetyyliamino, hydroksi ja nitroryhmä, kuten myös muita alalla tunnettuja bentseeniren-

gasta substituoivia ryhmiä. Yleensä kuitenkin substituoimattoman aminoryhmän R_1 sisältävät yhdisteet ovat kiinnostavampia kuin substituoituja aminoryhmiä sisältävät.

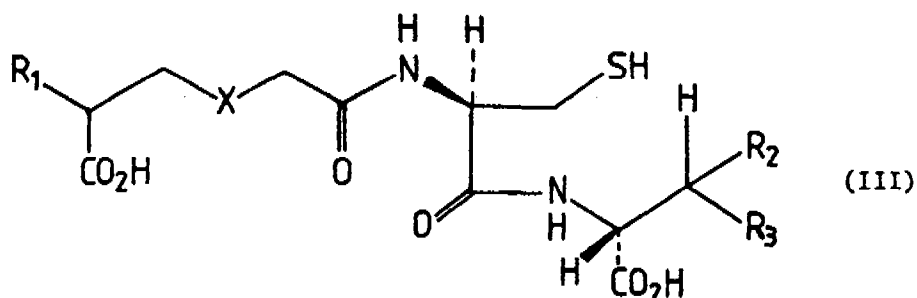
Mitä tulee R_2 :een, se on mieluummin alkyyliryhmä ja R_2 ja myös R_3 voidaan kumpikin sopivasti valita erikseen 1...5 hiiliatomin, erityisesti 1...3 tai 4 hiiliatomin ryhmistä. Tällaiset ryhmät ovat tai sisältävät tarkoituksenmukaisen suoraketjuisen alkyyliryhmän, pienempien ryhmien kuten isopropyylin, propyylin, erikoisesti etyylin ja varsinkin metyylin, ja isopropoksin, propoksin, erikoisesti etoksin ja varsinkin metoksin ollessa suositeltavimpia.

Voi olla edullista, esim. vesiliukoisuuden lisäämiseksi, että penisilliinit (I) ovat fysiologisesti hyväksyttävänä suolaan. Tällainen suolan muodostus voi käsittää aminoryhmän ja fysiologisesti hyväksyttävän epäorgaanisen tai orgaanisen hapon, tai yhden tai molemmat karboksyylioryhmät ja fysiologisesti hyväksyttävän epäorgaanisen tai orgaanisen emäksen, penisilliiniyhdisteiden (I) natrium- ja kaliumsuolojen ollessa suhteellisen kiinnostavia. Mitä tulee penisilliinien (I), joissa R_1 on muu kuin vety, stereokemiaan, on olemassa kaksi mahdollista asymmetrisen hiiliatomin, johon ryhmät R_1 ja CO_2H ovat kiinnittyneet, konfiguraatiota ja on suositeltavaa, että tämä hiiliatomi on L-konfiguraatiossa. R_2 :n ja R_3 :n suhteen on olemassa kaksi mahdollista asymmetrisen hiiliatomin, johon nämä ryhmät ovat kiinnittyneet, konfiguraatiota riippuen siitä, onko ryhmä R_2 tai ryhmä R_3 samanlaisessa avaruudellisessa asemassa suhteessa viereiseen karboksyylioryhmään. Jälkimmäinen vaihtoehto on erityisen kiinnostava, varsinkin tapauksessa, jossa R_2 on alkyyli, koska tällainen isomeeri on se, joka kehittyy suoraan tässä kuvatulla menetelmällä, kuten tässä jäljempänä yksityiskohtaisemmin esitetään.

Nimenomaisia tämän keksinnön mukaisia penisilliinejä ovat yhdisteet (I), joissa X on rikki tai metyleeni, R_1 on vety tai amino, R_2 on vety, metyyli tai etyyli ja R_3 on metoksi tai etoksi lukien mukaan erityisesti ne yhdisteet, joissa R_2 on vety tai metyyli ja R_3 on metoksi, kuten yhdisteet 2-metoksi-2-metyyli-6- δ -($\underline{L}$ - α -aminoadipamido)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-2-metyyli-6- δ -($\underline{D}$ - α -aminoadipamido)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-2-metyyli-6- δ -adipamido-3-karboksipenaami ja 2-metoksi-2-metyyli-6- δ -($\underline{L}$ -S-karboksिमेत्य्यликysteinyyli)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-6- δ -($\underline{L}$ - α -aminoadipamido)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-6- δ -($\underline{D}$ - α -aminoadipamido)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-6- δ -adipamido-3-karboksipenaami ja 2-metoksi-6- δ -($\underline{L}$ -S-karboksिमेत्य्यликysteinyyli)-3-karboksipenaami. Nämä nimeomaiset penisilliinit (I) ovat erityisen kinnostavia, varsinkin kun ne sisältävät ryhmän R_2 , joka on alkyyl, stereoisomeerina, jossa tiatsolidonirenkaan 2- ja 3-asemissa olevilla alkoksi- ja karboksiryhmillä on samanlainen avaruudellinen asema, cis-konfiguraatio, so. kuten alkoksi 2S-isomeerissa. Yhdisteen 2S-2-metoksi-2-metyyli-6- δ -($\underline{L}$ - α -aminoadipamido)-3-karboksi penaaamin rakenne kuvataan alla kaavassa (II). Kaavassa (II) vierekkäiset amino- ja karboksiryhmät osoitetaan kahtaisionimuodossa, jossa ne tavallisesti esiintyvät.



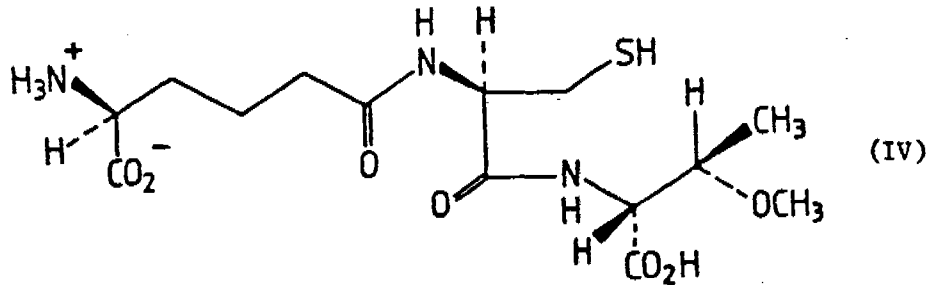
Penisilliinit (I), joissa R_1 on vety tai amino, voidaan mukavasti valmistaa vastaavasta kaavan



mukaisesta tripeptidistä, missä X on rikki tai metyleeni, R_1 on vety tai amino, R_2 on vety tai alkyyliryhmä ja R_3 on alkoksiryhmä entsyymi isopenisilliini N syntetaasin vaikutuksen avulla. Mitä tulee tripeptidin stereokemiaan uskotaan, että hiiliatomin, johon ryhmät R_1 ja CO_2H ovat kiinnittyneet, ollessa asymmetrinen, tämän atomin konfiguraatio säilyy tripeptidin (III) muuttuessa penisilliiniksi (I), jolloin käytettävällä tripeptidillä on sopivasti sama stereokemia tässä pisteessä kuin penisilliinillä. Riippumatta siitä, onko R_2 vety tai alkyyliryhmä, penisilliini (I) voi, kuten aikaisemmin on selitetty, esiintyä kahdessa stereoisomeerimuodossa, joiden erona on ryhmien sijainti tiatsolidonirenkaan C_2 -asemassa. Kun R_2 on alkyyliryhmä, tripeptidi (III) sisältää samalla tavalla asymmetrisen hiiliatomin vastaavassa asemassa, ja on havaittu, että tehokas tripeptidin (III) muuttuminen penisilliiniksi (I) isopenisilliini N syntetaasin avulla tapahtuu ainoastaan tripeptidillä, jolla on R-konfiguraatio 2-asemassa, tämän konfiguraation säilyessä muutoksen aikana, jolloin saadaan stereokemiallisesti vastaava penisilliini, jolla on S-konfiguraatio 2-asemassa. Kun R_2 on vety, tripeptidin vastaavassa asemassa oleva hiiliatomi ei ole asymmetrinen ja uskotaan, että saatu penisilliini on kahden C_2 -asemassa eroavan stereoisomeerisen muodon seos.

Penisilliinien (I) valmistukseen käytettävät tripeptidit (III) ovat uusia yhdisteitä ja ne luetaan tämän keksinnön piiriin kuuluviksi monomeeri- tai disulfidimuodossa (jälkimmäisessä muodossa olevat tripeptidit muutetaan monomeerimuotoon ditio- treitolia käyttämällä, kuten jäljempänä on kuvattu) kuten myös

niiden johdannaiset, joissa yksi tai useampi funktionaalinen ryhmä on suojatussa muodossa. Näin keskeisen kysteinyylitähteen sulfhydryyliryhmä, C-terminaalisen tähteen karboksiryhmä ja N-terminaalisen tähteen karboksi- ja aminoryhmät (milloin ne ovat läsnä) voivat olla suojattuja, esim. tavanomaisin peptidikemiassa käytetyin suojaavin ryhmin ja kuten esimerkeissä on kuvattu. Tällaisia suojattuja tripeptidejä käytetään lopullisen, suojaamattoman tripeptidin synteesissä. Nimenomaisia tämän keksinnön mukaisia tripeptidejä ovat yhdisteet (III), joissa X on rikki tai metyleeni, R_1 on vety tai amino, R_2 on vety, metyyli tai etyyli ja R_3 on metoksi tai etoksi mukaanlukien erityisesti ne yhdisteet, joissa R_2 on vety tai metyyli ja R_3 on metoksi, kuten yhdisteet δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R-2-amino-3-metoksibutaanihappo), δ -(D- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R-2-amino-3-metoksibutaanihappo), δ -adipyyli-L-kysteinyyli-(2R-2-amino-3-metoksibutaanihappo), δ -(L-S-karboksimetyylikysteinyyli)-L-kysteinyyli-(2R-2-amino-3-metoksibutaanihappo), δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyylieetteri), δ -(D- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyylieetteri), δ -adipyyli-L-kysteinyyli-D-seriini-O-metyylieetteri) ja δ -(L-S-karboksimetyylikysteinyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyylieetteri). Kun näillä tripeptideillä on sekä alkoksi- että alkyyliiryhmä C-terminaalisen aminohappotähteen β -hiiliatomissa, suositellaan painokkaasti edellä osoitetuista syistä, että tämä alkoksiryhmä ja α -karboksiryhmä ovat cis-konfiguraatiossa. Yllä nimetyille ensimmäiselle neljän yhdisteen ryhmälle suositellaan siksi painokkaasti 2R,3R-2-amino-3-metoksibutaanihappotähdettä C-terminaaliin. Yhdisteen δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R,3R-2-amino-3-metoksibutaanihapon) rakennetta kuvataan alla kaavalla (IV), jossa vierekkäiset amino- ja karboksiryhmät on osoitettu kahtaisionimuodossa, jossa ne useasti esiintyvät.



Tripeptidit (III) syntetisoidaan helposti peptidikemian standardimenetelmien avulla. Sopiva reitti käsittää näin yleensä tripeptidin muodostamisen liittämällä yhteen yksittäisten aminohappojen suojattuja muotoja ja myöhemmin tämän suojauksen poistamisen. Sopivia suojaavia ryhmiä voidaan valita peptidisynteesin piirissä rutiininomaisesti käytetyistä ryhmistä, esim. aminoryhmät voidaan suojata bentsyylioksykarbonyylinä tai vastaavina johdannaisina, karboksiryhmät bentsyylinä tai muina estereinä ja sulfhydryyliryhmät bentsyylijohdannaisina. Tällaista reittiä kuvataan tripeptidien δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R,3R-2-amino-3-metoksibutaanihapon) ja δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyylieetterin) valmistusesimerkissä.

Penisilliiniyhdisteiden (I) valmistamiseksi ovat tripeptidit (III) isopenisilliini N syntetaasin vaikutuksen alaisena. Tätä entsyymiä tuottavat useat mikro-organismit, esim. Penicillin chrysogenum ja Streptomyces clavuligenis, mutta suositeltavin lähde on Cephalosporium acremonium. Mikro-organismi C. acremonium on yleisesti saatavissa oleva niin, että ottamatta lukuun muita lähteitä, on useita kantoja saatavissa American Type Culture Collectionista, esim. ATCC 20339 (Cephalosporium sp. kanta F.12), ATCC 14553 (C. acremonium) ja ATCC 36255 (Acremonium strictum). Soluja kasvatetaan sopivissa olosuhteissa ja sitten valmistetaan soluton uute (cell free extract), joka voidaan puhdistaa yhdistelemällä alalla tunnettuja proteiinien puhdistusmenetelmiä. Sopiva puhdistusmenetelmä on kuvattu

esimerkeissä ja sen avulla saadaan entsyymi, joka soveltuu käytettäväksi tripeptidin muuttamiseen antibioottiseksi yhdisteeksi, mikä yleensä antaa muuttumistasoksi noin 20 % tai yli tripeptideillä, jotka sisältävät alkyyliryhmän R_2 . Tällä menetelmällä saatu em. puhtaustason omaava entsyymi on vapaa aktiivisuudesta, joka voisi jatkaa (tripeptidin) muuttumista pitemmälle kuin isopenisilliiniksi. Yhdisteen inkubointi entsyymin kanssa vesipitoisessa liuoksessa pH:ssa välillä 7,0 ...8,0, esim. 7,5, lämpötilassa välillä 25...28 °C, esim. 27 °C ja 30...60 minuutin ajan, esim. 30 minuuttia, on yleensä suositeltavaa, minkä jälkeen antibioottinen yhdiste eristetään käyttäen tavanomaisia menetelmiä. Entsyymin aktiivisuuden optimoimiseksi on suositeltavaa käyttää yhtä tai useampaa kofaktoria, erityisesti yhtä tai useampaa ja tavanomaisesti kaikki kolmea kofaktoria, rautaa, varsinkin ferroioneja, joita tarjoaa esim. ferrosulfaatti, askorbaatti-ioneja, joita tarjoavat esim. askorbiinihappo, ja ditiotreitolia. Katalaasin sisällyttäminen inkubaatoliuokseen on myös edullista. Menetelmä, jossa käytetään näitä lisäaineita, on kuvattu esimerkeissä.

Penisilliinejä (I), jotka sisältävät asyloidun tai karbamyloidun aminoryhmän, voidaan mukavasti valmistaa vastaavasta penisilliinistä (I), joka sisältää aminoryhmän, sopivan asyloivan aineen vaikutuksella, esim. käyttämällä sopivaa happoa tai sen johdannaista, kuten kloridia tai anhydridiä tai sopivaa karbamyloivaa ainetta, kuten tarkoituksenmukaista alkalimetallisyanaattia. Suoloja voidaan helposti valmistaa käyttämällä sopivaa epäorgaanista tai orgaanista happoa tai emästä.

Tämän keksinnön mukaiset penisilliiniyhdisteet, erityisesti penisilliinit 2S-2-metoksi-2-metyyli-6- δ -(L- α -aminoadipamido)-3-karboksipenaami ja 2-metoksi-6- δ -(L- α -aminoadipamido)-3-karboksipenaami ovat antaneet hyvin lupaavia tuloksia Staphylococcus aureuksella suoritetuissa kokeissa ja ovat myös kiinnostuksen kohteina haluttaessa kontrolloida laajaa sekä

Gram-negatiivista että Gram-positiivista bakteerikirjoa, esim. Escherichia coli, Salmonella typhimurium ja Bacillus megaterium. Niinpä havaittu aktiivisuustaso on vähintään verrattavissa isopenisilliini N:n itsensä vaikutuksen kanssa, ja arvioidaan, että nämä yhdisteet siksi tarjoavat arvokkaan vaihtoehtoisen antibioottien lähteen.

Yhdisteet voidaan valmistaa käytettäväiksi lääkkeinä eläinlääkintään tai erityisesti ihmiskäyttöön tarkoitetuiksi valmisteiksi useilla menetelmillä, mutta tavallisesti menetelmä käsittää fysiologisesti hyväksyttävän ohenteen tai kantajan käytön. Niitä voidaan käyttää esim. vesiliuoksina, öljymäisinä tai emulsioituina kokoomuksina, jotka sisältävät nestemäisen ohenteen, niitä käytetään useimmiten parenteraaliseen antoon ja siksi niiden tulee olla steriilejä ja pyrogeenivapaita. Vaihtoehtoisesti yhdiste voidaan muodostaa nestemäisen ohenteen kanssa suun kautta annettavaksi, vaikkakin useimmiten tähän tarkoitukseen käytetään mieluummin kokoomuksia, jotka sisältävät kiinteän kantajan esim. tavanomaisen kiinteän kantaja-aineen kuten tärkkelyksen, laktoosin, dekstriinin tai magnesiumstearaatin.

Kokoomukset voidaan muodostaa yksikköannosmuodossa, so. erillisinä osasina, jotka kukin käsittävät yksikköannoksen, tai yksikköannoksien monikertana tai osittaisena monikertana. Vaikka annettava aktiivisen yhdisteen annos riippuu useista tekijöistä, mukaanlukien se nimenomainen yhdiste, jota käytetään kokoomuksessa, voidaan ohjeeksi mainita, että laajasti ottaen samanlaisia annostasoja kuin olemassa oleville penisilliineille voidaan käyttää, so. päivittäisten annostasojen ollessa aikuisille ihmisille luokkaa 250 mg - 5 g, usein 500 mg - 2 g, usein jaettuna osiin, vaikkakin sekä tämän yli että alle olevia tasoja voidaan käyttää joissakin tapauksissa; annokset lapsille ja eläinlääkinnälliseen käyttöön sovelletaan yleensä samalla tavoin mg/kg pohjalta. Haluttaessa voidaan

antaa useampaa kuin yhtä tämän keksinnön mukaista yhdistettä farmaseuttisessa kokoomuksessa tai myös muita vaikuttavia yhdisteitä voidaan lukea mukaan kokoomukseen.

Keksintö käsittää siis farmaseuttisen kokoomuksen, joka käsittää yhdisteen (I) kuten edellä on kuvattu yhdessä fysiologisesti hyväksyttävän ohenteen tai kantajan kanssa. Lisäksi siihen sisältyy myös menetelmä bakteeri-infektiosta kärsivän potilaan hoitamiseksi, mikä käsittää tässä kuvatun yhdisteen (I) antamisen potilaalle määränä, joka tehokkaasti vaikuttaa tähän infektiin.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä.

Esimerkit

Esimerkki 1

δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R,3R-2-amino-3-metoksibutaanihapon) valmistus

(1) 2R,3R- ja 2S,3S-2-bromi-3-metoksibutaanihappo

Krotonhappoa (8,6 g, 100 mmol) liuotetaan metanoliin (50 ml) ja N-bromiasetamidia (13,8 g, 10 mmol) lisätään osissa 30 minuutin ajan. Liuosta sekoitetaan 25 °C:ssa 15 tuntia ja sitten liuotin haihdutetaan ja tähde erotetaan dietyylieetterin ja veden avulla. Eetterikerros kuivataan (Na₂SO₄:lla) suodatetaan, haihdutetaan ja tähde tislataan, jolloin saadaan otsikon mukaisia yhdisteitä värittömänä öljynä (14,3 g, 72 %), kiehumispiste 88...89°/0,5 mm.

(2) 2R,3R- ja 2S,3S-2-amino-3-metoksibutaanihappo

2R,3R- ja 2S,3S-2-bromi-3-metoksibutaanihappoa (14 g, 71 mmol) liuotetaan ammoniakkiin (ominaispaino 0,88, 250 ml) ja seos kuumennetaan autoklaavissa 95 °C:ksi 8 tunniksi. Seos jäähdy-

tetään 25 °C:een, haihdutetaan ja tähden suspendoidaan asetoniin. Syntynyt väritön kiinteä aine suodatetaan erilleen ja pestään asetonilla, jolloin saadaan otsikon mukaisia yhdisteitä värittömänä kiinteänä aineena, joka sisältää jäämänä ammoniumbromidia (12,1 g), sulamispiste 180...184 °C (haj.).

(3) 2R,3R- ja 2S,3S-N-bentsyylioksikarbonyyli-2-amino-3-metoksibutaanihappo, bentsyyliesteri

2R,3R- ja 2S,3S-2-amino-3-metoksibutaanihappoa (3,1 g) liuotetaan 1 M natriumhydroksidin (27 ml), veden (20 ml) ja dioksaanin (40 ml) muodostamaan seokseen. Bentsyyliklooriformaattia (3,8 ml, 22 mmol) dioksaanissa (20 ml) ja 1 M natriumhydroksidia (27 ml) lisätään liuokseen erikseen, kumpaakin samalla lisäämisnopeudella 25 minuutin ajan. Seosta sekoitetaan 1 tunti, uutetaan etyyliasetaattiin (3x200 ml), happamoitetaan pH 1:een 2 N suolahapolla ja uutetaan sitten uudelleen etyyliasetaattiin (3x200 ml). Yhdistetyt orgaaniset uutteen kuivataan, suodatetaan ja haihdutetaan öljyn saamiseksi. Tämä öljy liuotetaan kuivaan dimetyyliformamidiin (20 ml) ja liuokseen lisätään natriumvetykarbonaattia (3,14 g, 41 mmol), bentsyyli-bromidia (3,8 ml, 33 mmol), vedetöntä natriumsulfaattia (200 mg) ja natriumjodidia (10 mg) sekoittaen koko seosta 25 °C:ssa 24 tuntia. Sitten seos uutetaan dikloorimetaaniin (200 ml), pestään vedellä (4x300 ml), kuivataan (natriumsulfaatilla), suodatetaan ja haihdutetaan. Puhdistus silikageelikromatografialla käyttäen etyyliasetaattia ja petrolieetteriä peräkkäisinä eluenteina antaa otsikon mukaiset yhdisteet värittömänä öljynä (4,2 g, 65%), joka kiinteytyy seisoessaan, sulamispiste 44 °C.

(4) **2R,3R- ja 2S,3S-2-amino-3-metoksibutaanihappo, bentsyyliesteri**

2R,3R- ja 2S,3S -N-bentsyylioksikarbonyyli-2-amino-3-metoksibutaanihappoa, bentsyyliesteriä (500 mg, 1,4 mmol) liuotetaan kuivaan dikloorimetaaniin (3 ml) ja bromivetyhappoa (45 % etikkahapossa, 2 ml) lisätään. Seosta sekoitetaan argonin alla 20 minuuttia ja sitten se haihdutetaan. Tähde liuotetaan dikloorimetaaniin (3x3 ml) ja haihdutetaan uudelleen (3x), jolloin saadaan toinen tähde, joka liuotetaan ksyleeniin (2x3 ml) ja haihdutetaan uudelleen (2x). Sitten lisätään petrolieetteriä (50 ml) ja tuotetta jauhetaan 5 minuutin ajan ennen emäliuoksen poisheittämistä ja kiinteän tähteen liuottamista dikloorimetaaniin (5 ml). Trietyyliamiinia (1 ml) lisätään dikloorimetaaniliuokseen, jota sitten sekoitetaan 2 minuuttia ja haihdutetaan. Tähde liuotetaan dikloorimetaaniin (3x5 ml) ja haihdutetaan uudelleen (3x), jolloin saadaan toinen tähde, jota jauhetaan dietyylieetterin (5 ml) kanssa. Syntynyt kiinteä aine suodatetaan pois, uutetaan uudelleen dietyylieetterillä (2x5 ml) ja eetterikerrokset yhdistetään ja haihdutetaan otsikon mukaisten yhdisteiden saamiseksi värittömänä öljynä (290 mg, 93%).

(5) **(N-bentsyylioksikarbonyyli- α -bentsyyli- δ -L-amino-adipyyli)-S-bentsyyli-L-kysteinyyli-(2R,3R-2-amino-3-metoksibutaanihappo), bentsyyliesteri**

2R,3R- ja 2S,3S-2-amino-3-metoksibutaanihappoa, bentsyyliesteriä (177 mg, 0,79 mmol) liuotetaan kuivaan dikloorimetaaniin (10 ml) ja 2-etoksi-N-etoksikarbonyyli-1,2-dihydrokinoliinia (195 mg, 0,79 mmol) ja N-bentsyylioksikarbonyyli- α -bentsyyli- δ -(L- α -aminoadipyyli)-S-bentsyyli-L-kysteiniä (456 mg, 0,79 mmol), joka on valmistettu Baldwin et al, Journal of the Chemical Society, Perkin I, 1981, 2253) kuvauksen mukaan ja natriumsulfaattia (100 mg) lisätään ja seosta sekoitetaan 24 tuntia. Liuotin haihdutetaan, tähde liuotetaan etyyliasetaat-

tiin (150 ml) ja etyyliasetaattiliuos pestään vuoroin 2 M suolahapolla (50 ml), kyllästetyllä natriumvetykarbonaattiliuoksella (50 ml) ja suolavedellä (50 ml), sitten se kuivataan, suodatetaan ja haihdutetaan. Puhdistus silikageelikromatografialla etyyliasetaattia ja heksaania perättäisinä eluentteina käyttäen antaa otsikon mukaisen yhdisteen värittömänä kiinteänä aineena (180 mg, 29%), sulamispiste 116...118 °C;

$[\alpha]_D^{20} -11,7$ (c 1, CHCl_3)

(2R,3R-yhdiste on vähemmän polaarinen kuin toinen, 2S,3S-isoomeeri).

(6) δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R,3R-2-amino-3-metoksi-butaanihappo)

N-bentsyylioksikarbonyyli- α -bentsyyli- δ -(L- α -aminoadipyyli)-S-bentsyyli-L-kysteinyyli-(2R,3R-2-amino-3-metoksibutaanihappo), bentsyyliesteriä (200 mg, 0,26 ml) liuotetaan tetrahydrofuraaniin (10 ml) ja kuivaan nestemäiseen ammoniakkiin (30 ml). Natriumia lisätään pienissä erissä, kunnes pysyvä sininen väri jää 10 minuutiksi ja sitten liuos jäähdytetään lisäämällä kuivaa ammoniumsulfaattia, kunnes liuos tulee värittömäksi. Liuotin haihdutetaan, tähde liuotetaan 50 mM rikkihappoon (20 ml) ja Hopkinsin reagenssia (0,05 ml, Baldwin et al., em. julkaisussa) lisätään. pH nostetaan 4:ään ammoniumhydroksidia käyttäen ja syntynyt sakka pestään vedellä (3x20 ml), sitten se suspendoidaan veteen (10 ml) ja käsitellään ylimäärällä rikkivetyä. Suodatus merkurisulfidin poistamiseksi ja kuivaus jäädyttämällä antavat otsikon mukaisen yhdisteen (1) valkeana kiinteänä aineena (67 mg, 68 %), ^1H NMR (D_2O , verrattuna ulkoiseen tetrametyylisilaaniin - TMS, δ -arvot, ppm) 1,05 (3H, d, J 8 Hz), 1,60-1,90 (4H, m), 2,25 (2H, t, J , 8 Hz), 2,80 (2H, m), 3,25 (3H, s), 3,75-3,90 (2H, m) ja 4,40 (1H, m).

(1) Yhdisteen saanto on arvioitu lisäämällä tunnettu määrä dioksaania, mitä seuraa standardin NMR-integraatio 1,05 signaalia vastaan (CHCH_3 -protonit). Tällä menetelmällä havaitaan tavallisesti noin 10 % ammoniumsuolajäämän määrä tripeptidissä. Tämä jäämä tuottaa samalla tavoin metoksiloidun penisilliinin inkuboitaessa isopenisilliini N syntetaasi entsyymin kanssa, kuten esimerkissä 3 kuvataan.

Esimerkki 2

δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metylieetterin valmistaminen

(1) N-p-metoksibentsyylioksikarbonyyli-D-seriini-bentsyyliesteri

N-p-metoksibentsyylioksikarbonyyli-D-seriiniä (5,30 mg, 2,00 mmol); valmistettu värittömänä kiinteänä aineena, jonka sulamispiste on 96...97 °C, 60 %:n saannolla Weygardin ja Hungerin menetelmällä, *Berichte*, 1962, 95, (1) 1 liuotetaan metanoliin ja käsitellään kaliumkarbonaatin (138 mg, 1,00 mmol) liuoksella vedessä (2 ml). Seos haihdutetaan kuivaksi, N,N-dimetyyli-formamidia (DMF) lisätään ja seos haihdutetaan uudelleen (2x2 ml) ja sitten kiinteä tähde liuotetaan kuivaan lämpimään DMF:ään, bentsyylibromidia (248 μl , 2,1 mmol) lisätään ja liuosta lämmitetään kuivassa suljetussa pullossa 50 °C:ssa 1 tunti. Syntynyt seos erotetaan eetterin (10 ml) ja veden (10 ml) avulla ja vesikerros uutetaan eetterillä (2x10 ml). Yhdistetyt eetteriuutteet pestään kyllästetyllä natriumbikarbonaatilla (50 ml) ja kyllästetyllä suolavedellä (5 ml), kuivataan ja haihdutetaan kuivaksi. Tähde puhdistetaan silikageelipylväällä käyttäen 1:1 v/v etyyliasetaatti:petrolieetteriä eluenttina otsikon mukaisen yhdisteen saamiseksi homogeenisena öljynä (590 mg, 82%), joka kiteytyy seisoessaan antane värittömän kiinteän aineen, jonka sulamispiste on 67...68 °C (dietyyli-eetteristä);

$[\alpha]_D^{20}$ -6,3° (c 4,0, CHCl_3)

(2) **N-p-metoksibentsyylioksikarbonyyli-O-metyyli-D-seriini-bentsyyliesteri**

N-p-metoksibentsyylioksikarbonyyli-D-seriini-bentsyyliesteriä (720 mg, 2,00 mmol) liuotetaan kuivaan dikloorimetaaniin (20 ml) ja liuos jäähdytetään kuivassa jää/asetonissa. Booritrifluoridieteraattia (100 µl) lisätään, minkä jälkeen diatsometaania (30 mmol 20 ml:ssa CH₂Cl₂:ta) lisätään erinä. Noin 30 minuutin kuluttua liuos suodatetaan ja pestään kerran vedellä (10 ml), sitten se kuivataan (MgSO₄:llä) ja haihdutetaan kuivaksi. Syntynyt tähde puhdistetaan silikageelikromatografian avulla käyttäen kloroformia eluenttina, jolloin saadaan puhdasta otsikon mukaista yhdistettä öljynä (520 mg, 70 %), joka kiteytyy seisoessaan antaen värittömän kiinteän aineen, jonka sulamispiste on 68...69 °C;

$$[\alpha]_D^{20} -1,3^\circ (\underline{c} 4,0, \text{CHCl}_3)$$

(3) **O-metyyli-D-seriini-bentsyyliesteri, vetykloridi**

N-p-metoksibentsyylioksikarbonyyli-O-metyyli-D-seriini-bentsyyliesteriin (130 mg, 0,35 mmol) lisätään kylmän trifluorietykähapon (TFA) ja anisolin (4,8:1 v/v) seosta (0,6 ml). Seosta ravistellaan jäähauteessa, kunnes kaikki kiinteä aine on liuenut ja sitten TFA haihdutetaan aluksi pyörivässä haihduttimessa 0 °C:ssa, lopuksi käyttäen korkeatyhjiöpumppua. Syntynyt tähde puhdistetaan silikageelikromatografialla käyttäen 98:2 v/v kloroformi:metanolia eluenttina, jolloin saadaan otsikon mukaista yhdistettä perusmuodossaan kellertävänä öljynä (38 mg, 55 %); tämä muutetaan vetykloridisuolaksi, joka on valkeaa kiinteää ainetta, sulamispiste 100...101 °C.

$$[\alpha]_D^{20} + 15,5^\circ (\underline{c} 2,0, \text{CH}_3\text{OH}).$$

(4) (N-bentsyylioksidikarbonyyli- α -bentsyyli- δ -L- α -aminoadipyyli)-(S-bentsyyli-L-kysteinyyli)-(O-metyyli-D-seriinibentsyyliesteri)

(N-bentsyylioksidikarbonyyli- α -bentsyyli- δ -L- α -aminoadipyyli)-(S-bentsyyli-L-kysteiniä (150 mg, 0,26 mmol, valmistettu kuten Baldwin et al em, julkaisussa kuvaavat) ja O-metyyli-D-seriinibentsyyliesteri, kloorivetysuolaa (63 mg, 0,26 mmol) liuotetaan dikloorimetaaniin (8 ml), joka sisältää trietyyliamiinia (36 μ l, 0,26 mmol). 2-etoksi-N-etoksidikarbonyyli-1,2-dihydrokinoliinia (64 mg) lisätään ja liuosta sekoitetaan 24 tuntia. Sitten liuos haihdutetaan, tähde liuotetaan kloroformiin (10 ml), kloroformiliuos pestään vuoroin 0,1 M suolahapolla (10 ml) ja kyllästetyllä natriumvetykarbonaattiliuoksella (10 ml), kuivataan (MgSO_4 :lla), sudoatetaan ja haihdutetaan. Puhdistus silikageelikromatografialla käyttäen 98:2 v/v kloroformi:metanolia eluenttina antaa otsikon mukaisen yhdisteen (150 mg, 76 %), joka kiteytetään etyyliasetaatista väritömän kiinteän aineen, jonka sulamispiste on 151...152 °C, saamiseksi,

$[\alpha]_D^{20}$ -13,9° (c 1,0, CHCl_3); ^1H NMR (CD_3CN ,

verrattuna ulkoiseen TMS:iin, δ -arvo, ppm) 1,5...2,3 (liuotinpiikit mukaanlukien) 2,72 (2H, ABX oktetti, J_{AB} 13,5, J_{AX} 7,4 ja J_{BX} 5,0 Hz) 3,25 (3H, s), 3,56 (1H, A osa ABX:stä, J_{AB} 9,2, J_{AX} 3,2 Hz), 3,73 (3H, s), 3,77 (1H, B osa ABX:stä, J_{BX} 4,0 Hz), 4,2, 4,52, 4,60 (3 x 1H, m) 5,1 (6H, m), 6,13, 6,68, 7,17 (3 x 1H), 7,35 (20H, m).

(5) δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyylieetteri)

(N-bentsyylioksidikarbonyyli- α -bentsyyli- δ -L- α -aminoadipyyli)-(S-bentsyyli-L-kysteinyyli)-(O-metyyli-D-seriini-bentsyyliesteriä) (80 mg, 0,10 mmol) liuotetaan tetrahydrofuraaniin (1 ml) ja kuivaan nestemäiseen ammoniakkiin (30 ml). Natriumia lisätään pienissä erissä, kunnes liuos on pysyvästi sininen 5

minuutin ajan, sitten liuos jäädytetään kuivalla ammoniumsulfaattilla, kunnes se on väritöntä. Liuotin haihdutetaan ja tähde liuotetaan veteen (5 ml). Liuotin haihdutetaan ja tähde liuotetaan veteen (5 ml). Ammoniumhydroksidia lisätään liuokseen pH:n nostamiseksi 8:aan ja happikaasua kuplitetaan sen läpi 4 tunnin ajan. Puhdistus preparatiivisella elektroforeesilla (pH 3,5, 3 Kv, 2 tuntia) antaa otsikon mukaisen yhdisteen sen disulfidimuodossa (10 mg, 26 %) värittömänä kiinteänä aineena ^1H NMR (D_2O , verrattuna ulkoiseen TMS:iin, δ -arvot, ppm) 1,5-1,8 (4H, m), 2,25 (2H, t, J 7,0 Hz), 2,73 (2H, m), 3,19 (3H, s), 3,65 (2H, ABX, J_{AB} 10,5 J_{AX} 3,9, J_{BX} 5,5 Hz), 3,84 (1H, t, J 6,2 Hz), 4,40 (1H, t, J 5,8 Hz), 4,47 (1H, m).

Esimerkki 3

2S-2-metoksi-2-metyyli-6- δ -(L- α -aminoadipamido)-3-karboksipenaamin valmistus

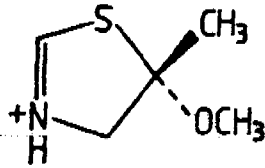
δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R,3R-2-amino-3-metoksibutaanihappoa) (210 ug: valmistettu kuten esimerkissä 1 on kuvattu) inkuboidaan puhdistetun isopenisilliini N syntetaasin kanssa (1,1 yksikköä, saatu kuten alla on kuvattu) kofaktoreiden ditiotreitolin (2,11 mM), askorbiinihapon (1,06 mM), ferrosulfaatin (0,11 mM) ja katalaasin (naudan maksasta, 1800 sigma-yksikköä) läsnäollessa tris-HCl-puskurissa (50 mM, pH 7,5; tris merkitsee 2-amino-2-hydroksimetyyllipropaani-1,3-diolia) 1 ml:n kokonaistilavuudessa, inkubaatio suoritetaan 27 °C:ssa ravistelijassa (250 rpm) ilmastaen 30 minuutin ajan. Proteiini saostetaan seoksesta lisäämällä asetonia 70 %:n pitoisuuteen tilavuudesta, sitten se erotetaan sentrifugoimalla ja supernatantti kuivataan jäädyttämällä. Jäädyttämällä kuivattu materiaali liuotetaan uudelleen veteen (500 μl) ja tuote puhdistetaan HPLC:llä (Waters: Z Module Radial Compression Separator System with Radial-Pak C₁₈10 cartridge) käyttäen 90 % 50 mM KH_2PO_4 /10 % metanolia tilavuudesta eluoivana liuotti-

mena ja antibiootti osoitetaan absorptiometrisesti 220 nm:ssä. Näin saatu tuote kuivataan välittömästi otsikon mukaisen yhdisteen saamiseksi.

Jäädymällä kuivatulla materiaalilla on seuraava NMR-spektri, eri signaalien merkitys edellä osoitetun rakenteen (IV) protoneina on seuraava:

Signaalit	Protonit
1,47	γ -CH ₂ -
1,64	β -CH ₂ -
1,74	CH ₃ - C-2:ssa
2,15	δ -CH ₂
3,13	CH ₃ O- C-2:ssa
3,49	α -CH-
4,24	H-3
5,16	H-5
5,32	H-6

Ytimen Overhause-kokeet vahvistavat yhdisteen stereokemian 2-asemassa sellaiseksi kuten se esimerkin otsikossa ilmaistaan. Siten singlettitilan säteilytys 1,74 ppm:ssä (metyyli-ryhmä) antaa lisäyksen (tavallisesti 19 %) signaalin 4,24 ppm:ssä (H-3) spektrierossa, mikä vastaa metyyli-ryhmää β -konfiguraatiossa (Isopen N:lle ja Pen G:lle havaittu vastava lisäys β -metyyli-ryhmän säteilytyksessä on tavallisesti 21 ja 25 % em. järjestyksessä). Saatu yhdisteen massaspektri Fast Atom Bombardment (FAB)-olosuhteissa osoittaa molekulaarisen ionin [MH⁺] 376 m/e:ssä. Spektrin peruspiikki 321 m/e:ssä on tyypillinen penisilliiniosanen:



Puhdistetun isopenisilliini N syntetaasin valmistus

Cephalosporin acremonium CO728:n soluja kasvatetaan kuten Fawcett et al. (Biochem. J., 1976, 157, 651...660) on kuvannut sillä poikkeuksella, että tislattua vettä käytetään vesijohtoveden sijasta. Isopenisilliini N syntetaasi eristetään puhtaan seuraavien vaiheiden kautta, jotka suoritetaan 2...4 °C:ssa.

(1) Raakauutteen valmistus

Myseeli (ikä 96 tuntia/noin 10 tuntia stationäärivaiheen alkamisesta) kerätään suodattamalla se kaksinkertaisen juustoliinan läpi. Kerätyt solut suspendoidaan uudelleen 3x (v/w) tislattuun veteen ja kuivataan imupaineen avulla Whatman suodatinpaperin (nro 52) läpi Buchner-suppilossa. Imupaineella kuivatut myseelit suspendoidaan noin 3x (v/w) 50 mM Tris-HCl puskuriin, pH 8,0 ja hajotetaan Dyno Millissä (Willy A Bacofen AG Maschienenfabrik, Basel) 500 ml:lla 0,25 mm lasihelmillä sekoittaen 3000 rpm 600 ml:n lasikärjessä.

(2) Protamiinisulfaattifraktiointi

Em. homogenaattiin lisätään yksi viidesosa tilavuus protamiinisulfaattiliuosta (6 % w/v tislatussa vedessä). Syntynyttä liuosta sekoitetaan 20 minuuttia ja sentrifugoidaan 10 000 g 30 minuuttia sakan poistamiseksi.

(3) Ammoniumsulfaattifraktiointi

Edellä kerätty supernatantti kyllästetään 55 %:iseksi ammoniumsulfaatilla (Sigma Grade I) ja sakka poistetaan sentrifugomalla 10 000 g 30 minuuttia. Sitten supernatantti kyllästetään 85 %:iseksi ammoniumsulfaatilla ja entsyymiproteiini saadaan takaisin sakkana 10 000 g 45 minuuttia sentrifugoinnin jälkeen.

(4) Sephadex G-75 pylväskromatografia

55...85 % ammoniumsulfaattifraktioiden jälkeen saatu sakka liuotetaan minimäärään tris-HCl puskuria (50 mM, pH 7,5, 0,015 % w/v natriumatsidi) lopullisen proteiinipitoisuuden ollessa noin 40 mg/ml. 80 ml tätä proteiiniliuosta ladataan Sephadex G-75 (Pharmacia, coarse) pylvääseen (3,7 cm x 110 cm), joka on aiemmin tasapainotettu samalla Tris-HCl-puskurilla. Fraktiot, joissa esiintyy isopenisilliini N syntetaasin aktiivisuutta yhdistetään ja entsyymiproteiini konsentroidaan sakkauttamalla ammoniumsulfaatin n. 85 %:isella paino/tilavuus liuoksella, mitä seuraa sentrifugointi 10 000 g 45 minuutin ajan.

(5) DEAE Sepharose CL-6B pylväskromatografia

Erittäin puhdas entsyymivalmiste saadaan entsyymifraktioiden ioninvaihtokromatografian avulla Sephadex G-75 pylväskromatografialla. Aktiiviset fraktiot yhdistetään ja ladataan suoraan DEAE Sepharose CL-6B pylvääseen (5 cm x 11,5 cm), joka on aiemmin tasapainotettu Tris-HCl-puskurilla (50 mM, pH 7,5, 0,015 % w/v natriumatsidi). Pylväs on pesty noin 500 ml:lla 50 mM NaCl:lla samassa Tris-HCl-puskurissa sitoutumattoman materiaalin poistamiseksi. Sitten pylvästä eluoidaan NaCl-gradientilla puskurissa (50 mM → 250 mM, kokonaistilavuus 800 ml, lineaarinen gradientti) entsyymiaktiivisuuden eluoituaessa noin 100 mM NaCl:n kohdalla. Pylvästä saatu entsyymivalmiste soveltuu suoraan käyttöön.

Entsyymien aktiivisuus voidaan määrällisesti ilmaista isopenisilliini N syntetaasin aktiivisuuden yksikköinä, yhden tällaisen yksikön ollessa määrätty siksi entsyymiaktiivisuuden määräksi, joka tarvitaan muodostamaan 1 μ mooli isopenisilliini N:ää minuutissa 27 °C:ssa standardimenetelmässä inkubaatioolosuhteissa, jotka ovat samanlaiset kuin edellä kuvatut.

Esimerkki 4

2-metoksi-6- δ -(L- α -aminoadipamido)-3-karboksipenaamin valmistus

δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyyli-eetteriä), joka on valmistettu kuten esimerkissä 2 on kuvattu, inkuboidaan puhdistetun isopenisilliini N syntetaasin kanssa, joka on saatu kuten esimerkissä 3 on kuvattu, inkubaatioliuoksen ollessa seuraavassa esitetyn mukainen, eri osaliuosten ollessa veteen valmistettuja.

tripeptidi (10 mg/ml)	100 μ l
isopenisilliini N syntetaasi	6,6 yksikköä
ferrosulfaatti (5 mM)	100 μ l
L-askorbiinihappo (5 mM)	100 μ l
ditiotreitol (100 mM)	50 μ l
katalaasi (vakiovalmiste, 1/10 laimennettu)	43 μ l
natriumhydroksidi (100 mM)	30 μ l

Lopullinen tilavuus säädetään 5 ml:aan Tris-puskurilla pH 7,5. Suoritetaan kontrolli, jossa 100 μ l vettä korvaa peptidiliuoksen. Inkubaatio suoritetaan 30 °C:ssa ravistelijassa (250 rpm) ilmastaen 30 minuutin ajan. Proteiini saostetaan lisäämällä asetonia 70 tilavuusprosentin pitoisuuteen, erotetaan sitten sentrifugoimalla (5000 rpm, 10 minuuttia) ja supernatantti kuivataan jäädyttämällä sen jälkeen, kun asetoni on poistettu tyhjiössä, jolloin saadaan otsikon mukainen yhdiste, jonka uskotaan olevan 2R- ja 2S-isomeerien seos.

Jäädyyttämällä kuivatun materiaalin ^1H NMR-spektri (250 MHz D_2O :ssa HOD-estolla, verrattuna ulkoiseen TMS:iin, δ -arvot, ppm), osoittaa AB-kvartetin 5,23, 5,45 (2H, $J = 3,95$ Hz).

Esimerkki 5

Myrkyllisyyskokeet

(1) 2S-2-metoksi-2-metyyli-6- δ -(L- α -aminoadipamido)-3-karboksipenaami

210 μg :sta tripeptidiä saatu jäädyyttämällä kuivattu tuote, jonka valmistus on kuvattu esimerkissä 3, liuotettiin Tris-puskuriin pH 7,5 kokonaistilavuudeltaan 1 ml:n liuoksen saamiseksi. 100 μl tätä liuosta käytettiin inhibitiotestiin kuoppamaljalla testaten penisilliinin antibioottista vaikutusta useita mikro-organismeja vastaan, jotka on lueteltu taulukossa 1. Antibioottinen vaikutus on selvästi nähtävissä taulukossa annetuista tuloksista. Taulukossa osoitetaan myös isopenisilliini N määrät, jotka tarvitaan antamaan samanlaiset inhibi-tioarvot kullekin tietylle mikro-organismille ja siitä voidaan nähdä, että penisilliini 2S-2-metoksi-2-metyyli-6- δ -(L- α -aminoadipamido)-3-karboksipenaamin vaikutus on laajalti verrattavissa isopenisilliinin vaikutukseen, kun perusteena on 50 % muuttumisnopeus tripeptidistä.

Taulukko 1

Mikro-organismit	Syntyneen estorenkään halkaisija(mm) *	Vastaava isopenisilliinin määrä ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	vain diffuusikehä	> 60
<u>Bacillus megaterium</u>	17	> 80
<u>Staphylococcus aureus</u>	28	> 100
<u>Escherichia coli</u>	20	> 10
<u>Escherichia coli</u>	-	-
-laktamaasia lisätty		
<u>Salmonella typhimurum</u>	17	> 100

Alcalgines faecalis - -
Klebsiella aerogenes - -

* Negatiivinen merkki osoittaa inhibition puuttumista

(2) 2-metoksi-6- δ -(L- α aminoadipamido)-3-karboksipenaami

500 μ g:sta tripeptidiä saatu jäädyttämällä kuivattu tuote, jonka valmistus on kuvattu esimerkissä 4, liuotettiin uudelleen 200 μ l:aan vettä ja 100 μ l tätä liuosta inkuboitiin kuoppamaljateestissä S. aureuksen kanssa (sekä Bacillus cereus 569/H/9:n β -laktamaasi I:n kanssa että ilman sitä). Jäljelle jäänyt 100 μ l liuosta laimennettiin toisella 100 μ l:lla vettä ja 100 μ l tätä laimeampaa liuosta testattiin myös S. aureuksella. Tämä menettely toistettiin onnistuneiden laimennusten saamiseksi. Kontrolli ei sisältänyt yhtään jäädyttämällä kuivattua kiinteää ainetta. Saadut tulokset osoitetaan seuraavassa taulukossa 2, josta voidaan nähdä, että yhdisteen antibiottinen vaikutus, joka selvästi ilmenee β -laktamaasin puuttuessa, tuhoutuu tämän entsyymin toimiessa.

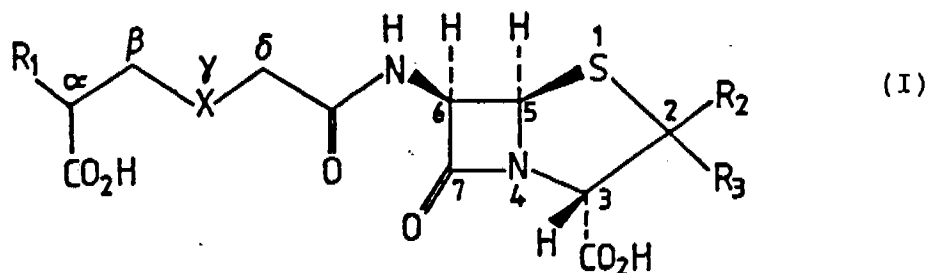
Taulukko 2

Laimennus	Substraatin	Syntyneen estorenkään halkaisija (mm)*		
	paino alku- peräisen tri- peptidin mää- ränä (μ g)	β -laktamaasi puuttuu	β -laktamaasi läsnä	Vertai- lu
1x	500	30	-	-
2x	250	26	-	-
4x	125	21	-	-
8x	62,5	17	-	-
16x	31,25	14	-	-

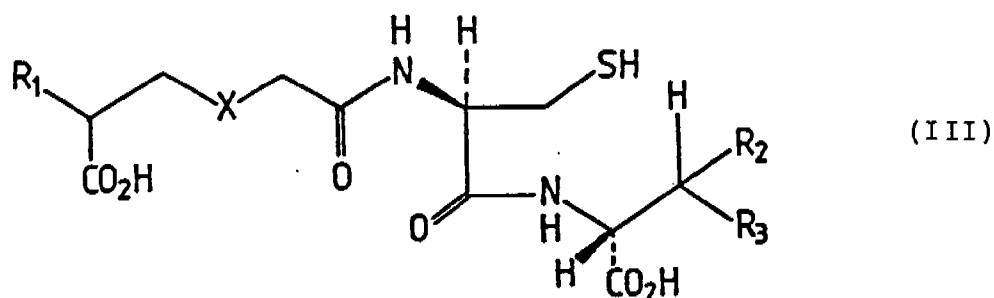
* Negatiivinen merkki osoittaa inhibition puuttumista

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä yleisen kaavan I tai sen fysiologisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi



jossa kaavassa X tarkoittaa rikkiä tai metyleeniä, R_1 tarkoittaa vetyä, aminoa tai asyloitua tai karbamyloitua aminoryhmää, R_2 tarkoittaa vetyä tai alkyyliryhmää ja R_3 tarkoittaa alkoksiryhmää, t u n n e t t u siitä, että kaavan III mukainen tripeptidi



jossa kaavassa X on rikki tai metyleeni, R_1 on vety tai amino, R_2 on vety tai alkyyliryhmä ja R_3 on alkoksiryhmä, saatetaan alttiiksi entsyymien isopenisilliini N syntetaasi vaikutukselle sellaisen kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa R_1 tarkoittaa vetyä tai aminoa, ja muut symbolit tarkoittavat samaa kuin edellä, jonka jälkeen haluttaessa

näin saatu yhdiste I, jossa R_1 tarkoittaa aminoa, saatetaan alttiiksi sopivan asylointi- tai karbamylointiaineen vaikutukselle sellaisten kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi

si, jossa R_1 tarkoittaa asyloitua tai karbamyloitua aminoryhmää, ja/tai haluttaessa

näin saatu yhdiste I saatetaan reagoimaan sopivan epäorgaanisen tai orgaanisen hapon tai emäksen kanssa yhdisteen I fysiologisesti hyväksyttävän suolan saamiseksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tripeptidi III käsittää alkyyliryhmän tripeptidin sellaisessa asemassa, joka vastaa kaavan I mukaisten yhdisteiden tiatsolidonirenkaan substituenttia R_2 , jolloin mainitulla alkyyliryhmällä on R-konfiguraatio tripeptidissä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isopenisilliini N syntetaasi saadaan mikro-organismista Penicillin chrysogenum, Streptomyces clavuligenis tai Cephalosporium acremonium.

4. Patenttivaatimuksien 1...3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymi saadaan mikro-organismikannasta, joka on deponoitu laitokseen American Type Culture Collection numerolla ATCC 20339, ATCC 14553 tai ATCC 36255.

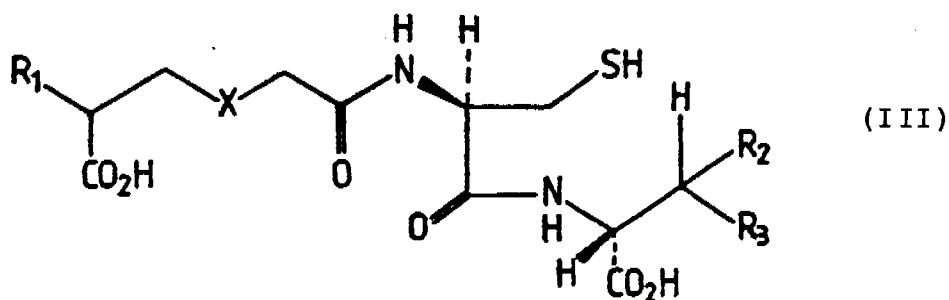
5. Patenttivaatimuksien 1...4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymin vaikutus suoritetaan yhden tai useamman ko-faktorin läsnäollessa.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tuotteena on 2-metoksi-2-metyyli-6- δ -(L- α -amino-adipamido)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-2-metyyli-6- δ -(D- α -amino-adipamido)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-2-metyyli-6- δ -adipamido-3-karboksipenaami, 2-metoksi-2-metyyli-6- δ -(L-S-karboksimeetylikysteinyyli)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-6- δ -(L- α -amino-adipamido)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-6- δ -(D- α -

aminoadipamido)-3-karboksipenaami, 2-metoksi-6- δ -adipamido-3-karboksipenaami, tai 2-metoksi-6- δ -(L-S-karboksimetyyli-kysteinyyli)-3-karboksipenaami.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että 2-metoksiryhmällä on S-konfiguraatio.

8. Yleisen kaavan III tripeptidi



jossa kaavassa X on rikki tai metyleeni, R_1 on vety tai amino, R_2 on vety tai alkyyliryhmä ja R_3 on alkoksiryhmä, tai tripeptidin III johdannainen, jossa yksi tai useampi funktionaalinen ryhmä on suojattu, jolloin mainittu yhdiste tai sen johdannainen esiintyy monomeerisessä muodossa tai disulfidimuodossa.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että yksi tai useampi sulfhydryyliryhmistä, C-päätteisen tähteen karboksiryhmistä ja N-päätteisen tähteen karboksi- ja aminoryhmistä, kun näitä on läsnä, on suojattu.

10. Patenttivaatimuksen 8 tai 9 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että X on rikki tai metyleeni, R_1 on vety tai amino, R_2 on vety, metyyli tai etyyli, ja R_3 on metoksi tai etoksi.

11. Jonkin patenttivaatimusten 8...10 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että yhdiste on δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R-2-amino-3-metoksi-butaanihappo), δ -(D- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(2R-2-amino-3-metoksi-butaanihappo), δ -adipyyli-L-kysteinyyli-(2R-2-amino-3-metoksi-

butaanihappo), δ -(L-S-karboksimetyylikysteinyyli)-L-kysteinyyli-(2R-2-amino-3-metoksi-butaanihappo), δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyylieetteri), δ -(D- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyylieetteri), δ -adipyyli)-L-kysteinyyli-D-seriini-O-metyylieetteri tai δ -(L-S-karboksimetyylikysteinyyli)-L-kysteinyyli-(D-seriini-O-metyylieetteri).

12. Jonkin patenttivaatimuksen 8...11 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_2 ja R_3 tarkoittavat vastaavasti alkyyliä ja alkoksia ja R_2 ja α -karboksiryhmä ovat cis-konfiguraatiossa.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP H - 102 216 C12 P 35 /06

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

J. Chem. Soc., Chem. Comm. 17 (1981)
917-919 Bahadur et al.

J. Chem. Soc., Chem. Comm. 22 (1983)
1317-1319 Baldwin et al

Helv. Chem. Acta 67 (1984)
870-875 Shields et al


Allekirjoitus