

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 935409 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **935409**

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

C12P 17/08

C12N 1/14

C07D313/00

A61K 31/71

A61K 31/335

A61K 31/33 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **02.12.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.12.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **05.06.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

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

04.12.1992 GB 9225396

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Sandoz AG, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Dreyfuss, Michael Morris, Switzerland, SVEITSI, (CH)

2 • Leutwiler, Albert, Switzerland, SVEITSI, (CH)

3 • McKenzie, Andrew Roland, Switzerland, SVEITSI, (CH)

4 • Schnyder, Jörg, Switzerland, SVEITSI, (CH)

5 • Traber, Rene Paul, Switzerland, SVEITSI, (CH)

6 • Mattes, Henri, Brunnstadt, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

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

Orgaanisiin yhdisteisiin liittyviä parannuksia

Förbättringar rörande organiska föreningar

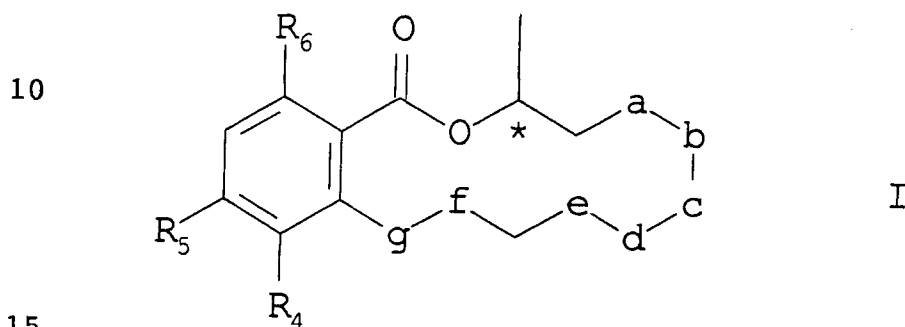
(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

18919 NRRL

ORGAANISIIN YHDISTEISIIN LIITTYVIÄ PARANNUKSIA

Keksintö liittyy yhdisteisiin, jotka ovat hyödyllisiä sytokiinin vapautumisen estäjinä ja IL-1 antagonisteina.

Esillä oleva keksintö tuo esiin uusia yhdisteitä, joilla on kaava I,



- jossa R_4 ja R_6 ovat samoja tai erilaisia ja ovat H, OH, C_{1-4} alkoksi tai C_{1-4} alkyyli COO-,
 R_5 on OH, C_{1-4} alkoksi tai C_{1-4} alkyyli COO,
 yksi, -a-b- tai -d-e-, on -CHR₇-CHR₈- ja toinen on cis-
 20 tai trans- -CR₇=CR₈-, jolloin R_7 ja R_8 ovat samoja tai erilaisia ja ovat H, OH, C_{1-4} alkoksi tai C_{1-4} alkyyli COO-,
 c on CH-OH tai C=O ja
 -f-g- on -CH₂-CH₂- tai cis- tai trans- -CH=CH-,
 ehdolla, että kun R_4 on H, R_6 on OH ja -f-g- on trans-
 25 -CH=CH-; 1. R_5 ei ole OH, kun -a-b- on -CH₂-CH₂-, c on C=O ja -d-e- on -CH₂-CH₂-, tai 2. R_5 ei ole metoksi, kun -a-b- on -CH₂-CH₂- tai cis- -CH=CH- ja c on C=O tai CH-OH ja -d-e- on -CHOH-CHOH,
 30 vapaassa muodossa tai emässuolan muodossa tai fysiologisesti hydrolysoituvan tai fysiologisesti hyväksyttävän esterin muodossa, ja jossa * merkitty asymmetrinen hiili ja atomit a ja/tai b tai d ja/tai e, näiden ollessa asymmetrisiä hiiliatomeja, ovat R- tai S-konfiguraatiossa tai yhdiste käsittää sen optisten isomeerien minkä tahansa seoksen.

R_4 ja R_5 ovat edullisesti samoja tai erilaisia

ja ovat H, -OH, MeO- tai Me-COO-. R_5 on edullisesti -OH, MeO- tai MeCOO-. Edullisemmin, R_4 on H tai MeO; R_5 on MeO ja R_6 on OH tai MeO.

Edullisesti, -a-b- on cis- tai trans- $CR_7'=CR_8'$ -, jolloin R_7' ja R_8' ovat samoja tai erilaisia ja ovat H, OH, MeO- tai Me-COO-. Edullisemmin, -a-b- on cis- tai erityisesti trans- -CH=CH-.

Edullisesti, -d-e- on -CHR_{7'}'-CHR_{8'}'-, jolloin R_7' ja R_8' tarkoittavat samaa kuin edellä. Edullisemmin, -d-e- on -CH₂-CH₂- tai erityisesti -CHOH-CHOH-, jolloin OH ryhmät voivat olla vapaassa tai suojatussa muodossa.

Erityisen edullisesti, -f-g- on trans- -CH=CH-.

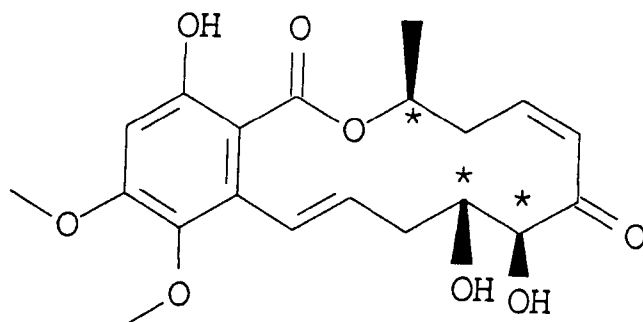
Keksinnön mukaisten yhdisteiden asymmetriset hiiliatomit ovat edullisesti kaikki S-konfiguraatiossa.

Esillä oleva keksintö tuo erityisinä sovelluksina esiin kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa R_4 on H tai metoksi, R_5 on metoksi, R_6 on OH, -a-b- on cis- tai trans- -CH=CH-, c on CHOH tai C=O, -d-e- on -CHOH-CHOH- ja -f-g- on trans- -CH=CH-; ehdolla, että kun -a-b- on cis- -CH=CH-, niin R_4 on metoksi ja c on C=O, vapaassa muodossa tai emässuolan muodossa tai fysiologisesti hydrolysoituvan ja fysiologisesti hyväksyttävän esterin muodossa.

Kaava I', joka on kaava I, jossa R_4 ja R_5 ovat metokseja, R_6 on OH, -a-b- on cis- -CH=CH-, c on C=O, -d-e- on -CHOH-CHOH-, -f-g- on trans- -CH=CH- ja * merkityt asymmetriset hiiliatomit ovat kaikki S-konfiguraatiossa,

30

35



I'

on rakenne, joka esitetään uutena metaboliittina, jolla on tunnus 87-250904-F1 ja seuraavat ominaisuudet:

Valkoisia neuloja (metanoli/vedestä, 1:1), sp. 173-
5 174°C, $[\alpha]_D^{25} = -43.6^\circ$ (MeOH, $c = 0.76$)

Massaspektri (FAB): $m/e = 393$ (MH^+)

IR spektri, KBr:ssä: ks. kuva 1

Protoni NMR, $CDCl_3$, 360 MHz TMS ollessa sisäisenä stan-
10 dardina, ks. kuva 2.

Liukoisuus: lähes liukenematon veteen, liukenee helposti metanoliin, DMSO:hon, kloroformiin.

15 HPLC: Pylväs: LiChrospher 100 RP-8 (5 μm) (LiChro-CART 125-4, Merck)

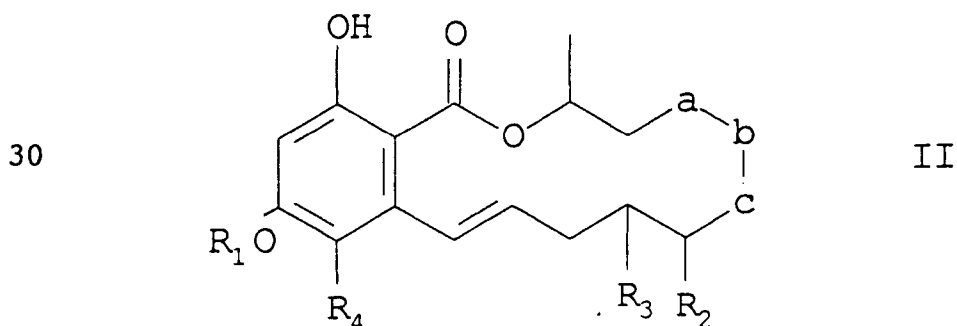
Liikkuva faasi: asetonitriili/vesi/ortofosforihappo 350:650:0.175 (til.)

virtausnopeus: 1.0 ml/min

20 Toteaminen: UV 210 nm

Retentioaika: 3.8 min

Kaavan I mukaiset yhdisteet ovat uusia yhdisteitä, jotka kuuluvat samaan yhdisteiden luokkaan, kuin
25 zearalenoni (zearalenon), joka on yhdiste, jolla on kaava II,

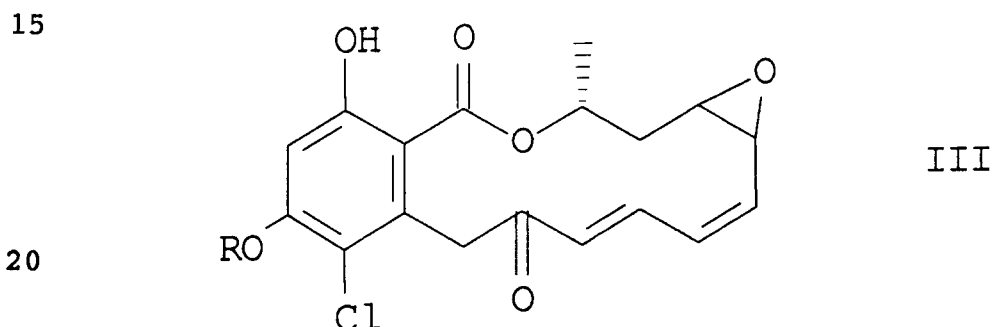


35 jossa $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$, $-a-b- = -CH_2-CH_2-$, ja $c = C=O$. Zearalenonilla tiedetään olevan anabolisia vaikutuksia. Kaavan II mukaisia yhdisteitä, joissa R_1 on

metyyli, $R_2 = R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $-\text{a-b}- = -\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ tai cis- $-\text{CH}=\text{CH}-$ ja $\text{c} = \text{C}=\text{O}$ tai $\text{CH}-\text{OH}$, on kuvattu julkaisussa, Ellestad et al, J. Org. Chem. 43 2339 (1978), jossa niiden osalta esitetään, että "niillä ei ole mitään erityisen mielenkiintoista aktiivisuutta", ja arvelaan, että fenolisen eetterin läsnäolo (so. metoksiryhmä bentseenirenkaassa) voi olla syynä tähän aktiivisuuden puuttumiseen.

Tämä huomioiden on yllättävää, että kaavan I mukaisilla yhdisteillä olisi farmakologista aktiivisuutta.

Kaavan I mukaiset yhdisteet liittyvät myös radikikoliyhdisteeseen (radicicol), joka on kaavan III mukainen yhdiste,



jossa R on H. Tunnetaan myös vastaava metoksiyhdiste, jossa R on metyyli.

25 Radikikolilla, joka on Monosporium Bonorden metaboliitti, tiedetään olevan antibioottisia ominaisuuksia [Delmotte, Nature 171 344 (1953)].

Nyt on yllättäen havaittu, että edellä mainituilla kaavan I mukaisilla yhdisteillä, radikikolilla, o-metyyliradikikolilla ja Ellestad et al kuvaamilla zearalenonijohdannaisilla on myös sytokiinin vapautumista estäviä ominaisuuksia, erityisesti ne estävät IL-1, IL-6 ja $\text{TNF-}\alpha$ vapautumista ja toimivat lisäksi IL-1:en funktionaalisina antagonisteina.

35 Kaavan I' mukainen yhdiste voidaan valmistaa kasvattamalla tuottavaa mikrobikantaa ravintoväliaineessa. Edullisia mikro-organismeja ovat pyknidisten

(kuroumapullosten) epätäydellisten sienten (pycnidial imperfect fungi) kannat, erityisesti kanta F/87-250904, joka tuottaa metaboliittia 87-250904-F1.

Tämä kanta on eristetty Etelä-Afrikasta kerä-
 5 tystä tunnistamattomasta jäkälästä. Kannan elinkykyinen viljelmä talletettiin 6.11.1991, ARS Patent Culture Collection-laitokseen, US Dept. of Agriculture, Northern Regional Research Center, Peoria, Illinois, USA, Budapestin sopimuksen alaisena talletusnumerolla NRRL
 10 18919. Viljelmän on saatavissa myös Sandoz Ltd.'ltä, Basle, Sveitsi.

Sienikanta NRRL 18919 kasvaa useimmilla tavallisilla sieniarvvaliaineilla, kuten 2 % mallasuuteagarilla. Kasvatuslämpötila on n. 5 - 37 °C, optimaalinen
 15 kasvatuslämpötila on n. 24 - 32 °C. Petrimaljoilla olevalla 2 % mallasagarilla ja 27 °C lämpötilassa kanta NRRL 18919 muodostaa 10 päivän inkuboinnin jälkeen halkaisijaltaan 25 - 35 mm pesäkkeitä. Pesäkkeet ovat esiintyvät ruskeasta vihreänmustan ja mustan värisinä
 20 ja niihin on muodostunut kohtalaisesti ilmavaa myseeliä. Näissä olosuhteissa ei muodostu selviä diffundoituvia pigmenttejä. Kanta NRRL 18919 voi hajottaa tärkelystä ja keratiinia, mutta ei hajoita tai hajoittaa vain hyvin rajoitetusti selluloosaa ja kitiiniä.

25 Kannan NRRL 18919 pyknidien (kuromapullot) muoto ja koko voi vaihdella huomattavasti. Ne vaihtelevat lähtien koosta n. 30 μ , jolloin niiden muoto voi olla pallonmuotoisesta päärynämuotoiseen varustettuna yksittäisellä ostiolumilla, tai ne voivat olla epäsäännöllisen muotoisia, kooltaan jopa 600 μ suurien pyknidien tai pyknidisten kompleksien muodossa, varustettuna useilla ostioleilla. Ulommat pyknidiset seinämät muodostuvat ruskeista soluista. Konidiat on hyaliinisia, aseptaattisia, sauvamaisia, munuaismaisesta allan-
 30 toidiin, usein kuroutuneita ja 3.0 - 5.5 x 1.0 - 1.7 μ suuria. Konidiat muodostetaan pyknidien sisällä ohuiden fialidien (phialides) toimesta ja ne kerääntyvät os-

tiolin ulkopuolelle valkeahkona massana. Kanta NRRL 18919 voidaan sovittaa parhaiten Phoma Sacc. sukuun ja se sopii melko hyvin Phoma cava Schulzer kuvaukseen.

Uutta kantaa NRRL 18919 voidaan kasvattaa sopivassa lämpötilassa erilaisissa kasvatusväliaineissa käyttäen sopivia ravinne- ja mineraaliaineita aerobisena pinta- tai immersioviljelmänä. Keksintö tuo edelleen esiin fermentaatioliuokset, jotka saadaan kasvattamalla 87-250904-F1 tuottavaa sienikantaa, erityisesti NRRL 18919 kantaa. Keksintö tuo edelleen esiin mentelmän kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, johon menetelmään kuuluu 87-250904-F1-tuottavan sienikannan kasvatusvaihe ja muodostuneen 87-250904-F1 metaboliitin eristysvaihe.

Fermentointiväliaineen tulisi sisältää hyödynnettävää hiililähdettä ja mahdollisesti mineraalisuoloja ja kasvutekijöitä, jotka kaikki voidaan lisätä hyvin määriteltujen tuotteiden muodossa tai monimutkaisina seoksina, joita esiintyy eri alkuperää olevien biologisten tuotteiden yhteydessä.

Uuden metaboliitin 87-250904-F1 valmistamiseksi voidaan käyttää myös kantoja, jotka saadaan valikoidulla tai mutaatiolla ultraviolettisäteilytyksen, röntgensäteilytyksen tai muun keinon, kuten kemiallisten mutageenin käytön, vaikutuksesta.

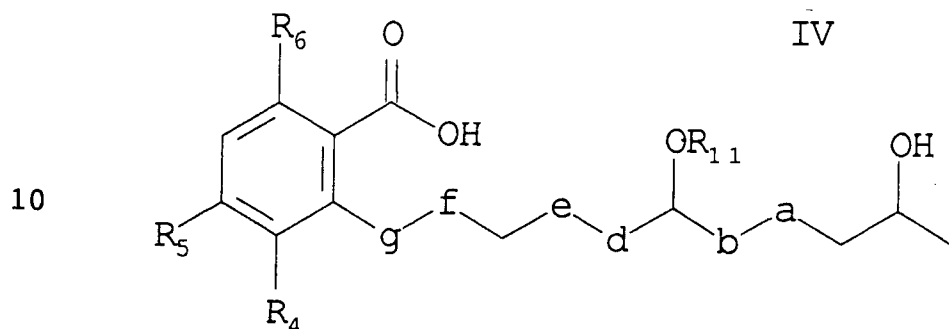
Kun metaboliittia on kerääntynyt riittävä määrä viljelmään, se voidaan konsentroida ja eristää konventionaaliseen tapaan, esim. uuttamalla ja sitä seuraavilla kromatografisilla menetelmillä.

Kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa a-b on trans- -CH=CH-, voidaan valmistaa vastaavista yhdisteistä, joissa a-b on cis- -CH=CH-, isomeroimalla heikosti alkalisissa olosuhteissa, esim. pyridiiniliuoksessa, sopivasti 12 - 48 h, lämpötilassa 0 - 80 °C, edullisesti n. 50 °C.

Kaavan I mukaiset yhdisteet voidaan myös valmistaa kemiallisella koko- tai osasynteetillä käyttäen

konventionaalisia synteessimenetelmiä.

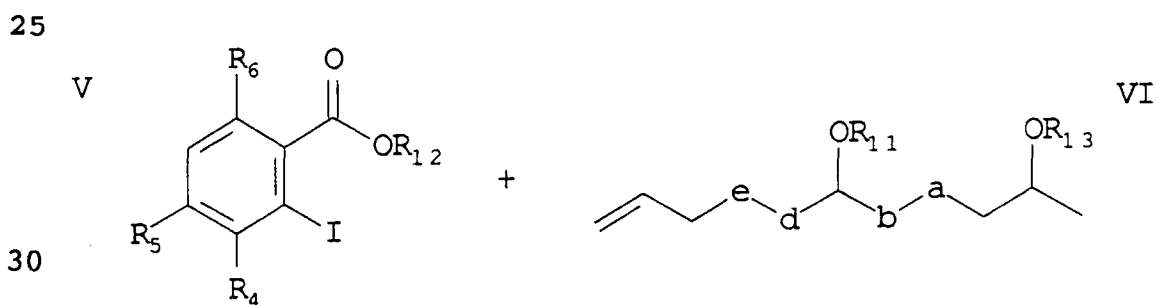
Siten keksintö tuo lisäksi esiin menetelmän
kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa
yhdisteessä c on CHOH. Menetelmässä syklistetään yhdis-
te, jolla on kaava IV,



15 jossa R_4 , R_5 , R_6 , -a-b-, -d-e- ja -f-g- tarkoittavat
samaa kuin edellä, poikkeuksella että mahdolliset OH
substituentit -a-b-:ssa tai -d-e-:ssa ovat sopivasti
suojatussa muodossa, ja R_{11} on H tai OH suojaryhmä;
ja yhdisteestä poistetaan mahdolliset OH suojaryhmät.

20 Kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa c on C=O,
voidaan valmistaa syklistetystä tuotteesta hapettamalla
c:ssä oleva CHOH ryhmä.

Kaavan IV mukaiset yhdisteet, joissa -f-g- on
trans- -CH=CH-, voidaan valmistaa liittämällä yhdis-
teet, joilla on kaavat V ja VI,

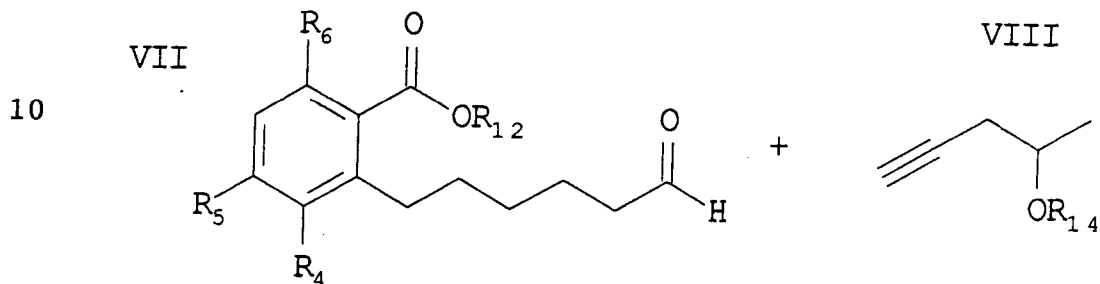


jossa R_4 , R_5 , R_6 , R_{11} -a-b-, -d-e- ja -f-g- tarkoittavat
samaa kuin edellä kaavan IV kohdalla ja R_{12} ja R_{13} ovat
OH suojaryhmiä;
35 ja poistetaan R_{12} ja R_{13} ovat OH suojaryhmiä.

Kaavan VI mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa
liittämällä 4-hydroksibut-1-yyenin hydroksisuoja-

analogi heks-1-en-5-onin kanssa, pelkistämällä osittain tai kokonaan asetyleenisidos ja, tarvittaessa, lisäämällä R_{11} OH suojaryhmä.

- 5 Kaavan IV mukaiset yhdisteet, joissa -f-g- on $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, voidaan valmistaa liittämällä yhdisteet, joilla on kaavat VII ja VIII,

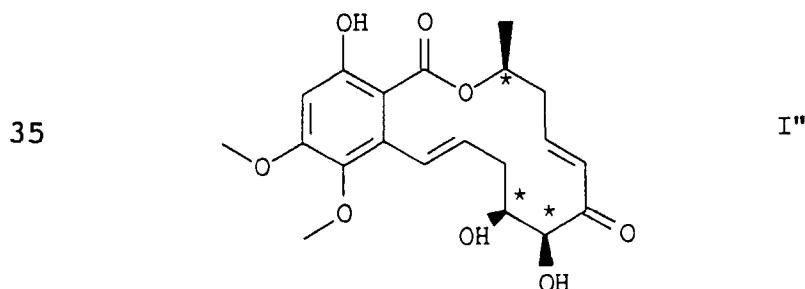


- 15 jossa R_4 , R_5 , R_6 ja R_{12} tarkoittavat samaa kuin kaavojen IV ja V kohdalla ja R_{14} on OH suojaryhmä; pelkistämällä osittain tai kokonaan asetyleenisidos ja, tarvittaessa, poistamalla OH suojaryhmät.

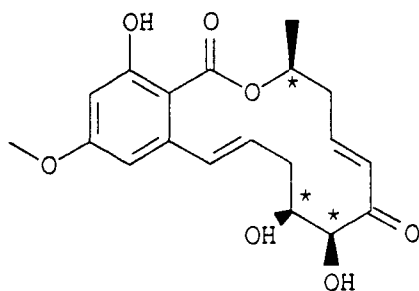
- 20 Kaavan VII mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa liittämällä edellä mainittu kaavan V mukainen yhdiste 6-hydroksi-heks-1-eenin hydroksisuojatun analogin kanssa, pelkistämällä alkyleenisidos, joka vastaa f-g kaavassa I, poistamalla suojaryhmä terminaalista hydroksiryhmästä C_6 sivuketjussa ja hapettamalla tämä
- 25 hydroksiryhmä aldehydiryhmäksi.

Edellä mainitut menetelmät voidaan suorittaa käyttäen konventionaalisia synteesimenetelmiä, reagensseja ja olosuhteita; esim. kuten on kuvattu esimerkeissä myöhemmin.

- 30 Edullisia yhdisteitä, joissa a-b on trans- $-\text{CH}=\text{CH}-$, ovat yhdisteet, joilla on kaavat I", X ja XI,

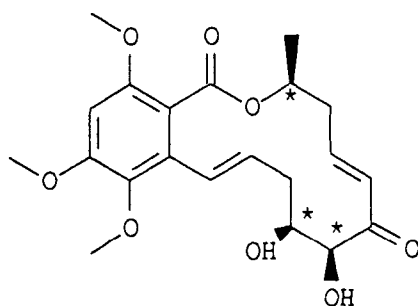


5



X

10

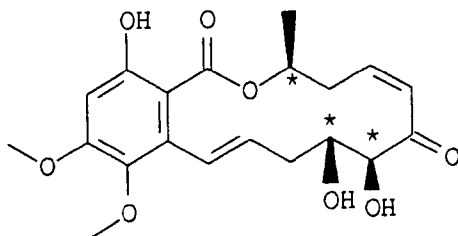


XI

15

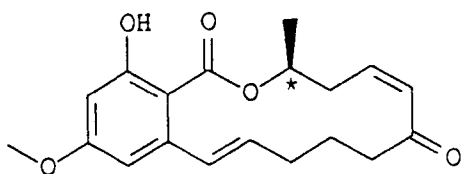
Edullisia yhdisteitä, joissa a-b on cis- -CH=CH-, ovat yhdisteet, joilla on kaavat I', XII ja XIII,

20



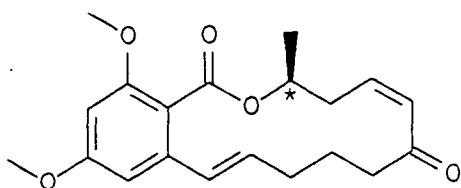
I'

25



XII

30



XIII

35

Keksinnön mukaisilla yhdisteillä on farmakologisia ominaisuuksia. Erityisesti niillä on sytokiinia estäviä vaikutuksia siten, että ne eivät toimi vain estäen IL-1, IL-6 ja TNF- α vapautumista, mutta ne ovat myös IL-1:n funktionaalisia antagonistteja, kuten voidaan todeta seuraavista in vitro ja in vivo koemenetelmistä:

1. Sytokiinin vapautuminen THP-1 soluista

10 THP-1 solulinja on yleisesti saatavilla ja sen on kuvannut Tsuchiya et al., Int. J. Cancer 26 171-176 (1980). 900 μ l THP-1 soluja (0.5×10^6 solua) yhdessä 100 U γ -interferoni/0.9 ml RPMI 1640 väliaineen kanssa (sisältää 2 mM L-glutamiinia ja 5 % lämpöinaktivoitua vasikan sikiöseerumia) pipetoidaan 24 kuopan viljelylevyille. 100 μ l testattavaa yhdistettä lisätään tämän jälkeen. Kolmen tunnin kuluttua, 37 °C, 5 % CO₂/95 % ilma, lisätään 10 μ l lipopolysakkaridia 500 μ g/ml ja inkubointia jatketaan vielä 40 h ajan. Kokeessa käytetään myös asianmukaisia kontrolleja (yhdessä ja ilman stimulusta, liuontinta). Sitten väliaine poistetaan ja kirkastetaan sentrifugoimalla, 1000 g, 10 min ajan. Kuoppiin lisätään 1 ml 0.01 % digitoniinia solujen lyysin aikaansaamiseksi, joita soluja on irrotettu 25 raaputtamalla kumisauvalla, ja jätetty 4 °C, 10 min. Laktaattidehydrogenaasimääritykset suoritetaan välittömästi ja näytteitä säilytetään -20 °C, kunnes voidaan suorittaa seuraavat määritykset. Määritykset ovat: IL-1 β (väliaine ja lyaatti), IL-6 (väliaine), TNF- α (väliaine), PGE₂ (väliaine ja lyaatti), laktaattidehydrogenaasi (LDH) (väliaine ja lyaatti) ja DNA (lysaatit). IL-1 β , IL-6 ja TNF- α määritykset suoritetaan käyttäen kaupallisesti saatavia ELISA kittejä (Cistron), PGE₂ määritetään käyttäen standardi RIA ja DNA määritetään 35 fluorimetrisesti käyttäen DAPI (4', 6-diamino-2-fenyyli-indoli.2HCl).

Tässä kokeessa keksinnön mukaiset yhdisteet

estivät IL-1 β , IL-6, TNF- α ja PGE2 vapautumista pitoisuuksina n. 0.001 - 10 μ M. Sitä vastoin DNA tasot pysyvät oleellisesti ennallaan ja yhdisteet eivät ole toksisia, sillä LDH vapautuminen pysyy muuttumattomana.

5

2. Sytokiinin vapautuminen ihmisen monosyyteistä

a) Ihmisen monosyytit

Mononukleaarisoluja saadaan terveiden vapaaehtoislouovuttajien verestä sentrifugoinnin kautta ja
 10 niitä kasvatetaan kudaskasvatusmaljoilla yhdessä vaihtele-
 van pitoisuuksisilla testiyhdisteillä [Schnyder et al., Agents & Actions, 30, 350-362 (1990)]. Ei-adherentit lymfosyytit poistetaan 4 h kuluttua pesemällä useita kertoja. Joukkoon lisätään tuoretta väliainetta,
 15 testiyhdistettä sekä LPS (10 μ g/ml) stimulantiksi ja monosyyttejä inkuboidaan vielä yhden päivän ajan. Yhdistetyt kasvatusväliaineet laimennetaan 1:10 tuoreella väliaineella ja ne lisätään konfluentteihin kaniinin kondrosyytteihin. Metallo-proteinaasi (MP) aktiivisuus
 20 kondrosyyttikasvatusväliaineessa määritetään kahden lisäpäivän kuluttua edellä kuvatun mukaisesti. Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat tässä kokeessa aktiivisia monokiinivapautumisen suppressoinnissa pitoisuuksina suuruusluokkaa 0.001 - 10 μ M.

25

b) IL-1 määrittäminen kondrosyyttikokeella

Puhdistettuja IL-1, rekombinantti IL-1- β (rhIL-1) tai säädetty (conditioned) väliaine, joka on kerätty stimuloituista ihmisen monosyyteistä, hiiren makrofaageista tai hiiren solulinjasta P388D₁, aiheuttavat luonteenomaisia muutoksia kondrosyyttien erityis-
 30 vassa. Erityisesti indusoituu latentti metalloprotei-
 naasi (MP), kun taas plasminogeeniaktivaattorin erityys vähenee. Metalloprotei-
 naasin tai stromelyysin ominaisuudet on kuvattu yksityiskohtaisesti [Chin et
 35 al., J. Biol. Chem. 260, 12367-12376 (1985)], kuin myös plasminogeeniaktivaattorin [Schnyder et al., Analyt.

Biochem. 200, 156-162, 1992]. Annos-vastekuvaajat käyttäen puhdistettua tai rekombinantti IL-1 ja neutralointia ihmisen monosyytti IL-1 vastaisella vasta-aineella ovat osoittaneet, että tätä järjestelmää voidaan käyttää spesifisenä ja herkkänä biomäärityksenä IL-1:lle. Latentin metalloproteinaasin erityksen stimulaatio kaniinin nivelkondrosyyteillä on suhteellisen IL-1-spesifinen; IL-2:lla, TNF- α :lla, rekombinantti ihmisen interferoni- α :lla ja - γ :lla, forbolimyristaattiasetaatilla, konkavaliini A:lla, E-tyypin prostaglandiinilla ja indometasiinilla ei ole siihen vaikutusta [Schnyder ja Payne, Brit. J. Rheumatol. 24 (suppl. 1), 128-132 (1985); Schnyder et al., J. Immunol. 138, 496-503 (1987)].

Kondrosyyttejä kerätään ja kasvatetaan kuvatus mukaisesti [Evequoz et al., Biochem. J. 219, 667-677 (1984)]. Lyhyesti, kondrosyytit vapautetaan distaalisesta reisiluun nivelrustosta, joka on saatu 1.2 kg New Zealand White naaraskaniineista, suorittamalla proteinaasikäsittely. Pestyjä soluja kasvatetaan 48-kuopan viljelylevyillä DMEM:ssä, jota on täydennetty 1 % anti-biootilla, 2 mM glutamiinilla ja 10 % lämpö-inaktioidulla vasikan sikiöseerumilla. Konfluenssin saavuttamisen jälkeen soluja inkuboidaan testikasvatusväliaineen 20 μ l näytteen kanssa IL-1 biomääritystä varten ja täydennetään 300 μ l tilavuuteen Iscove'en modifioidulla Dulbecco'n väliaineella. Supernatanttiväliaineet kerätään 48 h jälkeen, sentrifugoidaan ja prosessoidaan biokemiallista analyysiä varten.

c) Biokemialliset määritykset

Metalloproteinaasi (MP) määritetään kineettisesti käyttäen 96-kuopan levyä Twinreader (Flow Laboratories AG), joka on yhdistetty henkilökohtaiseen tietokoneeseen. Ac-Pro-Leu-Gly-S-Leu-Leu-Gly-OC₂H₅, joka on synteettinen substraatti selkärankaisten kollageeniasille, käytetään MP määritykseen [Weingarten ja

Feder, Anal. Biochem. 147, 437-440 (1985)]. 50 μ l latenttia MP aktivoidaan 50 μ l trypsiinillä (120 μ g/ml, 50 mM PIPES, pH 6.8, sisältää 20 mM CaCl₂) 30 min ajan, 37 °C, jonka jälkeen kaikkien seriiniproteinaasien aktiivisuudet pysäytetään lisäämällä 150 μ l soi-japaput-rypsiini-estäjää (SBTI; 166 μ g/ml yllä olevassa puskurissa). Tämän jälkeen sekoitetaan 50 μ l aktivoitua MP liuosta 100 μ l reagenssiliuokseen (2.5 mM 5,5'-ditio-bis-2-nitrobentsoehappo; DTNB, 100 μ g/ml SBTI, 20 mM CaCl₂ edellä mainitussa puskurissa) ja saatua seosta pidetään 10 min ajan huoneenlämpötilassa reaktion aikaansaamiseksi kaikkien vapaiden SH-ryhmien kanssa. Reaktio aloitetaan sitten lisäämällä 100 μ l substraattiliuosta (1.25 mM puskurissa, joka sisältää 100 μ g/ml SBTI) ja muutokset absorbanssissa 414 nm aallonpituudella mitataan 11 kertaa 1 min välein.

3. Funktionaaliset IL-1 antagonistiset vaikutukset

Toistetaan muuten kohdassa 2) kuvattu koemenetelmä, mutta ihmisen monosyyttien lisäämisen kondrosyyttiviljelmään sijasta IL-1 itsessään (rekombinantti ihmisen IL-1 β , Sandoz) lisätään 1 ng/ml pitoisuutena. MP aktiivisuus kondrosyyttikasvuväliaineessa määritetään 2 päivän kuluttua. Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat aktiivisia funktionaalisina IL-1 antagonisteina pitoisuuksina 1 - 30 nM.

4. LPS-kuume

LPS-suspensiota (Sigma, No. L-5886; 100 μ g/5 ml glukoosiliuos/kg s.c.) injektoidaan Tuttlingen SD urosrottiin (150 - 160 g). Kaksi tuntia myöhemmin mitataan kehon lämpötila käyttäen rektaalista termistorikoetinta, joka on liitetty ELLAB teletermometrin yhteyteen. Testiyhdiste annetaan 4 h myöhemmin. Kaksi tuntia myöhemmin (6 h LPS annon jälkeen) lämpötila mitataan jälleen. Käsittelemättömillä kontrolleilla

esiintynyt lämpötilan nousu otetaan 100 % ja käsitellyn ryhmän vastaava ilmaistaan prosentteina tästä arvosta. ED_{50} on annos, joka aiheuttaa lämpötilan nousussa 50 % estymisen, joka lämpötilan nousu on määritetty kontrolli-
 5 lirotilta. Tässä kokeessa keksinnön mukaisten yhdisteiden ED_{50} on tyypillisesti n. .1 - 1 mg/kg.

5. Rotan karrageeni(carrageenan)-indusoitu käpälän turvotus

10 Jokaisessa ryhmässä käytetään 5 OFA urosrottaa, jotka painavat 150-170 g. Testiainetta annetaan oraalisesti fysiologinen suolaliuos/0.5% tragantti suspensiona 1 h ennen karrageeni-injektiota. Karrageeni (0.1 ml 1 % suspensio fysiologisessa suolaliuoksessa)
 15 annetaan jalkapohjan alaisena injektiona yhteen takakäpälään. Käpälän turpoaminen mitataan antiflogometrillä Kemper & Amelm mukaisesti. Kontrollilukema otetaan välittömästi injektion jälkeen ja turpoaminen mitataan 3 ja 5 h kuluttua. Otetaan 3- ja 5-h lukemien keskiarvo, kun kontrollilukema on vähennetty, ja käsitellyiltä eläimiltä saadut arvot ilmaistaan prosentteina ei-käsitellyiltä kontrolleilta saadusta arvosta. ED_{50} tarkoittaa annosta, joka estää 50 % karrageeni-indusoitua turpoamista 3 h jälkeen. Tässä koemenetelmässä keksinnön mukaisten yhdisteiden ED_{50} on tyypillisesti n. .1 -
 25 1 mg/kg.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä ehdotetaan siten käytettäväksi hoidettaessa häiriöitä, joiden etiologiaan liittyy tai kuuluu liiallista sytokiinin vapautumista, erityisesti IL-1 β vapautumista, esim. mitä erilaisimpia inflammatorisia tiloja ja sairauksia, kuten nivelreumaa, osteoartriittia, septistä shokkia, psoriasisista, ateroskleroosia, inflammatorisia suolistosairauksia, Crohn'in sairautta tai astmaa.
 35

Edellä mainittuihin käyttötarkoituksiin tarvittava annos luonnollisesti vaihtelee riippuen anto-

muodosta, erityisestä hoidettavasta tilasta ja halutusta vaikutuksesta. Yleisesti, tyydyttäviä tuloksia kuitenkin saavutetaan annosmäärillä n. 0.1 - 20 mg/kg eläimen kehonpaino, edullisesti n. 0.5 - 5 mg/kg. On määritetty, että kaavan I' mukaisen yhdisteen IC_{50} arvo THP-1 kokeessa (yhdisteen pitoisuus, joka estää 50 % IL-1 β vapautumista) on n. 0.06 μ M. Siten ehdotetaan, että tätä yhdistettä voidaan antaa päiväannoksina 8 mg - 2 g p.o. suuremmille nisäkkäille, kuten ihmiselle.

Edellä esitetyn mukaisesti esillä oleva keksintö tuo edelleen esiin:

- i) menetelmän häiriöiden hoitamiseksi, joiden häiriöiden etiologiaan liittyy tai kuuluu liiallista sytokiinin vapautumista, erityisesti IL-1 β vapautumista, kuten nivelreuman, osteoartriitin, septisen shokin, psoriasiksen, ateroskleroosin, inflammatorisen suolistosairauden, Chron'in sairauden tai astman hoitamiseksi tällaista hoitoa tarvitsevalta kohteelta, jolloin menetelmässä mainitulle kohteelle annetaan vaikuttava määrä
- a) edellä määritettyä kaavan I mukaista yhdistettä; tai

b) kaavan II mukaista yhdistettä, jossa:

R_1 on H tai metyyli;

R_2 ja R_3 ovat H tai OH;

R_4 on H tai metoksi;

-a-b- on $-CH_2-CH_2-$ tai $-CH=CH-$

ja c on C=O tai CH-OH (muu kuin kaavan I mukaiset yhdisteet); tai

c) kaavan III mukainen yhdiste, jossa R on H tai metyyli,

vapaassa muodossa tai emässuolan muodossa tai sen fysiologisesti hydrolysoituvaa ja fysiologisesti hyväksyttävää esterinä.

35

ii) kaavan II mukaisen yhdisteen, jossa:

R_1 on metyyli; R_2 ja R_3 ovat H tai OH; R_4 on H tai me-

toksi; -a-b- on $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ tai cis- $-\text{CH}=\text{CH}-$; ja c on $\text{C}=\text{O}$ tai $\text{CH}-\text{OH}$; vapaan emäksen muodossa tai suolan muodossa, tai sen fysiologisesti hydrolysoituvan ja fysiologisesti hyväksyttävän esterin käytettäväksi farmaseuttisena aineena esim. jonkin edellä esitetyistä sairauksista hoidossa.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan antaa mitä tahansa konventionaalista reittiä, erityisesti nasaalisesti, enteraalisesti, edullisesti oraalisesti, esim. tablettien tai kapsелеiden muodossa, tai parenteraalisesti, esim injektoitavien liuosten tai suspensioiden tai peräpuikkojen muodossa. Yksikköannosmuodot sisältävät esim. n. 2 mg - 1 g keksinnön mukaista yhdistettä. Keksintö tuo vielä esiin farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää vaikuttavan määrän edellä kohdassa b) määriteltä kaavan II mukaista yhdistettä yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän laimennusaineen tai kantajan kanssa. Tällaiset koostumukset voidaan valmistaa konventionaaliseen tapaan.

Edullisia yhdisteitä farmaseuttista käyttöä ajatellen ovat yhdisteet, joilla on kaavat I', I'', X, XI, XII ja XIII.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat keksintöä:

25

ESIMERKIT

Esimerkki 1: Fermentointiesimerkki

Kannan NRRL 18919 siirrosteviljelmä siirrostetaan 2 l Erlenmeyer pulloon, joka sisältää 1 l steriiliä, nestemäistä väliainetta, joka koostuu 2 % malasuutteesta ja 0.4 % hiivauutteesta deionisoidussa vedessä. Erlenmeyer-pulloa inkuboidaan pyöröravistimessa, 200 rpm, 24 °C kolmen päivän ajan, ja se käytetään esikasvatuksena 50 l fermentoinnille. Tämä välikasvatus suoritetaan 75 l fermentorissa, joka sisältää 50 l steriiliä nestemäistä väliainetta, joka koostuu 2 %

mallasuutteesta ja 0.4 % hiivauutteesta deionisoidussa vedessä. Fermentoinnin aikana lämpötilaa pidetään vakiona, 25 °C, sekoittimen nopeutta 50 rpm, ilmastusta 50 l/min ja ylipainetta 0.5 bar. Esikasvatusfermentointi kestää ainoastaan yhden päivän, jonka jälkeen se käytetään siirrostamaan lopullinen, suurempimittakavainen fermentointi. Tämä tuotantokasvatus suoritetaan 5000 l fermentorissa, joka sisältää 3000 l steriiliä nestemäistä väliainetta, joka koostuu (g/l) 20 glukosista, 2 soijaproteiinista, 2 mallasuutteesta 2 hiivauutteesta, 2 KH₂PO₄ ja 2 MgSO₄ deionisoidussa vedessä. Ennen siirrostamista steriiliin väliaineeseen lisätään 1 mg/l syklosporiinia A:ta liuotettuna pieneen metanolitilavuuteen. Fermentoinnin aikana lämpötilaa pidetään vakiona 25 °C, sekoittimen nopeutta 25 rpm, ilmastusta 3000 l/min ja ylipainetta 0.5 bar. Liiallinen vaahtoaminen estetään lisäämällä kontrolloidusti vaahdonestoainetta. Keksinnön mukaisen yhdisteen tuottoa seurataan HPLC avulla ja tuotantokasvatus otetaan talteen ajankohtana, jolloin saadaan halutun metaboliitin korkeimmat tiitterit.

Esimerkki 2: Metaboliitin eristys

Myseeli erotetaan kasvatusliuoksesta ja supernatanttia (2800 l) uutetaan 2800 l etyyliasetaattia. Myseeli poistetaan. Etyyliasetaattiliuos haihnutetaan kuiviin vakuuissa 45 - 50 °C. Mielenkiinnon kohteena oleva yhdiste saadaan suoraan uutostjäänköksen kiteytyksellä liuottamalla uutostjäänkö (n. 1 kg) 5 l metanoliin, 60 °C, jäähdyttämällä saatu liuos nopeasti ja pitämällä sitä myöhemmin huoneenlämpötilassa 20 h ajan. Saadut kiteet (n. 250 g) erotetaan suodattamalla, uudelleenliuotetaan metanoliin, 75 °C, ja uudelleenki-
teytetään yön yli, -25 °C. Kiteet imusuodatetaan, pestään kylmällä metanolilla ja kuivataan vakuuissa. Tuote on [3S-(3R*, 5Z, 8R*, 9R*, 11E)]-3,4,9,10-tetrahydro-8,9,16-trihydroksi-13,14-dimetoksi-3-metyyli-

1H[2] bentsoksasyklotetradesin-1,7[8H]dioni ja se saadaan valkoisina neuloina, joilla on seuraavat ominaisuudet: sp. 170 - 172 °C, $[\alpha]_D^{20} = -43.1^\circ$ (c = 0.49, metanolissa).

5

Esimerkki 3: Kaavan I" mukaisen yhdisteen valmistus

Kaavan I" mukainen yhdiste, [3S-(3R*, 5E, 8R*, 9R*, 11E)]-3,4,9,10-tetrahydro-8,9,16-trihydroksi-13,14-dimetoksi-3-metyyli-1H-2-bentsoksasyklotetra-desin-1,7(8H)-dioni, valmistetaan seuraavasti.

Esimerkin 2 mukainen tuote (1 g) liuotetaan 100 ml pyridiiniin ja sekoitetaan argonatmosfäärissä 24 h ajan, 50 °C. Saatu keltainen liuos konsentroidaan vakuuissa ja jäännös otetaan etyyliasetaattiin ja sitä ravistellaan 1 N viinihapon kanssa. Orgaaninen faasi erotetaan, pestään keittosuolaliuoksella, kuivataan natriumsulfaatilla ja haihdutetaan. Kiinteä jäännös kromatografoidaan Kieselgel päällä käyttäen etyyliasetaattia liikkuvana faasina, jolloin saadaan kaavan I" mukaista yhdistettä, sp. 171 - 173 °C. NMR (CDCl₃): 1.47 (d, 3H), 2.25-2.85 (m, 4H), 3.60 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.17 (m, 1H), 4.65 (d, 1H), 5.40 (m, 1H), 5.93 (m, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.47 (d, 1H) 6.63 (dd, 1H), 7.00 (dt, 1H), 11.21 (s, 1H) ppm.

25

Esimerkki 4: Kaavan X mukaisen yhdisteen valmistus

Kaavan X mukainen yhdiste, [3S-(3R*, 5E, 8R*, 9R*, 11E)]-3,4,9,10-tetrahydro-8,9,16-trihydroksi-14-metoksi-3-metyyli-1H-2-bentsoksasyklotetradesin-1,7(8H)-dioni, saadaan analogisesti esimerkin 3 kanssa.

30

Sp. 154 - 159 °C.

Esimerkki 5: Kaavan XI mukaisen yhdisteen valmistus

Kaavan XI mukainen yhdiste, [3S-(3R*, 5E, 8R*, 9R*, 11E)]-3,4,9,10-tetrahydro-8,9-dihydroksi-13,14,16-trimetoksi-3-metyyli-1H-2-bentsoksasyklotetradesin-

35

1,7(8H)-dioni, saadaan vaahtona analogisesti esimerkin 3 kanssa ja sillä on seuraava NMR-spektri. NMR (CDCl₃): 1.4(d, 3H); 2.2-3.0(m, 5H); 3.61(s, 3H); 3.78(s, 3H); 3.83(s, 3H); 3.7-4.15(m, 2H); 4.75(d, 3H);
 5 2.2-3.0(m, 1H); 6.15(d, 1H); 6.31(d, 1H); 6.38(s, 1H); 7.85(m, 1H)ppm.

Esimerkki 6: Kaavan XIII mukaisen yhdisteen valmistus

a) Pent-1-en-5-oni

10 10 g (100 mMol) 5-hydroksipent-1-eenin ja 100 ml dikloorimetaanin liuos lisätään huoneenlämpötilassa suspensioon, joka sisältää 43 g pyridiniumkloorikromaattia ja dikloorimetaania. Saatuun suspensioon lisätään 1 1/2 h kuluttua dietyylieetteriä, suspensio suodatetaan käyttäen silikageeliä, kiinteä jäännös pestään useita kertoja dietyylieetterillä, joka myös suodatetaan käyttäen silikageeliä, ja etyylieetterifraktiot yhdistetään ja haihdutetaan hitaasti, jolloin saadaan 7 g raakaa pent-1-en-5-onia.

20 b) 4-trimetyylisiloksiheks-1-yyini

Seosta, joka sisältää 8.1 g 4-hydroksiheks-1-yyiniä, 16 g t.butyylidimetyylisilylikloridia ja 7.2 g imidatsolia sekä 100 ml asetonitriiliä, sekoitetaan yön yli huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen lisätään dietyylieetteriä ja suspensio suodatetaan käyttäen silikageeliä. Suodosliuos haihdutetaan ja jäännös tislataan vesipumppuvakuuissa, 70 °C, jolloin saadaan 17.8 g (93%) otsikon mukaista yhdistettä.

30 c) 2-trimetyylisiloksi-7-hydroksi-undeka-4-yn-10-eeni

Butyylilitiumin liuos (37 ml) lisätään tipoit-
 tain -78 °C lämpötilassa liuokseen, joka sisältää 13.8 g edellä olevan kohdan b) mukaista tuotetta ja 20 ml tetrahydrofuraania, ja saatua seosta sekoitetaan -78
 35 °C, 1 1/2 h. Joukkoon lisätään tämän jälkeen hitaasti 6.0 g edellä olevan kohdan a) mukaisen aldehydituotteen 10 ml tetrahydrofuraaniliuosta, seosta sekoitetaan -78

°C 1 h ajan, jonka jälkeen sen annetaan lämmetä huoneenlämpötilaan. Joukkoon lisätään vettä, seos uutetaan etyyliasetaatilla ja orgaaninen faasi kuivataan, suodattetaan ja haihdutetaan, jolloin saadaan 13.1 g (72%)
 5 otsikon mukaista tuotetta epäpuhtaassa muodossa.

d) 2-trimetyyllisiloksi-7-hydroksi-undeka-cis-4,10-dieeni

10.1 g edellä olevan kohdan c) mukaisen tuotteen 300 ml pyridiiniliuokseen lisätään 1 g 10% palladium BaSO_4 :ssa ja seos hydrataan huoneenlämpötilassa. 24
 10 h kuluttua vetyä on kulunut 420 ml ja edelleen 24 h kuluttua vetyä on kulunut 720 ml. Sitten seos imusuodattetaan käyttäen Hyfloa katalyytin poistamiseksi, tuote konsentroidaan, liuotetaan etyyliasetaattiin, sitä
 15 pestään 10% sitruunahappoliuoksella ja kyllästetyllä keittosuolaliuoksella, kuivataan Na_2SO_4 avulla ja konsentroidaan. Tässä vaiheessa ohutlevykromatografia kuitenkin osoittaa, että vain 15% lähtöaineesta on konvertoitunut. Tämän vuoksi tuote uudelleenliuotetaan 300 ml
 20 pyridiiniin ja joukkoon lisätään 1.5 10% palladium BaSO_4 :ssa ja seosta hydrataan sekoituksen alaisena huoneenlämpötilassa. Nyt havaitaan, että jo 6 h kuluttua vetyä on kulunut 700 ml. Tuotteen (10.2 g) havaitaan olevan n. 90% konvertoitunut, kun tarkastelu suoritetaan ohutlevykromatografisesti.
 25

e) 2-trimetyyllisiloksi-7-((2-metoksi)etoksi)metoksi-undeka-cis-4,10-dieeni

10 g edellä olevan vaiheen d) otsikon mukaista tuotetta liuotetaan 80 ml dikloorimetaaniin sekoittaen
 30 huoneenlämpötilassa ja joukkoon lisätään 1 min kuluessa 8.5 ml di-isopropylietyyliamiinia, ja tämän jälkeen tipoittain 10 min kuluessa 5.7 ml 1-kloorimetyyli-2-metyyli-glykolin 20 ml dikloorimetaaniliuosta. Reaktio on mennyt loppuun 2 h kuluttua, kun tarkastelu suoritetaan ohutlevykromatografisesti. Reaktioseosta pestään
 35 10% NaHCO_3 , 10% sitruunahappoliuoksella ja kyllästetyllä keittosuolaliuoksella, se kuivataan Na_2SO_4 avulla ja

konsentroidaan, jolloin saadaan 14 g otsikon mukaista tuotetta raakatuotteena. Tuote puhdistetaan silikageelikromatografian avulla (heksaani/dietyylieetteri 8:1), jolloin saanto on 10.5 g (83%).

- 5 f) Kaavan IV mukainen yhdiste, jossa R_4 on H, R_5 ja R_6 ovat MeO, -a-b- on cis- $-\text{CH}=\text{CH}-$, -d-e- on $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ja -f-g- on trans $-\text{CH}=\text{CH}-$

90 ml trietyyliamiinia sekoitetaan argonatmosfäärissä ja siihen lisätään 7.5 g kaavan V mukaista yhdistettä, jossa R_4 on H, R_5 ja R_6 ovat MeO ja R_{12} in Me, ja sitten 10.8 g edellä olevasta vaiheesta e) saatua tuotetta, 0.104 g palladiumdiasetaattia, 0.564 g tri o-tolyylifosfiinia ja 3.9 g hopea-asettaattia. Seos lämmitetään 80 °C lämpötilaan sekoituksessa öljyhauteessa ja 15 60 h kuluttua lisätään vielä 0.104 g palladiumdiasetaattia ja 0.564 g tri o-tolyylifosfiinia ja reaktion annetaan jatkua vielä 48 h, jona aikana reaktio menee loppuun ohutlevykromatografisesti todettuna. Tuoteseos konsentroidaan, sitä käsitellään etyyliasetaatilla ja se poistetaan liukenemattomasta jäänteestä imemällä Hyflon läpi. Liuos konsentroidaan ja 20 trimetyylisiloksi/ R_{12} on Me -välituote puhdistetaan silikageelikromatografisesti (heksaani/etyyliasetaatii 4:1), jolloin saannoksi tulee n. 14 g.

25 5.1 g NaOH liuotetaan 50 ml DMSO-liuokseen ja 30 ml veteen, joukkoon lisätään 7.44 g edellä esitettyä välituotetta ja seosta kuumennetaan 100 °C lämpötilassa 4 h ajan öljyhauteessa sekoittaen. Seos jäähdytetään, laimennetaan vedellä, sitä pestään kolme kertaa eetterillä, jäähdytetään jäällä ja pH sovitetaan arvoon pH 3 30 2N HCl avulla. Tämän jälkeen tuotetta uutetaan kolme kertaa etyyliasetaatilla, pestään kahdesti kyllästetyllä keittosuolaliuoksella, kuivataan Na_2SO_4 avulla, konsentroidaan ja kuivataan korkeavakuumissa, jolloin 35 saadaan 6 g otsikon mukaista tuotetta (m/z: 453(MH⁺), 348(60), 329(100), 285(60), 207(60).

- g) Kaavan XIII mukainen yhdiste

5.4 g edellä olevan vaiheen f) tuotetta lisätään 3.5 l tetrahydrofuraaniin huoneenlämpötilassa sekoituksessa, joukkoon lisätään 18.7 ml dietyyliatso-dikarboksylaattia ja tämän jälkeen 31.3 g trifenyylifosfiinia ja seos lämmitetään 50 °C lämpötilaan öljyhauteessa ja sen annetaan reagoida yön yli. Tuoteseos konsentroidaan ja jäännös puhdistetaan käyttäen 2 Al₂O₃ pylväitä ja eluutioon heksaani/etyyliasettaattia (2:1). Ensimmäisestä pylvästä saadut fraktiot 6-1 ja toisesta pylvästä saadut fraktiot 7-20 tuottavat yhteensä 5 g raakatuotetta, joka puhdistetaan edelleen silikageelikromatografisesti saaden 3.2 g (62%) puhdasta hartsi-
 10 maista välituotetta, joka on tuote, joka vastaa kaavan XIII mukaista yhdistettä, jossa c on CH-OCH₂-O-CH₂-CH₂-
 15 OCH₃ suojatussa muodossa.

Tämä välituote konvertoidaan toiseksi välituotteeksi, jossa c on CHOH, happokäsittelyn avulla. 5.2 g edellä mainittua välituotetta liuotetaan 12 ml tetrahydrofuraaniin, joukkoon lisätään 10 ml 1N HCl ja seosta sekoitetaan 45 °C 24 h ajan, jonka jälkeen sitä
 20 uutetaan kolme kertaa etyyliasetaatilla ja pestään kyllästetyllä keittosuola- ja NaHCO₃-liuoksella. Etyyliasetaatifaasit kuivataan Na₂SO₄ avulla, konsentroidaan ja puhdistetaan silikageelikromatografisesti (heksaani/etyyliasetatti 1:1), jolloin saadaan n. 3.4 g tahmeaa toista välituotetta.

2 ml dikloorimetaania sekoitetaan huoneenlämpötilassa, joukkoon lisätään 76 µl oksalylikloridia, seos jäädytetään -60 °C lämpötilaan ja 0.13 ml DMSO ja
 30 1 ml dikloorimetaanin liuos lisätään tipoittain 3 min aikana. Tätä seuraavan kaasun muodostuksen annetaan edetä 3 min ajan, jonka jälkeen joukkoon lisätään 280 mg edellä mainittua toista välituotetta ja 3 ml dikloorimetaaniliuosta tipoittain 5 min aikana sakan muodostuessa. Seosta sekoitetaan vielä 15 min, jonka jälkeen
 35 0.56 ml trietyyliamiinia lisätään joukkoon 5 min aikana tahnan saostuessa, jonka tahnan annetaan lisääntyä

huoneenlämpötilassa. Tahnaa uutetaan dikloorimetaanilla, orgaanisia faaseja pestään kahdesti 10 % sitruunahapolla, kahdesti kyllästetyllä keittosuolaliuoksella, kuivataan Na_2SO_4 avulla, konsentroidaan ja puhdistetaan silikageelikromatografisesti (dikloorimetaani), jolloin saadaan kaavan XIII mukaista tuotetta puhtaassa muodossa. Puhdas tuote omaa seuraavat ominaisuudet: sp. (m. pt.) 159°C ; m/z: 344(M⁺), 217(80), 189(60), 178(100), 95(60).

10

Esimerkki 7: Kaavan XII mukaisen yhdisteen valmistus

a) Kaavan XII mukaisen yhdisteen analogi, jossa c on $\text{CH-OCH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$

2.9 g jodia ja 0.55 g magnesiumia lisätään 20 ml dietyylieetteriin ja seosta sekoitetaan, kunnes eksoterminen reaktio on mennyt loppuun ja ruskea väri kadonnut. 11 g saatua liuosta saatetaan ruiskuun ja lisätään tiipoittain 10 min aikana liuokseen, joka sisältää 1.64 g edellä esimerkin 6 vaiheen g) mukaista ensimmäistä välituotetta ja bentseeniä. Muodostuu keltaista sakkaa ja seosta lämmitetään 80°C lämpötilassa öljyhauteessa ja sitä sekoitetaan 1 1/2 h tässä lämpötilassa, jonka jälkeen sekoitusta jatketaan yön yli huoneenlämpötilassa. Tuotetta uutetaan kahdesti etyyliasetaatilla, sitä pestään NaCHO_3 ja kyllästettyä keittosuolaliuosta käyttäen, se kuivataan Na_2SO_4 avulla, konsentroidaan ja puhdistetaan silikageelikromatografisesti (heksaani/etyyliasetatti 7:3), jolloin saadaan 1.6 g otsikon mukaista tuotetta puhtaassa muodossa.

30

b) Kaavan XII mukaisen yhdisteen analogi, jossa c on CHOH

510 mg tämän esimerkin vaiheen a) tuotetta liuotetaan 12 ml tetrahydrofuraaniin, 10 ml 1 N HCl lisätään joukkoon ja seosta sekoitetaan 45°C 24 h ajan. Tuoteseosta uutetaan kolme kertaa etyyliasetaatilla, se pestään kyllästetyllä keittosuolaliuoksella ja NaHCO_3 . Etyyliasetattifaasit kuivataan Na_2SO_4 avulla,

konsentroidaan ja puhdistetaan silikageelikromatografi-
sesti (heksaani/etyyliasetatti 1:1), jolloin saadaan
330 mg tahmeaa otsikon mukaista tuotetta (m/z : 332(M+),
314(10), 203(75), 190(55), 164(60)).

5 c) Kaavan XII mukainen yhdiste

280 mg vaiheen b) tuotetta liuotetaan 10 ml
dikloorimetaaniin sekoituksessa huoneenlämpötilassa,
joukkoon lisätään 475 mg pyridiinidikromaattia ja seos-
ta sekoitetaan yön yli huoneenlämpötilassa. Tämän jäl-
10 keen seokseen lisätään vielä 158 mg pyridiniumdikro-
maattia ja seosta sekoitetaan jälleen yön yli sekä
vielä 24 h huoneenlämpötilassa. Saatu tuoteliusu erotet-
taan kiinteästä sivutuotteesta suodattamalla Hyflon
läpi ja puhdistetaan kromatografisesti (eluutio dikloo-
15 rimetaanilla), jolloin saadaan otsikon mukaista yhdis-
tettä puhtaassa muodossa (sp. (m. pt.) 137 °C; m/z :
330(M+), 312(20), 202(100), 175(75)).

Esimerkki 8: Kaavan I mukainen yhdiste, jossa R_4 on H,
20 R_5 ja R_6 on OMe, -a-b- on cis -CH=CH-, c on C=O ja -d-e-
ja -f-g- ovat -CH₂-CH₂-

a) 4-dimetyyli, t-butylyli-silyylioksi-pent-1-
yyni

17.8 g ($\pm$)-4-pentyn-2-olia liuotetaan 150 ml
asetonitriiliin sekoituksessa huoneenlämpötilassa,
25 joukkoon lisätään 15.8 g imidatsolia ja sitten 35 g
dimetyyli, t butylyli-silyylikloridia, jolloin tapahtuu
eksoterminen reaktio, jolloin reaktioseoksen kaikki
komponentit menevät aluksi liuokseen, mutta myöhemmin
30 saostumaa muodostuu välittömästi. Seosta sekoitetaan
yön yli huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen se imusuoda-
tetaan, liuosfraktio konsentroidaan ja joukkoon lisä-
tään vielä 2.9 g imidatsolia ja 6.3 g dimetyyli, t
butylyli-silyylikloridia. 3 h kuluttua reaktioseos jäl-
35 leen imusuodatetaan ja konsentroituu liuosfraktio jako-
tislataan. Otsikon mukainen yhdiste on kolmessa ensim-
mäisessä jakessa, jotka yhdistetään ja tuote puhdiste-

taan tislaamalla alipaineessa (12 mm Hg), 64-68 °C.

b) Kaavan VII mukainen tuote, jossa R_4 on H, R_5 ja R_6 ovat OMe ja R_{12} on Me

14.6 g vastaavaa kaavan V mukaista yhdistettä,
 5 4.16 g tämän esimerkin vaiheen a) tuotetta, 0.3 g palladiumdiasetaattia, 1.1 g tri o-tolyylifosfiinia ja 7.6 g hopea-asetaatia lisätään 60 ml tetrahydrofuraaniin ja seos lämmitetään sekoittamalla 70 °C lämpötilaan öljyhauteessa. 48 h kuluttua, jona aikana reaktio on
 10 ohutlevykromatografian mukaan mennyt n. 70 % loppuun, lisätään vielä 0.3 g palladiumdiasetaattia ja 1.1 g tri o-tolyylifosfiinia ja seosta lämmitetään viikolopun yli 70 °C. Tämän jälkeen seos imusuodatetaan Hyfloa käyttäen, konsentroidaan korkeavakuuissa ja puhdistetaan
 15 silikageelikromatografisesti (heksaani/etyyliasetatti 4:1), jolloin saadaan ensimmäistä välituotetta, so. vastaavan kaavan VII mukaisen yhdisteen analogia, jossa R_6 = OMe, R_5 = OMe, R_4 = H, R_{12} = Me ja C_6 sivuketjun aldehydiryhmä on dimetyyli, t-butyli-silyyli-suojattu
 20 OH-ryhmä.

6.7 g tätä ensimmäistä välituotetta liuotetaan 100 ml metanoliin, joukkoon lisätään 500 mg palladium/hiilikatalyyttiä, joka sisältää 10 % palladiumia (Pd/C) 10%) ja seosta hydrataan sekoituksessa 48 h ajan
 25 (350 ml H_2 kulunut ensimmäisen 24 h aikana). Sitten reaktioseos imusuodatetaan Hyfloa käyttäen ja konsentroidaan; jolloin havaitaan, että tässä vaiheessa NMR mukaan C_6 sivuketjun kaksoissidos on pelkistynyt vain 30%. Siten reaktiotuote liuotetaan 150 ml metanoliin,
 30 joukkoon lisätään 500 mg Pd/C 10% katalyyttiä ja seosta hydrataan viikonlopun yli huoneenlämpötilassa. Saatu reaktioseos imusuodatetaan Hyfloa käyttäen, konsentroidaan ja toinen välituote, so. vastaavan kaavan VII mukaisen yhdisteen analogi, jossa aldehydiryhmä C_6
 35 sivuketjussa on OH-ryhmä, erotetaan vastaavasta siloksisuojatusta yhdisteestä silikageelikromatografiaa käyttäen (heksaani/etyyliasetatti 2:1), jolloin saan-

noksi saadaan 4.9 g.

1.2 ml oksalylikloridia lisätään 30 ml dikloorimetaaniin sekoituksessa huoneenlämpötilassa, seos jäädytetään -60°C lämpötilaan ja joukkoon lisätään
 5 tipoittain 5 min aikana 1.9 ml DMSO ja 7 ml dikloorime-
 taanin liuos, jonka jälkeen seosta sekoitetaan vielä 3
 min ja liuos, joka sisältää 3.5 g tämän esimerkin
 toista välituotetta ja 20 ml dikloorimetaania, lisätään
 joukkoon tipoittain 10 min aikana. Muodostuu saostuma.
 10 Seosta sekoitetaan vielä 20 min, se konsentroidaan ja
 joukkoon lisätään 8.2 ml trietyyliamiinia 5 min aikana.
 Muodostuu paksu tahnamainen saostuma, jonka annetaan
 lisääntyä huoneenlämpötilassa 1.5 ajan. Kiinteää tuo-
 tetta uutetaan dikloorimetaanilla, sitä pestään kahdes-
 15 ti 10 % sitruunahappoliuoksella, kerran kyllästetyllä
 keittosuolaliuoksella ja NaHCO_3 , se kuivataan Na_2SO_4
 käyttäen ja konsentroidaan, jolloin saadaan 3.6 g otsi-
 kon mukaista tuotetta kumimaisessa muodossa.

c) Kaavan IV mukainen tuote, jossa R_4 on H, R_5
 20 ja R_6 ovat OMe, -a-b- on cis $-\text{CH}=\text{CH}-$, -d-e- ja -f-g-
 ovat $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ja R_{11} on H

0.39 g tämän esimerkin vaiheen a) tuotetta
 lisätään 5 ml tetrahydrofuraaniin tyypiatmosfäärissä,
 joukkoon lisätään tipoittain 2 min aikana, -70°C , 1.2
 25 ml butyyllilitiumia. 1 h kuluttua joukkoon lisätään ti-
 poittain 5 min aikana liuosta, joka sisältää 0.5 g
 tämän esimerkin vaiheen b) lopputuotetta ja 4 ml tetra-
 hydrofuraania, saatua seosta sekoitetaan -70°C 1.5 h
 ajan, jonka jälkeen sen annetaan lämmetä huoneenlämpö-
 30 tilaan. Tässä vaiheessa reaktio on mennyt ohutlevykro-
 matorgrafian mukaan loppuun. Jääjäädytyksessä tuotetta
 pestään 10% sitruunahappoliuoksella, uutetaan kolme
 kertaa etyyliasetaatilla, pestään kyllästetyllä keit-
 tosuolaliuoksella ja NaHCO_3 , kuivataan Na_2SO_4 avulla ja
 35 konsentroidaan, jolloin saadaan 0.87 g hartsimaista
 ensimmäistä välituotetta, so. vastaavan kaavan IV mu-
 kaisen yhdisteen analogia, jossa COOH-substituentti on

metoksiesterin muodossa, sidos, joka vastaa kaavan I mukaisen yhdisteen -a-b- sidosta on asetyleenisidos ja OH-substituentti C_{11} sivuketjun C_{10} hiiliatomissa on t-butyyli-silyyli-suojattu.

- 5 3.1 g tätä ensimmäistä välituotetta liuotetaan 50 ml pyridiiniin, 200 mg 10% Pd/BaSO₄ lisätään ja seosta hydrataan huoneenlämpötilassa magneettisekoitus-
 sessa. 4 h kuluttua vetyä on kulunut enemmän kuin teoreettinen tarve (240 ml). Saadusta tuotteesta otetaan
 10 näyte, se konsentroidaan, liuotetaan dikloorimetaaniin ja pestään 10 % sitruunahappoliuoksella (tässä vaiheessa reaktio on mennyt NMR mukaan loppuun). Tuote erotetaan katalyytistä imusuodatuksella käyttäen Hyfloa, se konsentroidaan, otetaan etyyliasetaattiin, pestään
 15 kyllästetyllä keittosuolaliuoksella, kuivataan Na₂SO₄ avulla ja konsentroidaan, jolloin saadaan 3.05 g hartsimaista toista välituotetta, so. tämän vaiheen ensimmäisen välituotteen analogia, jossa sidos, joka vastaa kaavan I mukaisen yhdisteen -a-b- sidosta, on cis
 20 -CH=CH-.

Analogisesti esimerkin 6 vaiheen f) kanssa tämän vaiheen toinen välituote konvertoidaan otsikon mukaiseksi tuotteeksi (m/z: 367(MH⁺), 349(40), 331(100), 305(90), 191(100)).

- 25 d) Kaavan I mukainen yhdiste, jossa R_4 on H, R_5 ja R_6 ovat OMe, -a-b- on cis -CH=CH-, c on C=O ja -d-e- ja -f-g- ovat -CH₂-CH₂-

- 1.7 g edellä olevan vaiheen c) lopputuotetta liuotetaan sekoituksessa 1.8 l asetoniitriiliin, joukkoon lisätään 5.9 g 2-klooripyridiinijodidia ja 6.5 ml trietyyliamiinia ja saatua seosta lämmitetään viikonlopun yli 50 °C lämpötilaan öljyhauteessa sekoituksessa. Tämän jälkeen tuote konsentroidaan, otetaan etyyliasetaattiin, sitä pestään 10% sitruunahappoliuoksella
 30 NaHCO₃ ja kyllästetyllä keittosuolaliuoksella, se kuivataan Na₂SO₄ avulla ja konsentroidaan, jolloin saadaan 1.6 g raakaa välituotetta (so. otsikon mukaisen tuot-

teen analogia, jossa c on CHOH) ruskean hartsin muodossa. Tämä raakatuote puhdistetaan silikageelikromatografisesti (heksaani/etyyliasetatti 3:2) käyttäen dikloorimetaania liuottamaan välituote.

- 5 Huoneenlämpötilassa olevaan 2 ml dikloorimetaaniin lisätään 5 μ l oksalyylikloridia, seos jäädytetään -70°C lämpötilaan ja joukkoon lisätään tipoittain 3 min aikana sekoituksessa liuosta, joka sisältää 93 μ l DMSO ja 1 ml dikloorimetaania. Seosta sekoitetaan vielä
- 10 5 min, jonka jälkeen joukkoon lisätään tipoittain 5 min aikana liuosta, joka sisältää 0.2 g tämän vaiheen välituotetta. Muodostuu saostumaa. Seosta sekoitetaan vielä 15 min, sitten joukkoon lisätään tipoittain 5 min aikana 0.4 ml trietyyliamiinia, seosta sekoitetaan 1 h ajan
- 15 -70°C , jonka jälkeen sen annetaan lämmetä huoneenlämpötilaan 1 h aikana. Saatu tuoteseos laimennetaan dikloorimetaanilla se pestään kahdesti 10 % sitruunahappoliuoksella, kerran kyllästetyllä keittosuolaliuoksella, se kuivataan Na_2SO_4 avulla, konsentroidaan ja puhdistetaan silikageelikromatografisesti ja uudelleenki-
 20 teytetään, jolloin saadaan n. 100 mg puhdasta tuotetta (sp. (m. pt.) 110°C).

Esimerkki 9: Kaavan I mukainen yhdiste, jossa R_4 ja R_6 ovat H, R_5 on OMe, -a-b- on trans $-\text{CH}=\text{CH}-$, c on $\text{C}=\text{O}$ ja -d-e- ja -f-g- ovat $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

- 25 35 mg magnesiumia sekoitetaan 1 ml dietyylietterin ja 1 ml bentseenin kanssa ja joukkoon lisätään 0.18 g jodia, jolloin tummanruskea väri häviää 1.5 h kuluttua. Saadun seoksen nestefaasi lisätään liuokseen, joka sisältää 50 mg esimerkin 6 lopputuotetta ja 2 ml bentseeniä, jolloin muodostuu saostumaa. Seosta sekoitetaan 60°C 2.5 h ajan, tuote otetaan etyyliasetattiin, sitä pestään 1 N HCl, kyllästetyllä NaHCO_3 ja
- 30 kyllästetyllä keittosuolaliuoksella, se kuivataan Na_2SO_4 avulla, konsentroidaan ja puhdistetaan silikageelikromatografisesti (toluleeni/metanoli 98:2). Tuote puhdiste-

taan edelleen silikageelipylväässä (heksaani/etyyliasettaatti 3:2), jolloin saadaan n. 30 mg puhdasta otsikon mukaista tuotetta öljyn muodossa (m/z : 333 (MH⁺), 315(80), 265(100), 177(90)).

5

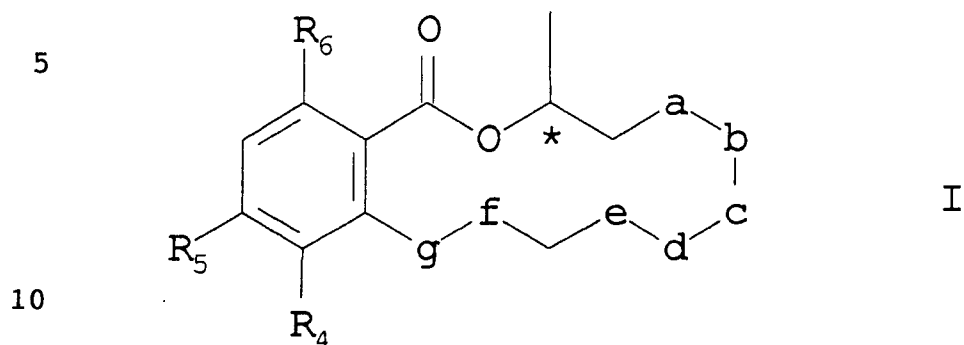
Esimerkki 10: Kaavan I mukainen yhdiste, jossa R_4 on H, R_5 ja R_6 ovat OMe, -a-b- on trans -CH=CH-, c on C=O ja -d-e- ja -f-g- ovat -CH₂-CH₂-

- Analogisesti esimerkkien 3 ja 9 kanssa valmistetaan otsikon mukainen tuote vastaavasta tuotteesta, jossa -a-b- on cis -CH=CH-, so. esimerkin lopputuotteesta isomeroimalla -a-b- sidos. Otsikon mukainen tuote saadaan öljyn muodossa (m/z : 346(M⁺), 205(50), 191(100), 178(40), 152(40), 95(55)).

15

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Kaavan I mukainen yhdiste,



jossa R_4 ja R_6 ovat samoja tai erilaisia ja ovat H, OH, C_{1-4} alkoksi tai C_{1-4} alkyyli COO-,

R_5 on OH, C_{1-4} alkoksi tai C_{1-4} alkyyli COO-,

15 yksi, -a-b- tai -d-e-, on -CHR₇-CHR₈- ja toinen on cis- tai trans- -CR₇=CR₈-, jolloin R_7 ja R_8 ovat samoja tai erilaisia ja ovat H, OH, C_{1-4} alkoksi tai C_{1-4} alkyyli COO-, c on CH-OH tai C=O ja

-f-g- on -CH₂-CH₂- tai cis- tai trans- -CH=CH-,

20 ehdolla, että kun R_4 on H, R_6 on OH ja -f-g- on trans- -CH=CH-; 1. R_5 ei ole OH, kun -a-b- on -CH₂-CH₂-, c on C=O ja -d-e- on -CH₂-CH₂-, tai 2. R_5 ei ole metoksi, kun -a-b- on -CH₂-CH₂- tai cis- -CH=CH- ja c on C=O tai CH-OH ja -d-e- on -CHOH-CHOH,

25

vapaassa muodossa tai emässuolan muodossa tai fysiologisesti hydrolysoituvan ja fysiologisesti hyväksyttävän esterin muodossa, ja jossa * merkitty asymmetrinen hiili ja atomit a ja/tai b tai d ja/tai e, näiden ollessa asymmetrisiä hiiliatomeja, ovat R- tai S-konfiguraatiossa tai yhdiste käsittää sen optisten isomeerien minkä tahansa seoksen.

2. Kaavan I mukainen yhdiste, jossa R_4 on H tai metoksi, R_5 on metoksi, R_6 on OH, -a-b- on cis- tai trans- -CH=CH-, c on CHOH tai C=O, -d-e- on -CHOH-CHOH- ja -f-g- on trans- -CH=CH-; ehdolla, että kun -a-b- on cis- -CH=CH-, niin R_4 on metoksi ja c on C=O, vapaassa

35

muodossa tai emässuolan muodossa tai fysiologisesti hydrolysoituvan tai fysiologisesti hyväksyttävän esterin muodossa.

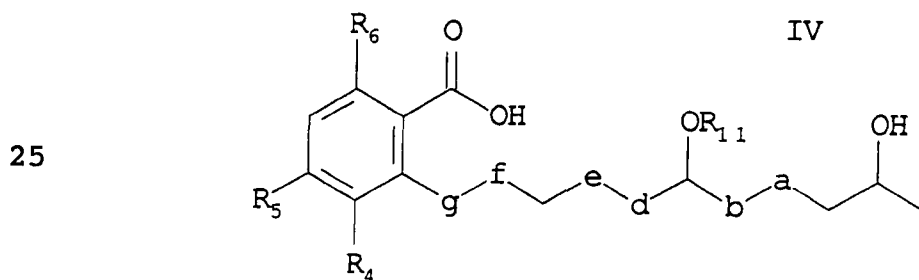
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen yhdiste, jossa a-b on trans- -CH=CH-, ja jossa asymmetriset hiiliatomit ovat kaikki S-konfiguraatiossa.

4. Edellä määritellyn kaavan I', I'', X, XI, XII tai XIII mukainen yhdiste.

5. Menetelmä kaavan I' mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä kasvatetaan 87-250904-F1-tuottavaa sienikantaa ja eristetään muodostunut metaboliitti 87-250904-F1.

6. Menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa yhdisteessä a-b on trans- -CH=CH-, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä isomeroidaan vastaava cis-isomeeri heikosti alkalisisissa olosuhteissa.

7. Menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa yhdisteessä c on CHOH, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä syklistetään yhdiste, jolla on kaava IV,



30 jossa R_4 , R_5 , R_6 , -a-b-, -d-e- ja -f-g- tarkoittavat samaa kuin patenttivaatimuksessa 1, poikkeuksella että -a-b:ssä tai -d-e:ssä mahdollisesti olevat OH substituentit ovat sopivasti suojatussa muodossa, ja R_{11} on H tai OH suojaryhmä; ja poistetaan yhdisteessä mahdollisesti oleva OH suojaryhmät.

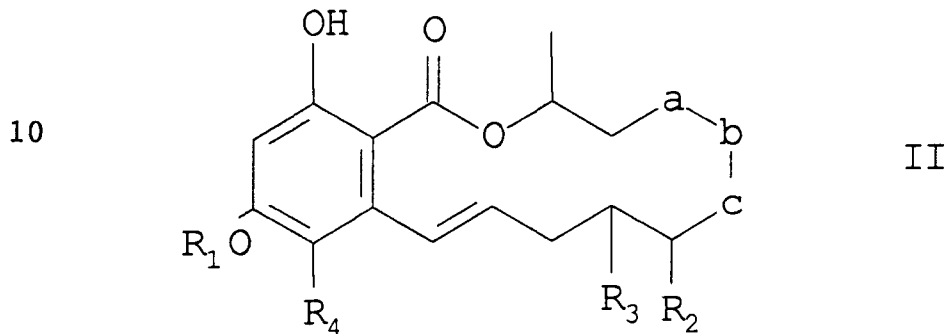
35

8. Menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa yhdisteessä c on C=O, t u n n e t t u

t u siitä, että menetelmässä hapetetaan c CHOH ryhmä
kaavan I mukaisesta yhdisteestä, jossa c on CHOH.

9. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u
siitä, että koostumus sisältää vaikuttavan määrän

- 5 a) patenttivaatimuksen 1 mukaista yhdistettä; tai
b) yhdistettä, jolla on kaava II,



15 jossa

R_1 on H tai metyyli;

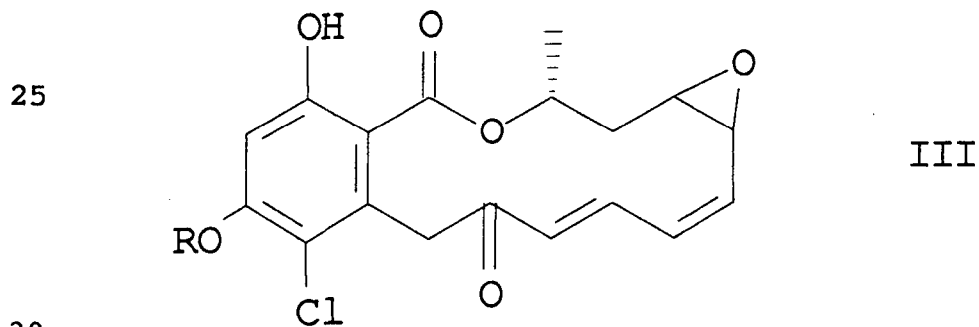
R_2 ja R_3 ovat H tai OH,

R_4 on H tai metoksi;

-a-b- on $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ tai $-\text{CH}=\text{CH}-$

20 ja c on $\text{C}=\text{O}$ tai $\text{CH}-\text{OH}$ (muu kuin patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste); tai

c) yhdistettä, jolla on kaava III,



30

jossa R on H tai metyyli;

vapaassa muodossa tai emässuolan muodossa tai sen fy-
siologisesti hydrolysoituvaa ja fysiologisesti hyväk-
syttävää esteriä.

35 10. Kaavan II mukainen yhdiste, joka on määri-
telty patenttivaatimuksessa 9, jossa:

R_1 on metyyli;

R_2 ja R_3 ovat H tai OH,

R_4 on H tai metoksi;

-a-b- on $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ tai cis- $-\text{CH}=\text{CH}-$;

ja c on C=O tai CH-OH;

- 5 vapaan emäksen muodossa tai suolan muodossa, tai sen fysiologisesti hydrolysoituvan ja fysiologisesti hyväksyttävän esterin muodossa käytettäväksi farmaseuttisena aineena.

11. Sienikannan NRRL 18919 puhdasviljelmä.

FIG. 1



