NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **303450** (13) B1

(51) Int Cl[6] C 07 J 41/00, 9/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19903999	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	13.09.1990		
(24) Løpedag	13.09.1990	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	15.03.1991	(30) Prioritet	14.09.1989, DE, 3930696
(45) Meddelt dato	13.07.1998		

(73) Patenthaver Hoechst AG, D-65926 Frankfurt am Main, DE
(72) Oppfinner Werner Kramer, Mainz, DE
Günther Wess, Erlensee, DE
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive gallesyrederivater**

(56) Anførte publikasjoner EP 232788, EP 105404, US 2441129, US 3937815, US 4418059
Niculescu-Duvas et al., Journal f. prakt. Chemie, page 522-528 (1979)

(57) Sammendrag

Gallesyrederivater med formelen

W - X - G,

der G er en gallesyrerest, W en virkestoffdel til et medikament og X er et bindeledd mellom gallesyreresten og virkestoffdelen, egner seg fremragende til innbringelse av virkestoffer i det enterohepatiske kretsløp. Forbindelsene I blir resorbert og kommer fram i blodbanen. Derfor er det mulig, under utnyttelse av den naturlige tilbakeresorpsjon av gallesyrene å oppnå en forbedret resorpsjon for ikke- eller dårlig resorberbare farmaka.

W kan for eksempel være et peptid, et antibiotikum, en antiviral substans, et kreftmiddel, et leverbeskyttelsesmiddel, et antihyperlipidemikum, et diuretikum, en blodtrykksenker, en reninhemmer, en substans til behandling av leverzirrhose eller en substans til behandling av diabetes.

G betyr en gallesyrerest i form av fri naturlig eller kjemisk modifiserte syrer, ester og amid, saltformen såvel som en alkoholgruppe-derivatisert form.

X kan være en lang rekke mellomledd eller også en binding.

Oppfinnelsen angår en analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive gallesyrederivater.

Den orale tilsetningen av legemidler er den vanligste og mest bekvemme typen legemiddelanvendelse. Da kommer imidlertid virkestoffet inn i blodbanen, og det må foregå en resorpsjonsprosess i mage-tarm-systemet. Deretter fordeler legemiddelet seg i kroppen tilsvarende sine spesifikke egenskaper. En lang rekke legemiddelstoffer blir bare meget dårlig eller praktisk talt ikke resorbert, slik at en oral anvendelse ikke er mulig.

Det er kjent at ved kobling av ikke-resorberbare farmaka til Vitamin B12 kan det bli oppnådd et enteralt opptak av dette farmaka (Proceed. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 15 (1988) Controlled Release Society Inc., se PCT/AU 86/0299).

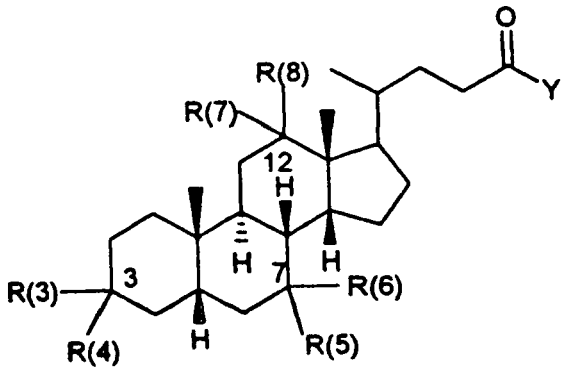
På grunn av den meget lave kapasiteten til denne opptaksveien over Vitamin B12 kan derfor bare meget små mengder farmasøytiske midler bli innbragt i kroppen.

Det er nå funnet gallesyrederivater som kan bli anvendt dertil, og gjøre vanskelig- eller ikke resorberbare virkestoffer resorberbare og dermed muliggjøre oral anvendelse av disse stoffene også i høyere doser. Videre kan man med gallesyrederivatene oppnå en leverspesifikk virkning av virkestoffene.

Oppfinnelsen angår en analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive gallesyrederivater med formelen I

W - X - G I

bestående av en modifisert gallesyrerest G:



G

hvor R(3) - R(8) er like eller forskjellige og har følgende betydning:

en binding til W-X-, hvori det samlet kan være bundet inntil to W-X-enheter,
R(3) og R(4), R(5) og R(6), R(7) og R(8) sammen med oksygen betyr en karbonylgruppe,

H, -SL, -NHL, $-NL_2$, -S-C-L, -NH-C-L, -O-P-OL, -O-S-OL,

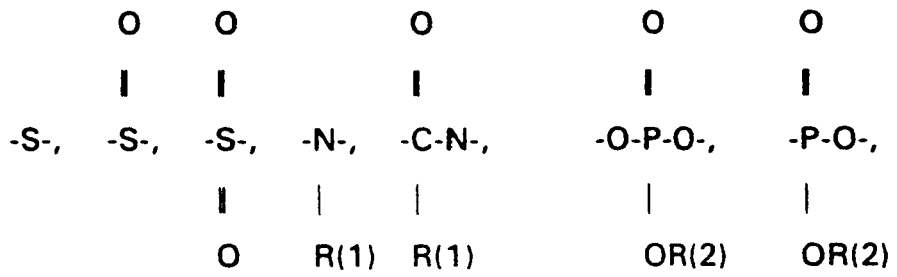
(-S-C-L: O; -NH-C-L: O; -O-P-OL: O, OL; -O-S-OL: O, O)

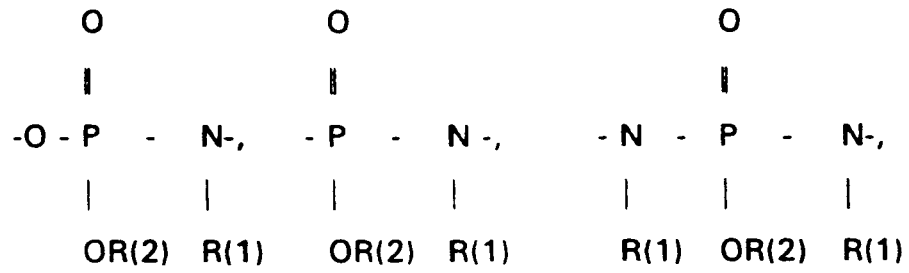
-L, hvori L betyr:

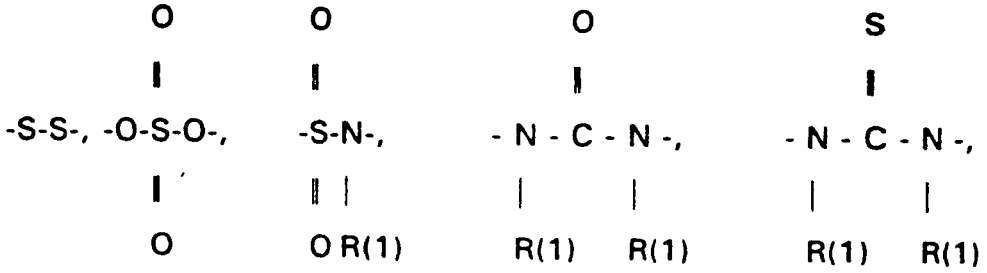
H, en mettet eller umettet alkylrest med 1-10 C-atomer, som er forgrenet eller uforgrenet, cykloalkyl med 3-8 C-atomer, en fenylrest (som er usubstituert eller substituert 1-3 ganger med F, Cl, Br, (C_1-C_4)-alkyl eller (C_1-C_4)-alkoksy, en benzylrest som er usubstituert eller substituert 1-3 ganger med F, Cl, Br, (C_1-C_4)-alkyl eller (C_1-C_4)-alkoksy;

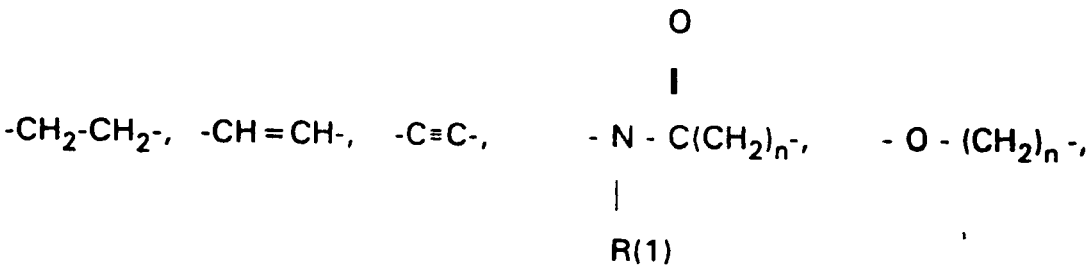
og hvori Y betyr -OH, -ONa, -OMe eller $-NHCH_2CH_2SO_3H$;

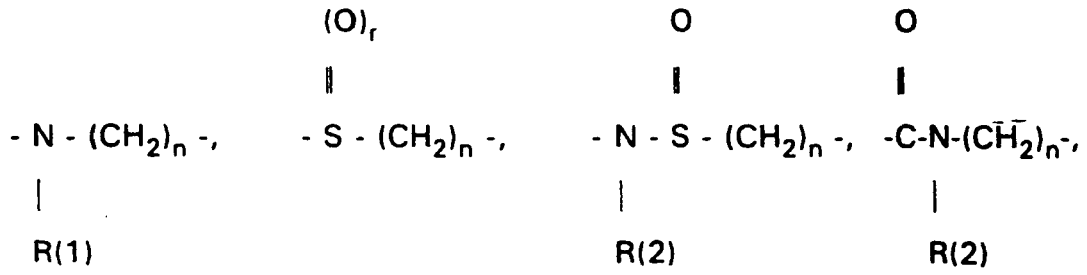
et forbindelsesledd X som er en direktebinding eller et mellom ledd X:

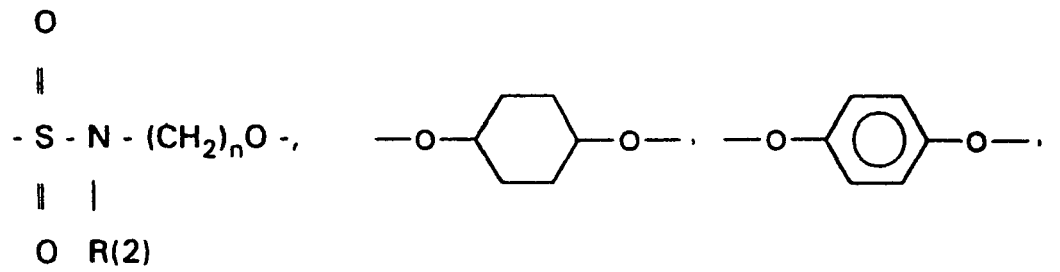


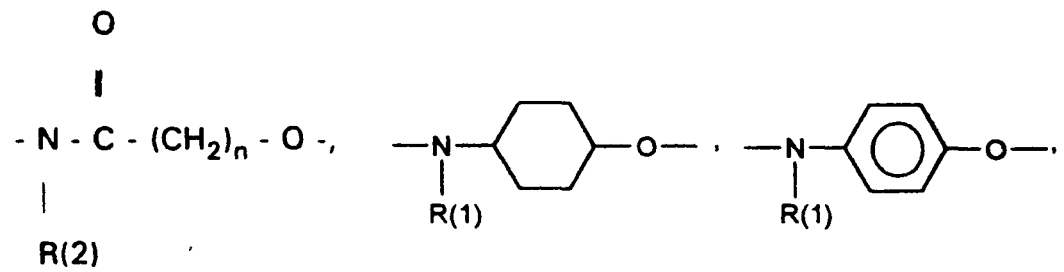


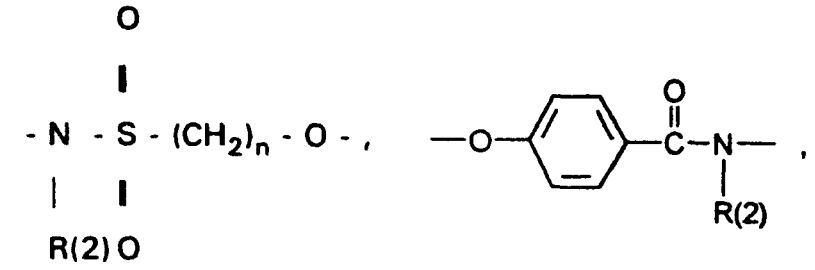


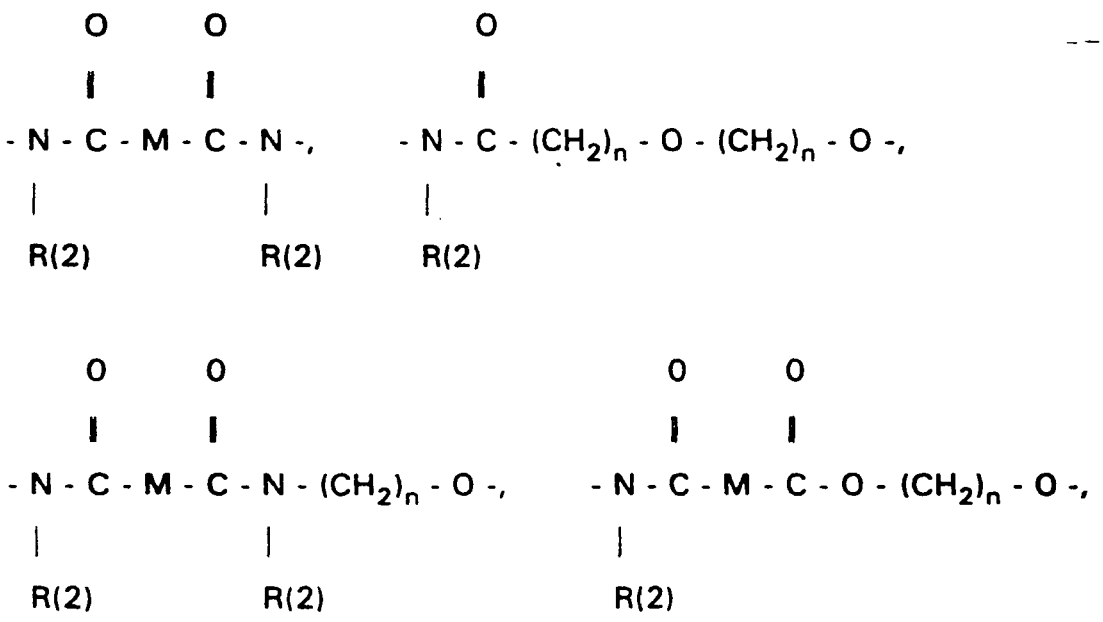












hvori R(1) = H, (C_1-C_8)-alkyl; gruppen R(2)-C(=O)-, fenyl, benzyl, usubstituert eller 1-3 ganger substituert med F, Cl, Br, (C_1-C_4)-alkyl eller alkoksy med 1-4 C-atomer

R(2) = H, (C_1-C_8)-alkyl, fenyl, benzyl, usubstituert eller 1-3 ganger substituert med F,

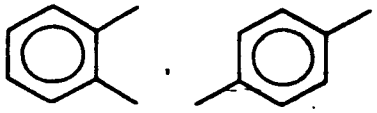
Cl, Br, (C_1-C_4)-alkyl eller alkoksy med 1-4 C-atomer

m = 0-6

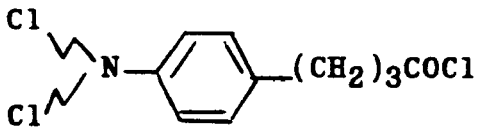
n = 1-16

p = 1, 2, 3

r = 0-2 og

M = $-(CH_2)_m-$, $-(C=C)_p-$, $-C\equiv C-$, 

og en virkestoffdel W, der W er klorambucil,



HMG-CoA Reductase-hemmer, eller prolylhydroksylasehemmer, kjennetegnet ved at man

a) i tilfelle X = en direkte binding, bringer en gallesyre G på en av dens -OH-grupper i 3, 7 eller 12 posisjon til reaksjon med en aktivert form av en karboksylsyregruppe av virkestoffet W eventuelt under tilsetning av en base eller

b) i tilfelle X = en direkte binding, bringer en gallesyre G på en av dens med en beskyttelsesgruppe beskyttede -OH-grupper i 3, 7 eller 12 posisjon til reaksjon med en aktivert form av en karboksylsyregruppe av virkestoffet W eventuelt under tilsetning av en base eller

c) i tilfelle X = et mellomledd, bringer karboksylsyregruppen eller aktivert karboksylsyregruppe av virkestoffet til reaksjon med den terminale aminogruppen av X fra G-X delen eventuelt under tilsetning av en base eller

d) i tilfelle X = et mellomledd, bringer en gallesyre G som i 3, 7 eller 12 posisjon bærer en aminogruppe til reaksjon på denne aminogruppen med en terminalkarbok-

sylsyregruppe eller aktivert karboksylsyregruppe av X fra X-W delen eventuelt under tilsetning av en base.

De forskjellige analogifremgangsmåtevariantene blir utdypet nærmere i det følgende:

a) X = en direkte binding

Gallesyrene blir anvendt enten i fri form eller i beskyttet form. Etter sammenknyttingen med W foregår eventuelt avspaltingen av beskyttelsesgruppen og omdannelsen av C-24 karboksylfunksjonen i derivatet. Som beskyttelsesgrupper egner seg for alkoholgruppen hensiktsmessig acetyl, tetrahydropyranyl, t-butyldimetylsilyl eller benzyl. Som beskyttelsesgrupper for C-24 karboksylgruppen er forskjellige alkyl- eller benzylestere aktuelle, men også for eksempel ortoester.

For eksempel reagerer gallesyren fortrinnsvis i posisjon 3, men også i posisjon 7 med aktiverte former av karboksylsyrer, som syreklorider eller blandede anhydrider under tilsetning av baser som trialkylamin, pyridin, men også NaOH ved romtemperatur i egnede oppløsningsmidler som tetrahydrofuran, metylenklorid eller eddikester, men også dimetylformamid (DMF) eller dimetoksyetan (DME).

De forskjellige isomerene kan f.eks. bli adskilt kromatografisk.

Ved anvendelse av egnede beskyttelsesgrupper lar reaksjonen seg selektivt gjennomføre. På analog måte lar tilsvarende aminogallesyrer seg overføre i tilsvarende amider. Også her kan reaksjonen bli gjennomført enten med beskyttede- eller frie gallesyrer.

Analogt til dette lar videre forbindelser seg sammenbinde etter kjente standardfremgangsmåter.

b) X = et mellomledd

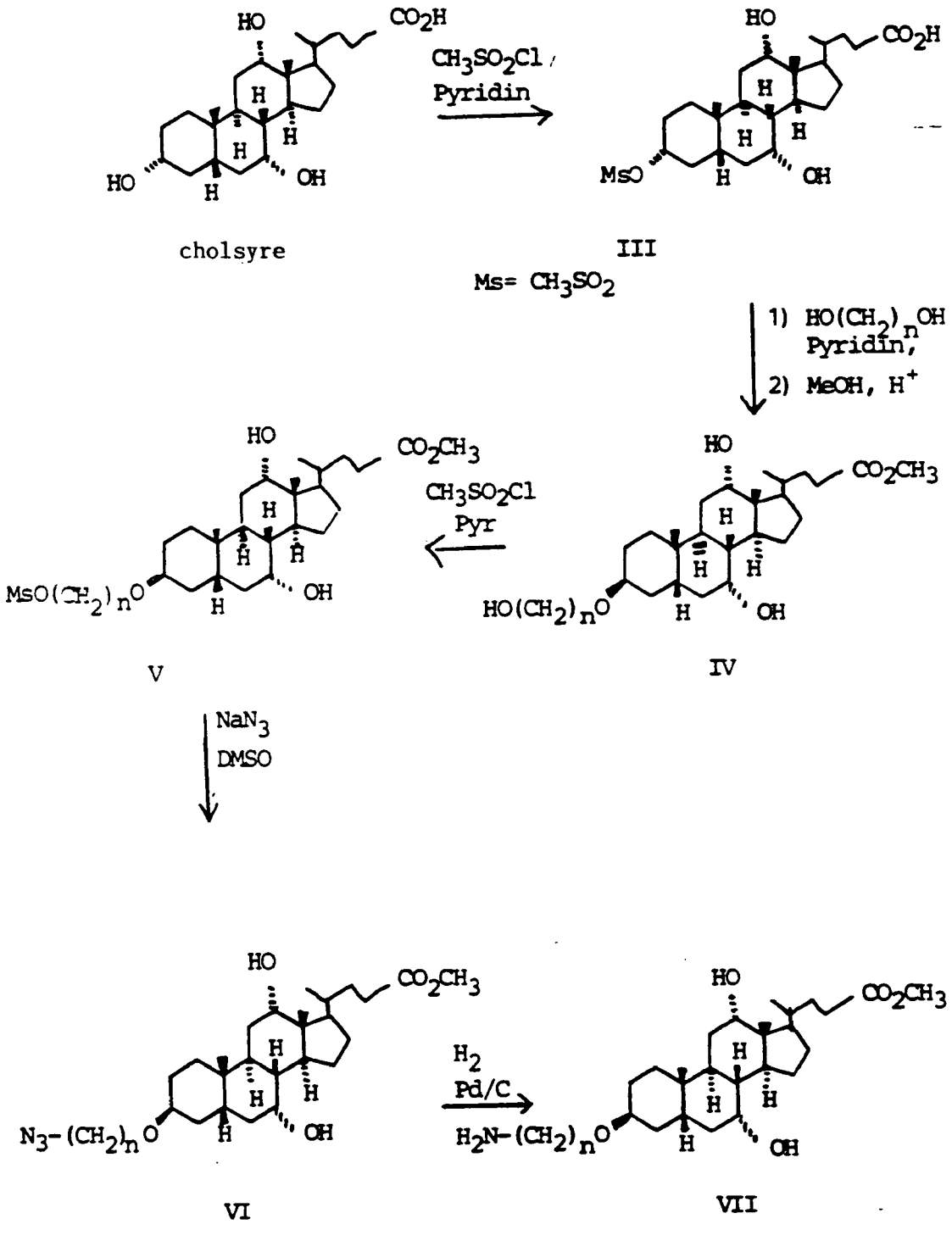
Under den a) angitte fremgangsmåten lar det seg også gjennomføre sammenbinding W-X med G h.h.v. W med X-G. På hensiktsmessig måte tilsetter man også her gallesyredelen enten beskyttet eller ubeskyttet.

En foretrukket fremstillingsmåte består i å omsette reaktive former av W med reaktive former av X-G. Eventuelt forbinder man etter sammenbindingen avspaltning av beskyttelsesgruppen og omdannelsen fra C-24 karboksyl i forbindelsene ifølge oppfinnelsen.

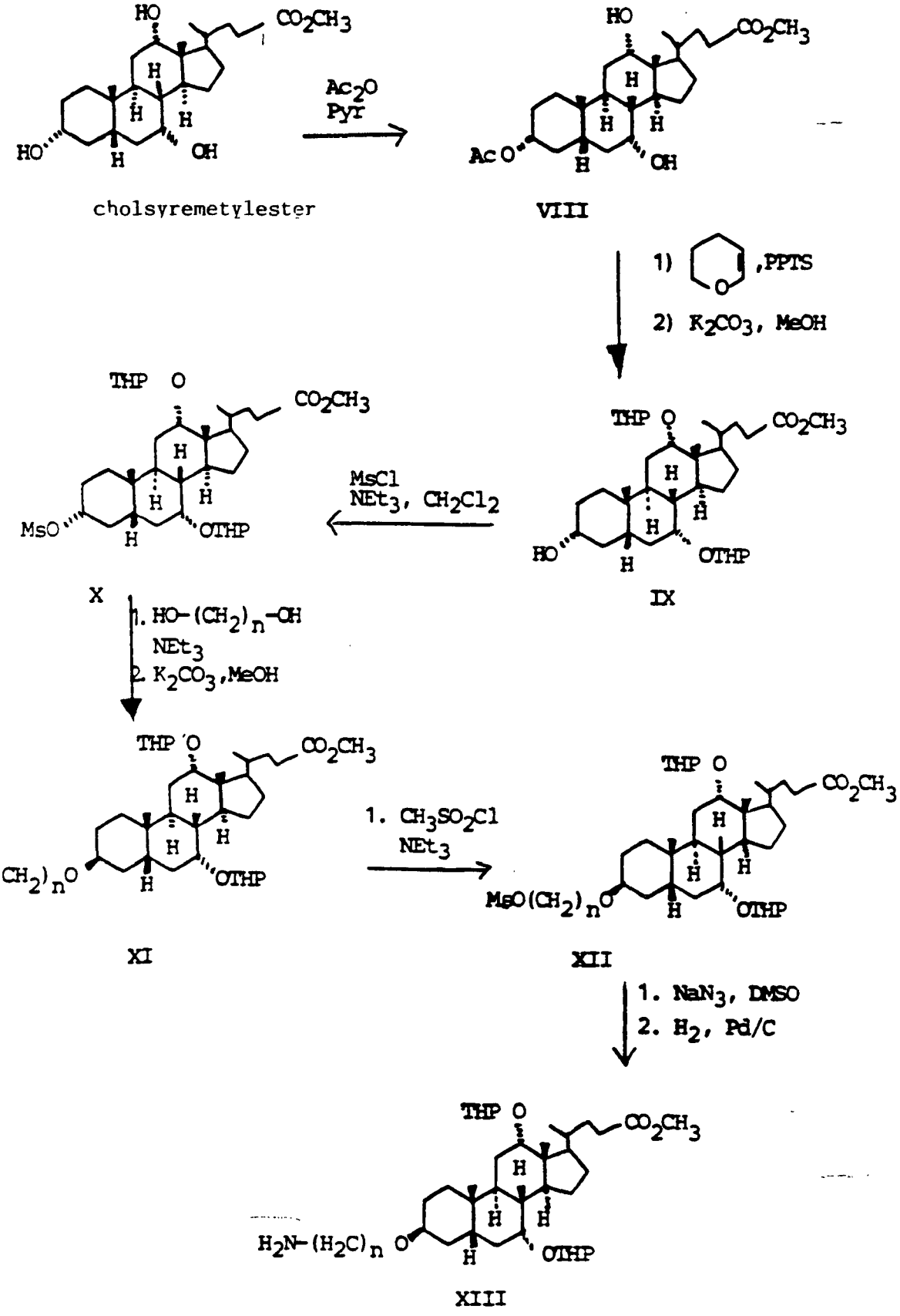
Fremstillingen av reaktive gallesyrebyggesteiner X-G er angitt i formelskjema 1-4 punkt c) med eksempelet kolsyre.

c) Fremstilling av reaktive gallesyrebyggesteiner X-G med kolsyre som eksempel, skjema 1-4

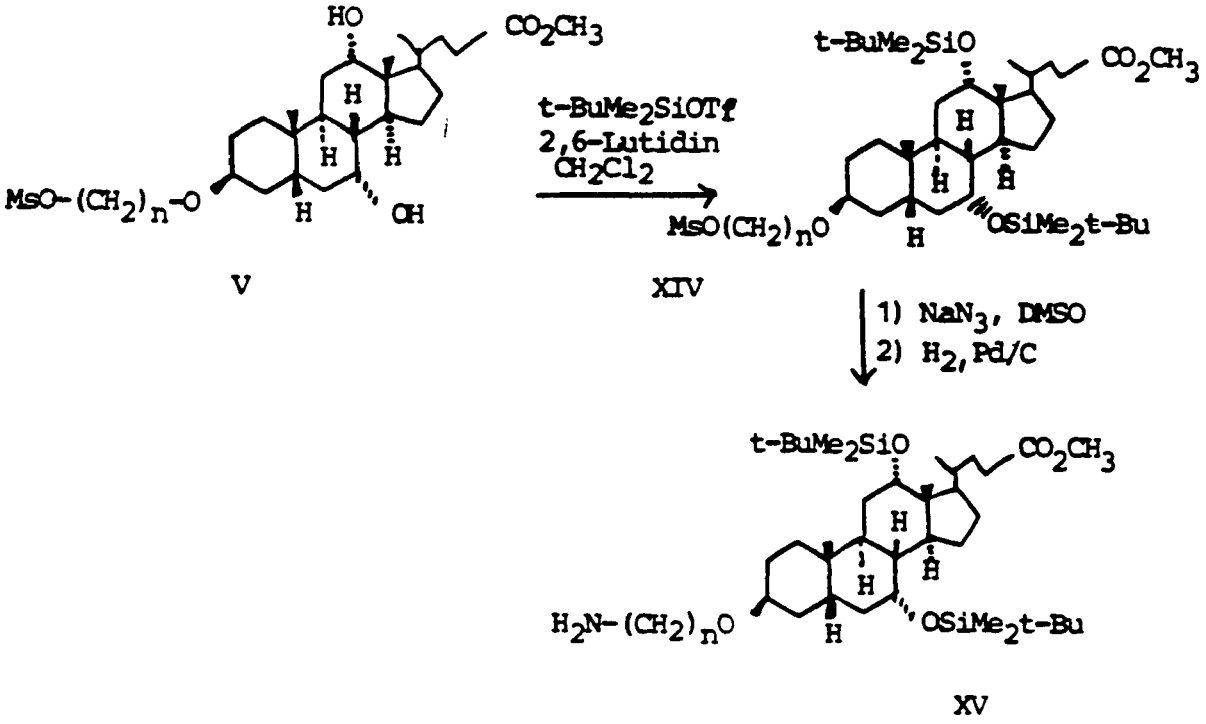
Skjema 1: X-G uten beskyttelsesgruppe



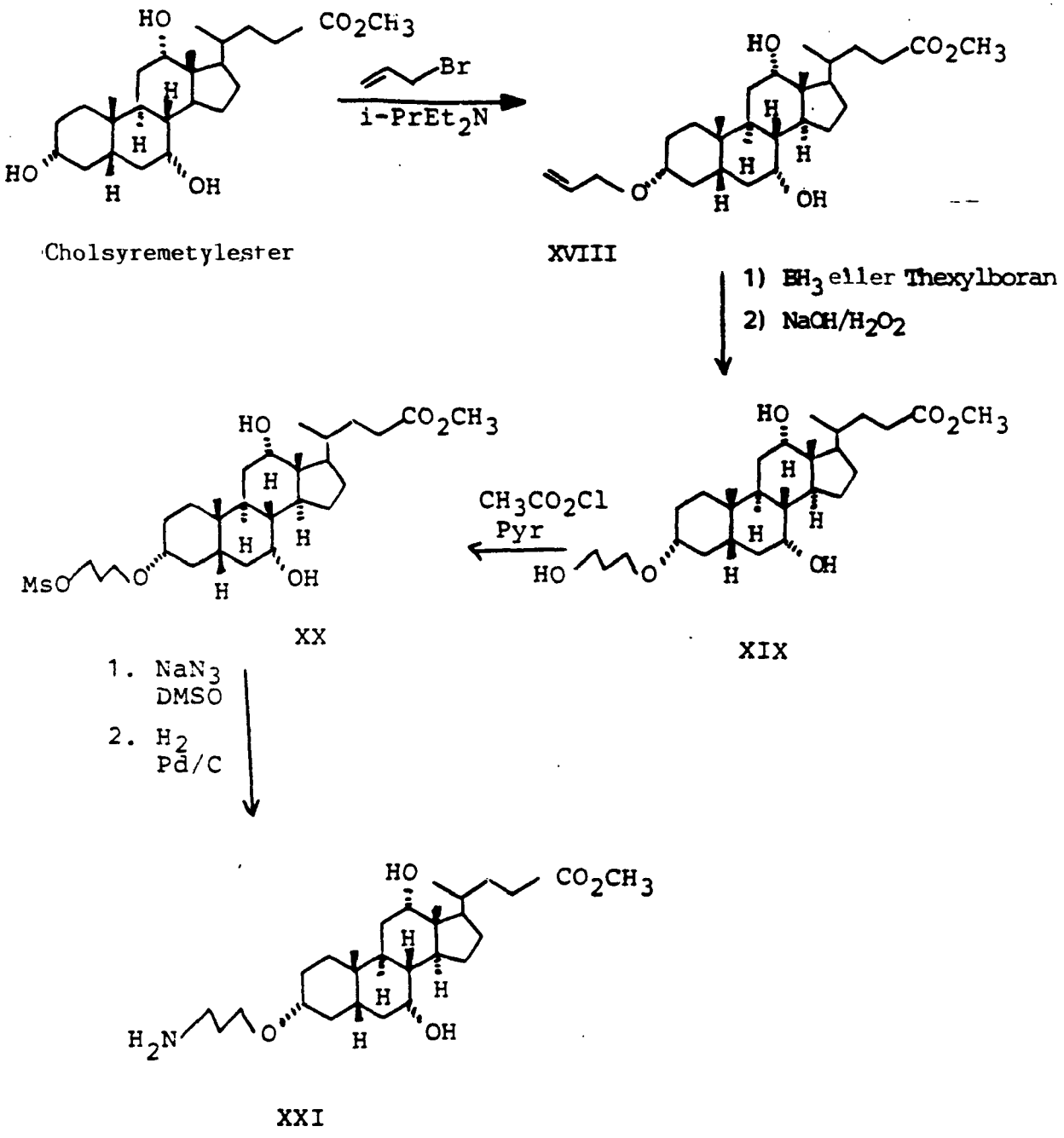
Skjema 2: X-G med THP-beskyttelsesgruppe (THP = tetrahydropyranyl)



Skjema 3: X-G med t-$BuMe_2Si$-beskyttelsesgruppe



Skjema 4: X-G med α-konfigurasjon i 3-C



Cholsyremetylester

XVIII

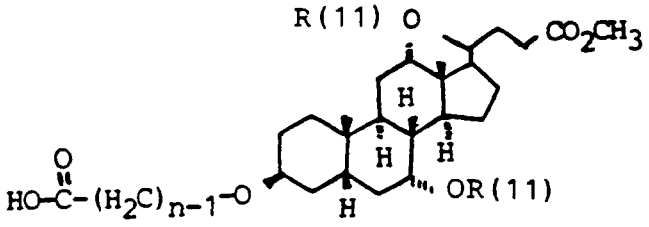
XX

XIX

XXI

Utbyttingen av 3-OH-gruppen med diol $HO(CH_2)_nOH$ lykkes ved omsetning av tilsvarende mesylat med tilsvarende diolen, som man anvender fortrinnsvis i overskudd, under tilsetning av baser som pyridin, lutidin, men også trietylamin.

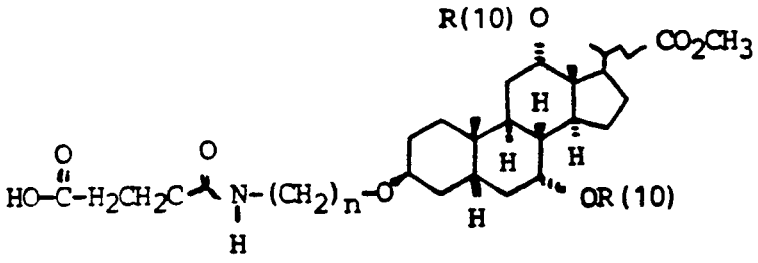
Den primære OH-gruppen i forbindelse IV og XI lar seg videre omsette etter standardfremgangsmåter. Således kan f.eks. XI bli overført med oksidasjonsmidler til tilsvarende karboksylsyre XVI [med R(11) lik THP], fortrinnsvis med krom-VI-reagenser eller forskjellige kaliumpermanganatsystemer. Tilsvarende egner seg også andre beskyttelsesgrupper.



XVI

R(11) = THP, benzyl
t-BuMe$_2$Si,
Benzyloksykarbonyl (Z), acetyl

Aminene VII, XIII og XV kan bli overført med bernsteinsyreanhydrid i egnede oppløsningsmidler, fortrinnsvis metylenklorid, toluol eller også pyridin til karboksylsyre XVII.



XVII

R(10) = H, THP, t-BuMe$_2$Si acetyl, benzyl benzyloksykarbonyl (Z)

Skjema 4 beskriver fremstilling av gallesyrebyggesteiner med 3α-konfigurasjon. Til hydroborering av XVIII egner det seg forskjellige boraner som BH_3, teksylboran eller 9-BBN. XVIII kan enten bli anvendt ubeskyttet som i skjema 4 i alkoholgruppen eller også beskyttet med THP, acetyl, benzyl o.a.

Anvendelse som legemiddel

Gallesyrer spiller en viktig fysiologisk rolle ved fordøyelse av lipider. De blir avgitt fra leveren over galleblæren i tarmen og utfører der sin fysiologiske virkning ved fordøyelse av lipider. Den største andelen av gallesyrene blir tatt tilbake over det enterohepatiske kretsløp. De kommer fram over mesenterialvenen til tynntarmen og portsystemet igjen tilbake til leveren. Ved tilbakeresorpsjon i tarmen spiller såvel aktive som også passive transportprosesser en rolle. I det enterohepatiske kretsløpet opptrer gallesyrene både som frie syrer, men fremtrer også i form av glysin- og taurinkonjugater.

Det er funnet at forbindelsene som blir fremstilt ifølge oppfinnelsen blir resorbert og kommer frem i blodbanen. Det er mulig under utnyttelse av de naturlige tilbakeresorpsjonsmekanismene til gallesyrene å oppnå en forbedret resorpsjon av ikke- eller dårlig resorberbare farmaka.

Videre besitter dette systemet en ytterligere viktig egenskap. Det lar seg for legemiddel og riktignok for ikke-resorberbare og for resorberbare å oppnå en organselektiv virkning, nemlig slike betydelige organer som besitter transportmekanismen for gallesyrer, som f.eks. i vevet til det enterohepatiske kretsløp (f.eks. hepatotrop virkning). Derfor går det an å forminske de systematiske bivirkningene av en rekke legemidler og til og med forhindre dem.

En forbedret resorpsjon h.h.v. en organselektiv virkning er ønskelig for en rekke farmaka som f.eks. peptider, antibiotika, antivirale substanser, kreftmiddel, leverbeskyt-

telsesmiddel, antihyperlipidemika, diuretika, blodtrykksenkere, reninhemmere, prolylhydroksylase-hemmer, antidiabetika.

De farmakologisk virksomme molekylene kan utfolde sin aktivitet på forskjellige måter:

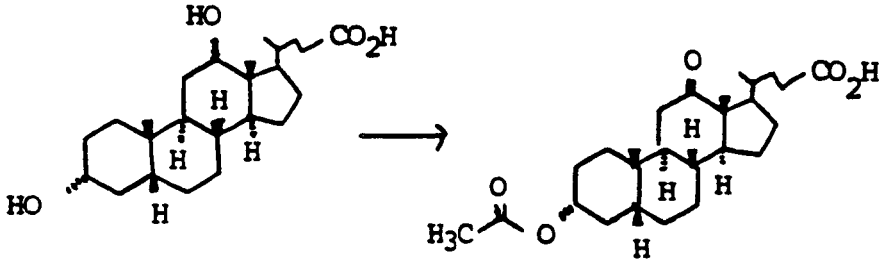
- i den sammenbundede formen W-X-G ifølge oppfinnelsen
- etter avspaltning av gallesyreresten med et forbindelsesledd X
- i en fri form W uten X og G
- i de tre nevnte tilfellene samtidig

Forbindelsene med formel I kan bli administrert i forskjellige doseringsformer, fortrinnsvis oralt i form av tabletter, kapsler eller væsker. De daglige dosene avhenger av kroppsvekt og tilstand til pasienten i område fra 3 mg til 5.000 mg, fortrinnsvis i doseringsområde 10-500 mg. Forbindelsene kan komme til anvendelse oppløst eller suspendert i farmakologisk forlikelige organiske oppløsningsmidler, som en- eller flerverdige alkoholer, som f.eks. etanol eller glyserin, i triacetin, oljer som f.eks. solsikkeolje, levertran, etere, som f.eks. dietylenglykoldimetyleter eller også polyetere som f.eks. polyetylenglykol, eller også i nærvær av andre farmakologisk forlikelige polymerbærere, som f.eks. polyvinylpyrrolidon, eller andre farmasøytisk godtagbare tilsatsstoffer som stivelse, cyklodekstrin eller polysakkarider. Videre kan forbindelsene bli gitt i kombinasjon med andre legemiddelstoffer.

Eksempler

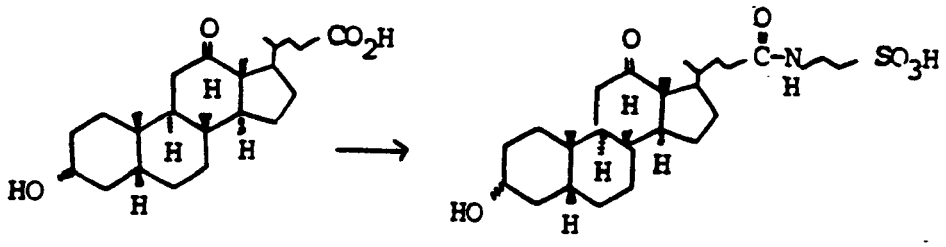
1. W-X-G, X = en direktebinding

Eksempel 1



20 g (51 mmol) desoksykolsyre ble blandet i 50 ml dioksan og 20 ml pyridin og ved romtemperatur tilsatt 30 ml acetanhydrid. Etter 3 dager ble det inndampet og resten oppløst i 300 ml eddiksyre. Til oksidasjon ble 14 g kaliumkromat tilsatt i 60 ml vann. Man lot det stå i 3 dager ved romtemperatur. Til opparbeiding ble 4 l vann tilsatt og ekstrahert med eter (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med natriumsulfat og inndampet. Resten oppløste man i 200 ml 1n vandig KOH. Etter 24 timer ble produktet utfelt med 1n HCl. Kromatografi på kiselgel (cykloheksan/eddikester/eddiksyre = 40/100/1) gav 14,0 g (35,9 mmol, 70%) "Eksempel 1".

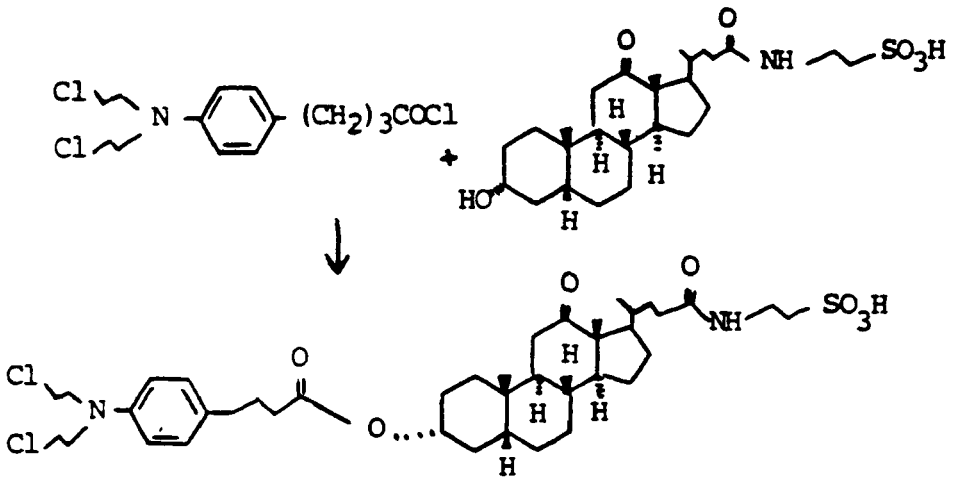
Eksempel 2



14,0 g (35,9 mmol) "Eksempel 1" ble oppløst i 100 ml dioksan og tilsatt 8,3 ml tri-n-butylamin. Deretter ble 3,75 ml klormaursyreetylester dråpevis tilsatt. Etter 30 minutter ved romtemperatur tilsatte man 4,75 g taurin, oppløst i 38 ml 1n NaOH. Etter 24 timers omrøring ved romtemperatur ble det inndampet og resten fordelt mellom 400 ml 1n HCl og eter. De vandige fasene ble ekstrahert tre ganger med eter. De forenede organiske fasene ble inndampet og resten tatt ut i varm etanol, filtrert og inndampet, hvorved produktet krystalliserte.

Utbytte: 9,5 g "Eksempel 2"

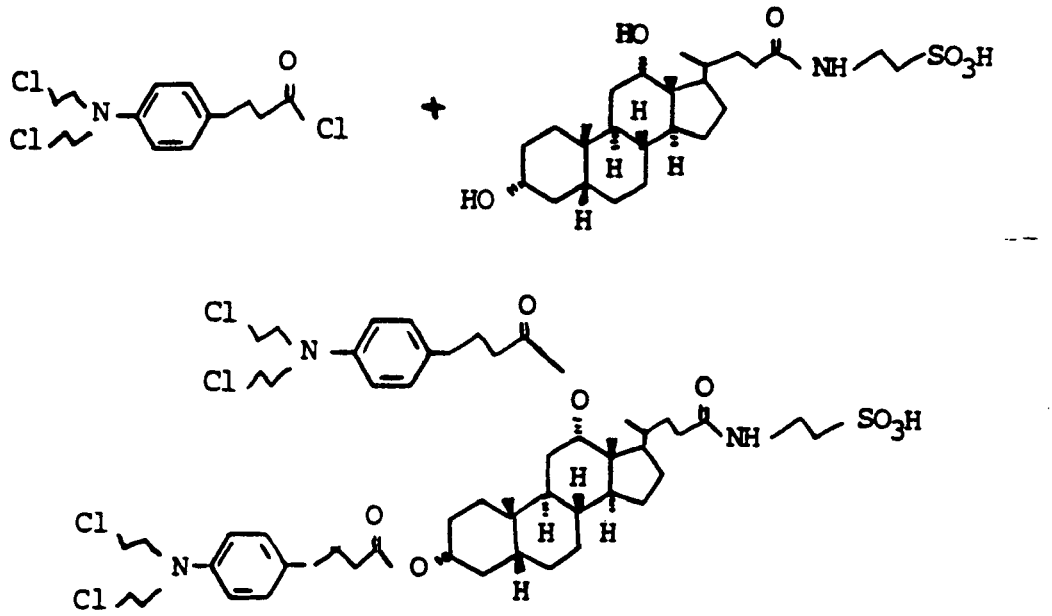
Eksempel 3



500 mg klorambucil ble overført i 25 ml dioksan med 1,5 ml oksalylklorid ved romtemperatur i nærvær av 2 g molekylarsikt (4Å) i løpet av 24 timer i syrekloridet. Det ble inndampet og resten tatt ut med 15 ml tørr dioksan. Denne oppløsningen ble under N_2 i løpet av 30 minutter dråpevis tilsatt en kokende løsning av 900 mg Eksempel 2 i 60 ml dioksan. Etter 5 timers tilbakestrømming ble det inndampet og resten kromatografert på kiselgel ($CHCl_3$/MeOH/HOAc = 12/1/2).

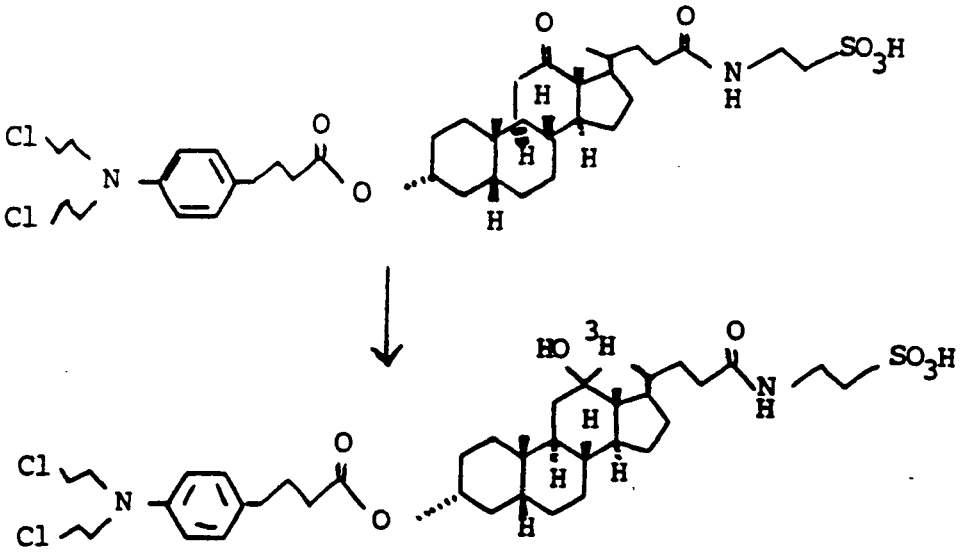
Utbytte: 250 mg "Eksempel 3".

Eksempel 4



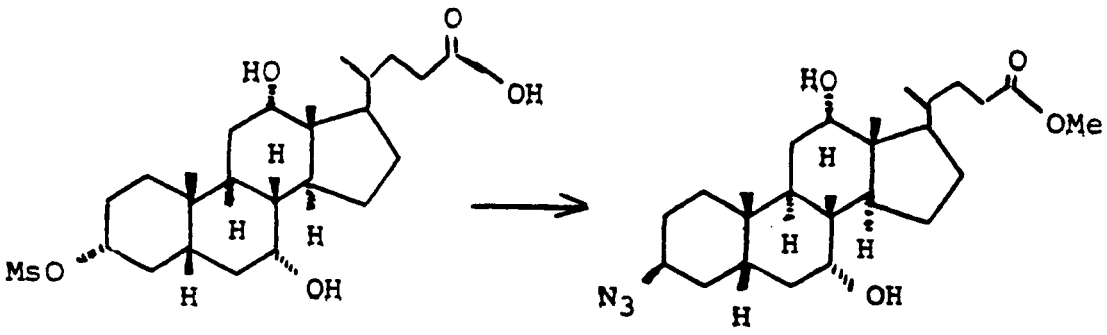
Som beskrevet i Eksempel 3 ble en løsning med syreklorid av klorambucil fra 500 mg klorambucil fremstilt og omsatt på samme måte med 400 mg desoksytaurokolsyre. Kromatografi på kiselgel (eddikester/cykloheksan/HOAc = 100/90/1; deretter $CHCl_3$/MeOH = 5/1) gav 350 mg "Eksempel 4".

Eksempel 5



5 mg "Eksempel 3" ble oppløst i 150 µl dioksan/15 µl 100 mmol natriumfosfatbuffer pH 7,4 og tilsatt 100 mCi Na[^{3}H]BH_4 (11,8 Ci/mmol). Etter 2 timer ved romtemperatur ble 20 µl 5n HCl tilsatt. Preparativ DC (HPTLC-DC-plate, 0,5 mm, Butanol/HOAc/ H_2O = 9/1/2) gav 2 mCi "Eksempel 5".

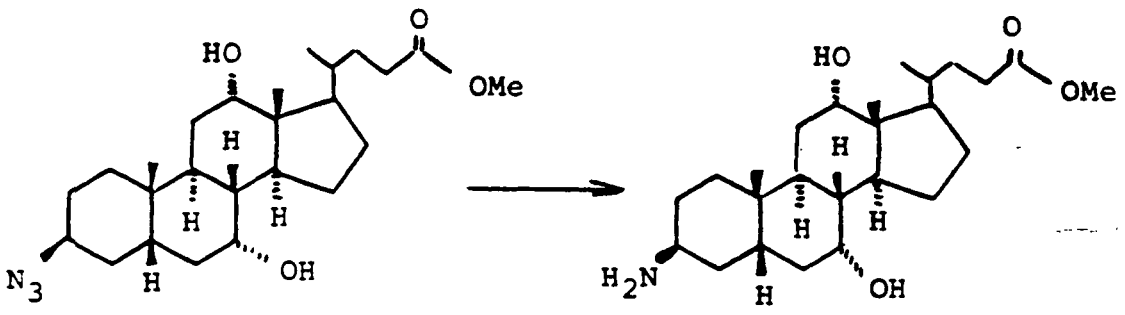
Eksempel 6



a) En oppløsning med 43,6 g (89,6 mmol) "Eksempel 10" i 1 l tørr DMF ble blandet med 6,2 g (95,4 mmol) natriumazid og omrørt i 45 minutter ved 130°C. Etter avkjøling ble den tømt i vann og ekstrahert med dietyleter (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med $MgSO_4$ og inndampet.

b) Forestringen ble gjennomført analog til "Eksempel 11b". Kromatografi på kiselgel (cykloheksan/eddikester 1:1) gav 18,9 g (42,2 mmol, 57%) azid "Eksempel 6".
$C_{25}H_{41}N_3O_4$ (447) MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 454 ($M+Li^+$).

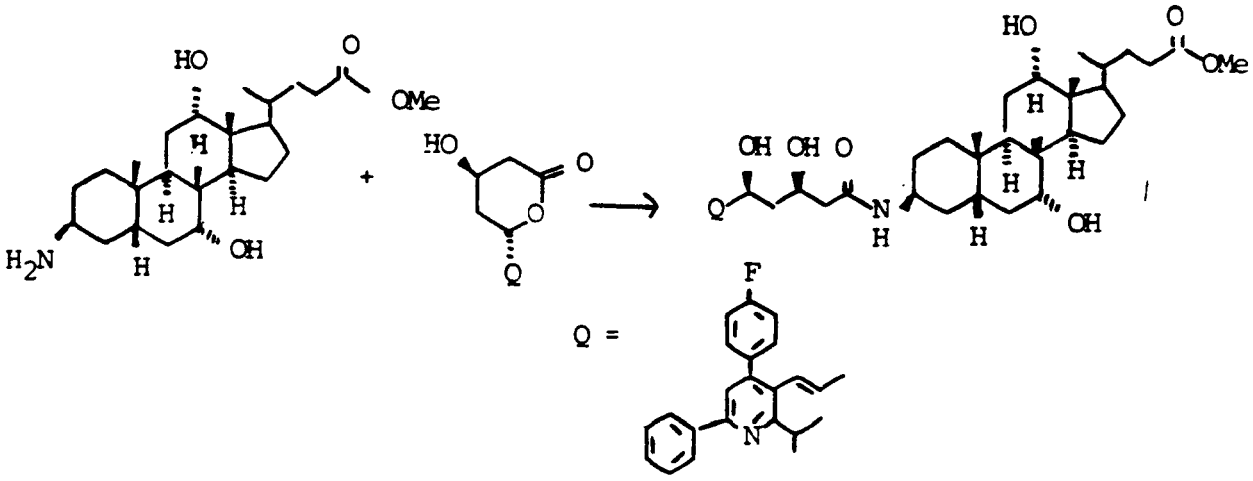
Eksempel 7



3,0 g (6,7 mmol) "Eksempel 6" ble oppløst i 100 ml MeOH og hydratisert med 2 g Pd/C ved romtemperatur under normaltrykk. Katalysatoren ble filtrert av og filtratet inndampet. Kromatografi på kiselgel ($MeOH/NEt_3$ 95:5) gav 1,6 g (3,8 mmol, 57%) amin "Eksempel 7".

$C_{25}H_{63}N\ O_4$ (421) MS (FAB) : 422 ($M+H^+$).

Eksempel 8

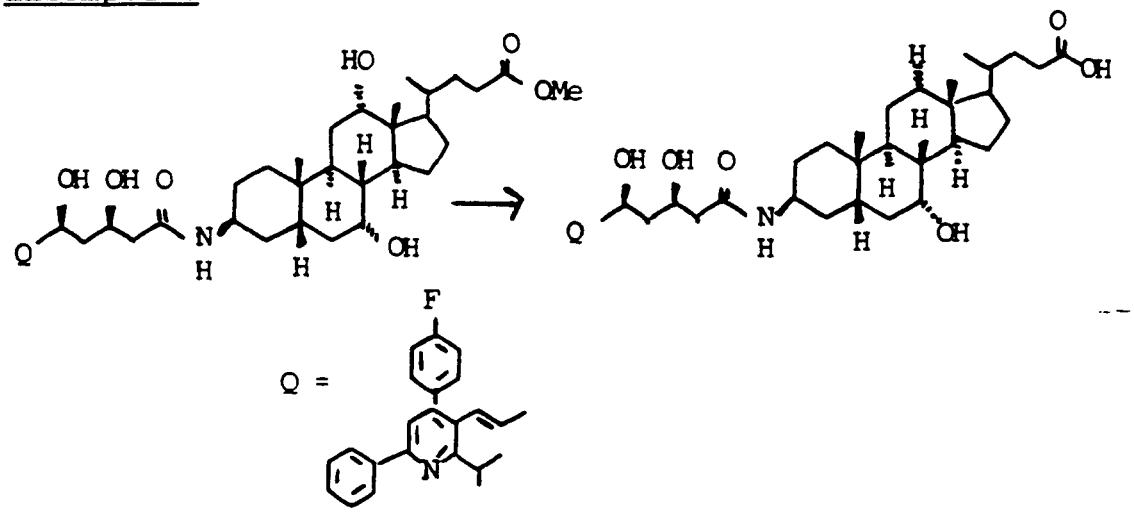


En blanding av 500 mg (1,19 mmol) Eksempel 7, 10 ml trietylamin, 200 mg (1,61 mmol) 4-dimetylaminopyridin og 520 mg (1,20 mmol) lakton "Eksempel 125" (fremstilling se DE 38.23.045-A, US 4.925.852) i 25 ml tørr THF ble oppvarmet i 48 timer under tilbakestrømming. Oppløsningsmiddelet ble dampet av og resten kromatografert på kiselgel (kloroform/metanol 9:1).

Utbytte: 520 mg (0,61 mmol, 51%) "Eksempel 8".

$C_{52}H_{69}FN_2O_7$ (852), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 859 ($M+Li^+$).

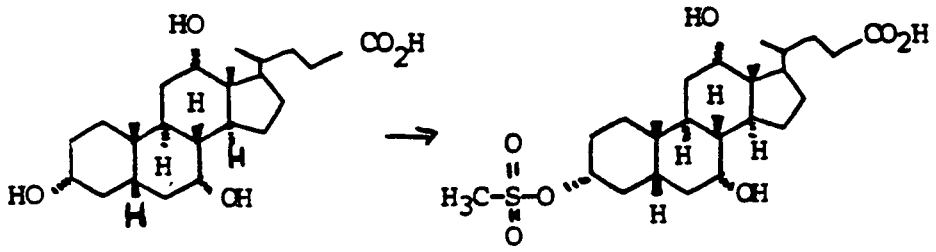
Eksempel 9



Analog til Eksemplene 79-88 ble "Eksempel 9" oppnådd. $C_{51}H_{67}FN_2O_7$ (840), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 847 ($M+Li^+$).

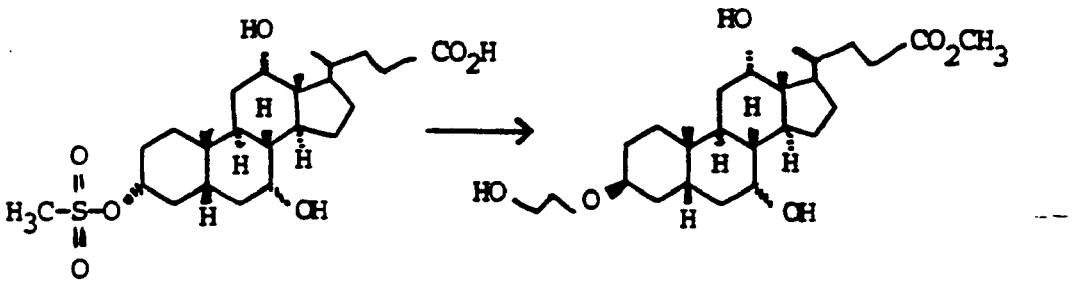
2. X-G, X = et mellomledd

Eksempel 10



Til 100 g (0,245 mol) kolsyre i 500 ml pyridin ble det ved 0°C dråpevis tilsatt 23,1 ml (0,294 mol) metansulfonsyreklorid. Man lar det omrøres i 30 minutter ved 0°C og 2 timer ved romtemperatur. Blandingen ble tømt i 3.000 ml vann/400 ml kons. H_2SO_4 og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med $MgSO_4$ og inndampet. Kromatografi på kiselgel (eddikester/cykloheksan/HOAc=5:5:1) gav kvantitativt "Eksempel 10". For preparative formål var en ytterligere rensing ikke nødvendig.

Eksempel 11



a) 119 g (0,245 mol) "Eksempel 10" ble oppvarmet i 500 ml etylenglykol/100 ml pyridin i 2 timer ved 100°C. Blandingen ble tømt i 1.500 ml vann/100 ml kons. H_2SO_4 og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket ($MgSO_4$) og inndampet.

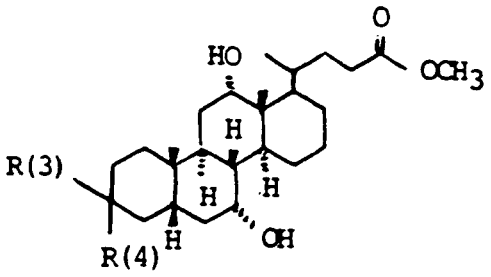
b) Til forestring ble resten oppløst i 1.100 ml metanolisk HCl (fremstilt ved dråpevis tilsetning av 100 ml acetylklorid til 1.000 ml metanol) og omrørt over natten ved romtemperatur. Oppløsningen ble tømt i 2.000 ml vann og ekstrahert med eter (3 ganger). De forenede organiske fasene ble vasket med mettet vandig $NaHCO_3$-oppløsning og tørket ($MgSO_4$). Avdamping av oppløsningsmiddelet og flashkromatografi på kiselgel (eddikester deretter eddikester/MeOH = 10/1) gav 37,1 g (0,08 mol, 33%) "Eksempel 11".
$C_{27}H_{46}O_6$ (466), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 473 ($M+Li^+$).

Produktet inneholdt inntil 10% av 3α-isomeren, som eventuelt kan bli adskilt ved tilsvarende derivatisering.

Analogt til Eksempel 11 ble forbindelsene i Tabell 1 fremstilt.

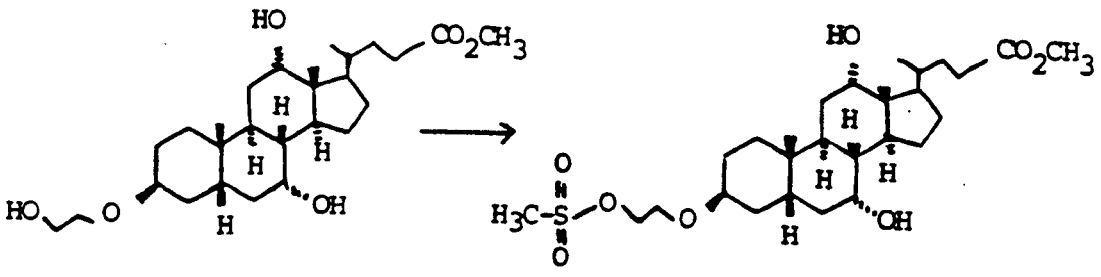
(Ved siden av mindre andeler av α-isomerer ble det oppnådd overveiende β-isomerer).

Tabell 1



Eks.	β-R(3)	α-R(4)	MS (FAB, 3-NBA/LiJ eller LiCl)
12	HO-$(CH_2)_3$-O-	H	$C_{28}H_{48}O_6$(480); 487 ($M+Li^+$)
13	HO-$(CH_2)_4$-O-	H	$C_{29}H_{50}O_6$(494); 501 ($M+Li^+$)
14	HO-$(CH_2)_5$-O-	H	$C_{30}H_{52}O_6$(508); 515 ($M+Li^+$)
15	HO-$(CH_2)_6$-O-	H	$C_{31}H_{54}O_6$(522); 529 ($M+Li^+$)
16	HO-$(CH_2)_{10}$-O-	H	$C_{35}H_{62}O_6$(578); 585 ($M+Li^+$) 601 ($M+Na^+$)
17	HO-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-	H	$C_{29}H_{50}O_7$(510); 517 ($M+Li^+$)
18	H_3C-CH(OH)-CH_2-O-	H	$C_{28}H_{48}O_6$(480); 487 ($M+Li^+$)

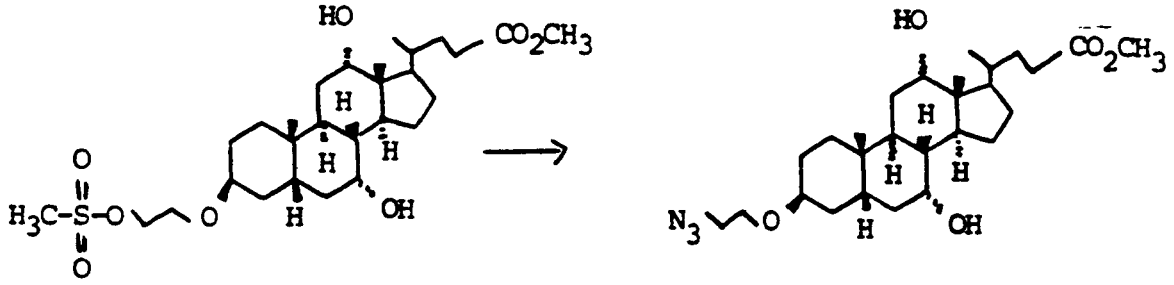
Eksempel 19



Til 37,1 g (0,08 mol) "Eksempel 11" i 150 ml pyridin ble det ved 0°C dråpevis tilsatt 6,6 mol (0,084 mol) metansulfonsyreklorid. Man lar det omrøres i 15 minutter ved 0°C og 1 time ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i 500 ml vann og ekstrahert med eddikester (3 ganger). Tørking av de

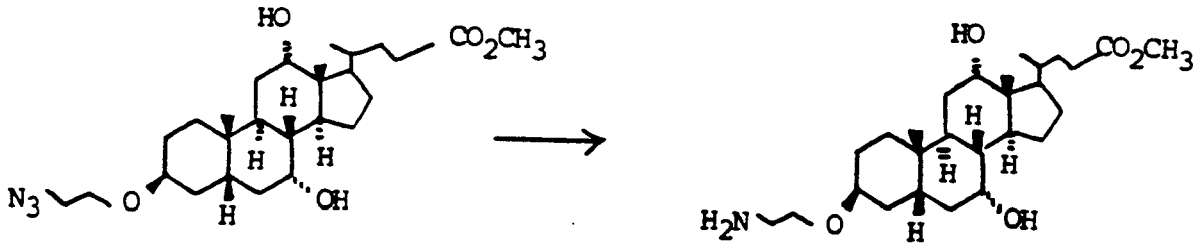
forenede organiske fasene ($MgSO_4$), avtaging av oppløsningsmiddelet og kromatografi på kiselgel (eddikester/cykloheksan = 3/1) gav 37,7 g (0,07 mol, 87%) mesylat "Eksempel 19". $C_{28}H_{48}O_8S$ (544), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 551 ($M+Li^+$).

Eksempel 20



37,7 g (0,07 mmol) mesylat "Eksempel 19" ble omrørt med 4,95 g (0,076 mol) natriumazid i 150 ml tørr DMSO 2 timer ved 70°C. Reaksjonsblandingen ble tømt i vann og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket ($MgSO_4$) og inndampet. Resten ble tatt ut med toluol og toluolen ble igjen avdampet i rotasjonsdamper (2 ganger). Utbytte 34,5 g i "Eksempel 20" (kvantitativ). Azidet ble uten videre rensing umiddelbart omsatt til neste trinn.

Eksempel 21

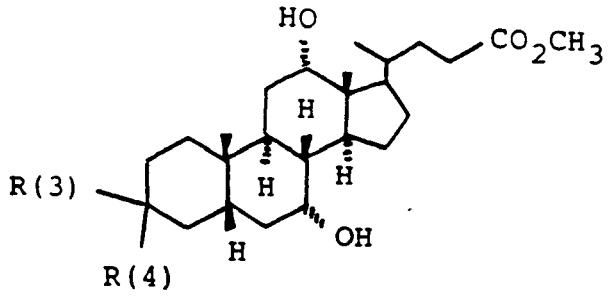


31,1 g (0,063 mol) "Eksempel 20" ble i 500 ml eddikester hydratisert med 20 g Pd/C (10%) ved romtemperatur og normaltrykk. Katalysatoren ble filtrert av og filtratet inndampet. Kromatografi på kiselgel (eddikester/metanol/NEt_3 = 5/1/1) gav 21,0 g (0,045 mol, 71%) amin "Eksempel 21".

$C_{27}H_{47}NO_5$ (465), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 472 ($M+Li^+$).

Analog til Eksemplene 19-21 ble forbindelsene i Tabell 2 fremstilt.

Tabell 2

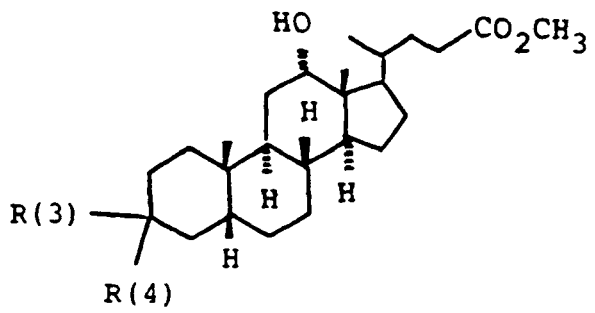


Eks.	β-R(3)	α-R(4)	MS (FAB, 3-NBA/LiJ)
22	$H_2N-(CH_2)_3-O-$	H	$C_{28}H_{49}NO_5$(479); 486 ($M+Li^+$)
23	$H_2N-(CH_2)_4-O-$	H	$C_{29}H_{51}NO_5$(493); 500 ($M+Li^+$)
24	$H_2N-(CH_2)_5-O-$	H	$C_{30}H_{53}NO_5$(507); 514 ($M+Li^+$)
25	$H_2N-(CH_2)_6-O-$	H	$C_{31}H_{55}NO_5$(521); 528 ($M+Li^+$)
26	$H_2N-(CH_2)_{10}-O-$	H	$C_{35}H_{63}NO_5$(577); 584 ($M+Li^+$)
27	$H_2N-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-$	H	$C_{29}H_{51}NO_6$(509); 516 ($M+Li^+$)
28	$H_3C-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH_2}}-CH_2-O-$	H	$C_{28}H_{49}NO_5$(479); 486 ($M+Li^+$)

I analogi til kolsyre ble andre gallesyrer som tilsvarer Eksemplene 10-28 omsatt og forbindelsene oppnådd som tilsvarer Tabell 3.

a) ved å utgå fra desoksykolsyre:

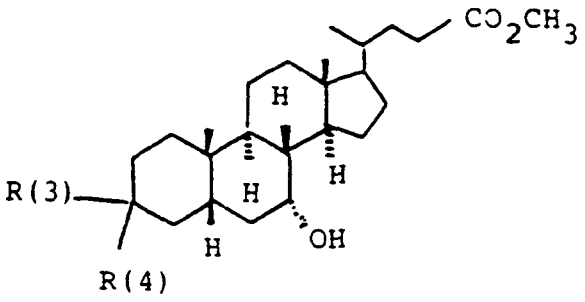
Tabell 3



Eks.	β-R(3)	α-R(4)	MS (FAB, 3-NBA/LiJ)
29	HO-$(CH_2)_2$-O-	H	$C_{27}H_{46}O_5$(450); 457 ($M+Li^+$)
30	HO-$(CH_2)_3$-O-	H	$C_{28}H_{48}O_5$(464); 471 ($M+Li^+$)
31	HO-$(CH_2)_5$-O-	H	$C_{30}H_{52}O_5$(492); 499 ($M+Li^+$)
32	HO-$(CH_2)_{10}$-O-	H	$C_{35}H_{62}O_5$(562); 569 ($M+Li^+$)
33	H_2N-$(CH_2)_2$-O-	H	$C_{27}H_{47}NO_4$(449); 456 ($M+Li^+$)
34	H_2N-$(CH_2)_5$-O-	H	$C_{30}H_{53}NO_4$(491); 498 ($M+Li^+$)

b) ved å utgå fra chenodesoksykolsyre

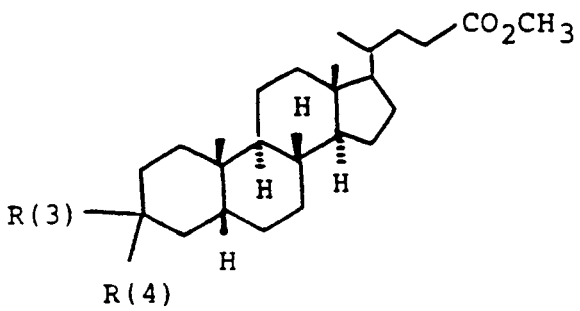
Tabell 4



Eks.	β-R(3)	α-R(4)	MS (FAB, 3-NBA/LiJ)
35	HO-$(CH_2)_2$-O-	H	$C_{27}H_{46}O_5$(450); 457 ($M+Li^+$)
36	HO-$(CH_2)_3$-O-	H	$C_{28}H_{48}O_5$(464); 471 ($M+Li^+$)
37	HO-$(CH_2)_5$-O-	H	$C_{30}H_{52}O_5$(492); 499 ($M+Li^+$)
38	HO-$(CH_2)_{10}$-O-	H	$C_{35}H_{62}O_5$(562); 569 ($M+Li^+$)
39	H_2N-$(CH_2)_2$-O-	H	$C_{27}H_{47}NO_4$(449); 456 ($M+Li^+$)
40	H_2N-$(CH_2)_5$-O-	H	$C_{30}H_{53}NO_4$(491); 498 ($M+Li^+$)

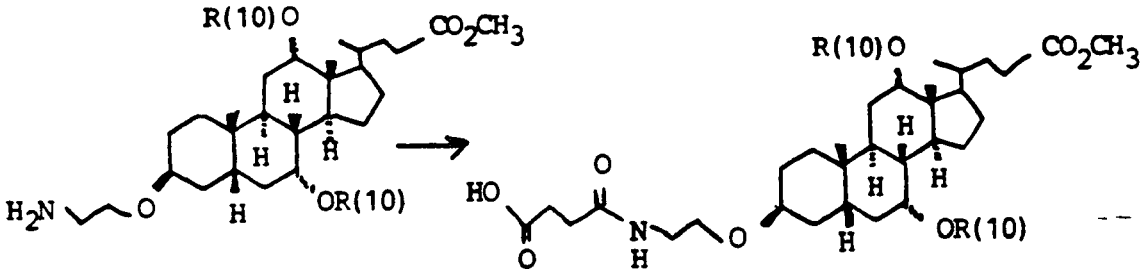
c) ved å utgå fra litokolsyre

Tabell 5



Eks.	β-R(3)	α-R(4)	MA (FAB, 3-NBA/LiJ)
41	HO-$(CH_2)_2$-O-	H	$C_{27}H_{46}O_4$(434); 441 ($M+Li^+$)
42	HO-$(CH_2)_3$-O-	H	$C_{28}H_{48}O_4$(448); 455 ($M+Li^+$)
43	HO-$(CH_2)_5$-O-	H	$C_{30}H_{52}O_4$(476); 483 ($M+Li^+$)
44	HO-$(CH_2)_{10}$-O-	H	$C_{35}H_{62}O_4$(546); 653 ($M+Li^+$)
45	H_2N-$(CH_2)_2$-O-	H	$C_{27}H_{47}NO_3$(433); 440 ($M+Li^+$)
46	H_2N-$(CH_2)_5$-O-	H	$C_{30}H_{53}NO_3$(475); 482 ($M+Li^+$)

Eksempel 47



Eksempel 47 a) (R(10) = H)

2,0 g (4,3 mmol) "Eksempel 21" ble i 25 ml THF/5 ml trietylamin omrørt med 430 mg (4,3 mmol) bernsteinsyreanhydrid i 30 minutter ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i 2n HCl og ekstrahert med eddikester (3 ganger). Tørking av de forenede organiske fasene ($MgSO_4$) og avtaging av oppløsningsmiddelet gav 2,4 g (4,2 mmol, 98%) "Eksempel 47a" (R(10) = H) $C_{31}H_{51}NO_8$ (565) : MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 578 ($M+2Li^+-H$).

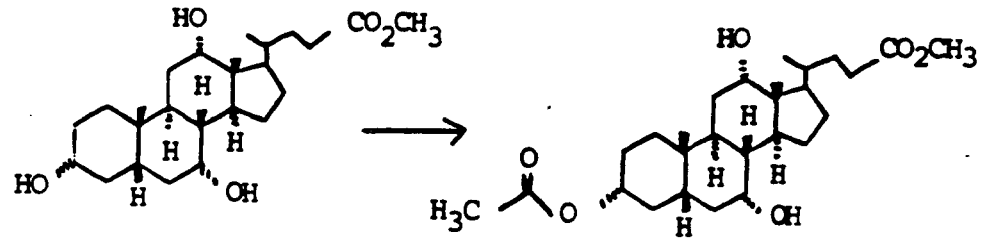
Eksempel 47 b) (R(10) = t-$BuMe_2Si$)

Fullstendig analog til 47 a) ble "Eksempel 47 b)" utvunnet fra Eksempel 58.

Eksempel 47 c) (R(10) = tetrahydropyranyl = THP)

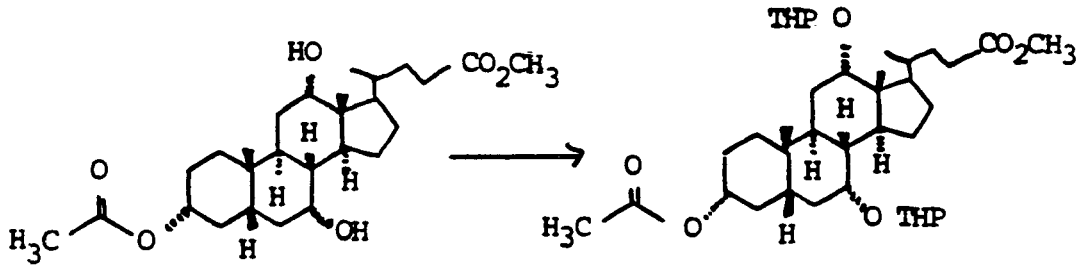
Fullstendig analog til 47 a) ble "Eksempel 47 c)" utvunnet fra Eksempel 55.

Eksempel 48



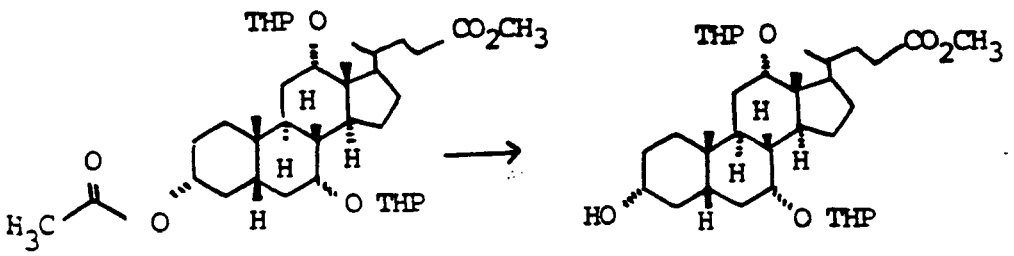
Til 100 g (0,237 mol) kolsyremetylester i 750 ml pyridin ble det ved 0°C dråpevis tilsatt 20,3 ml (0,284 mol) acetylklorid. Etter 2 timers røring ved romtemperatur tilsetter man ved 0°C ytterligere 3,4 ml (0,047 mol) acetylklorid og lar det omrøres i 1 time ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i isvann og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket ($MgSO_4$) og inndampet. Kromatografi av resten på kiselgel (cykloheksan/eddikester = 1,5/1) gav 95,8 g (0,206 mol, 87%) monoacetat "Eksempel 48".

Eksempel 49



50,0 g (0,108 mol) monoacetat "Eksempel 48" ble oppløst i 250 ml diklormetan/250 ml dihydropyran og blandet ved romtemperatur med 10,0 g pyridinium-(toluol-4-sulfonat) og omrørt i to dager ved romtemperatur. Man fortynner reaksjonsoppløsningen med 1.500 ml dietyleter, vasker den organiske fasen to ganger med halvmettet vandig koksaltoppløsning og tørker med $MgSO_4$. Avtaging av oppløsningsmiddelet gav 75 g (kvant.) bis-THP-eter "Eksempel 49", som uten videre rensing kunne bli anvendt til neste trinn.

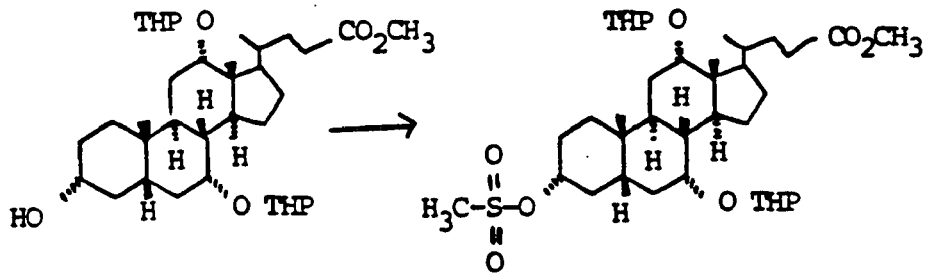
Eksempel 50



46,6 g (ca. 0,055 mol) "Eksempel 49" i 300 ml tørr metanol ble ved romtemperatur blandet med 37,8 g (0,275 mol) kaliumkarbonat og omrørt i 3 timer. Oppløsningsmiddelet ble vidtgående tatt av og resten tømt i 2 n saltsyre/toluol. Den vandige fasen ble ekstrahert to ganger med toluol og de forenede organiske fasene vasket en gang med vann og to ganger med mettet vandig $NaHCO_3$-oppløsning. Tørking med $MgSO_4$, avtaging av oppløsningsmiddel og kromatografi på kiselgel (cykloheksan/eddikester = 3/2) gav 28,8 g (0,049 mmol, 89%) "Eksempel 50".

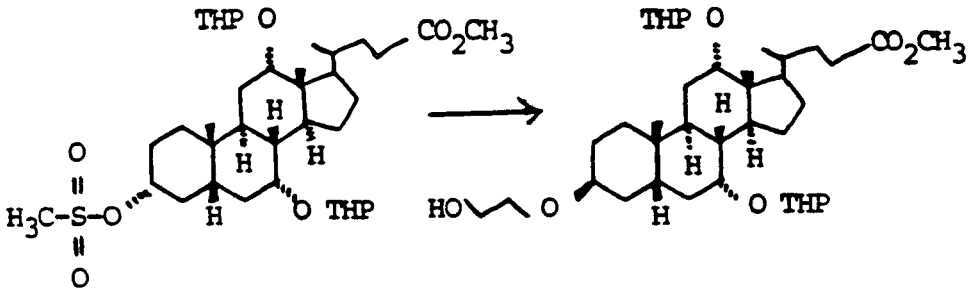
$C_{35}H_{58}O_7$ (590), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 597 ($M+Li^+$).

Eksempel 51



I analogi til Eksempel 10 ble det fra 28,8 g (0,048 mol) Eksempel 14 utvunnet 30,3 g (0,045 mol, 94%) mesylat "Eksempel 51".

Eksempel 52

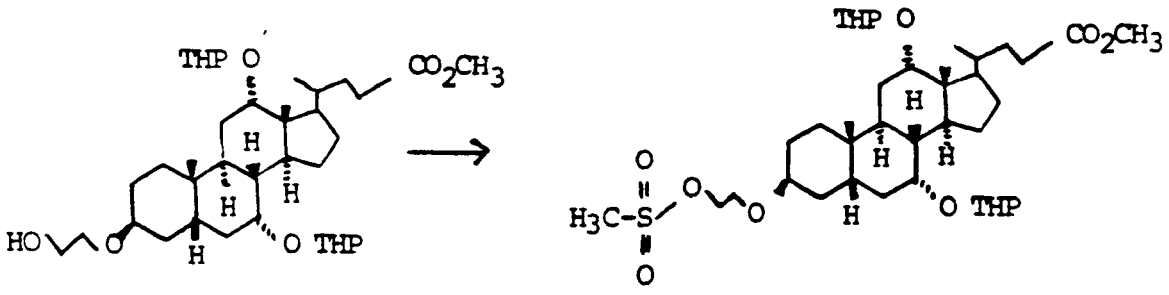


a) 46,0 g (0,068 mol) mesylat "Eksempel 51" ble kokt med 300 ml etylenglykol/75 ml trietylamin i 2,5 timer under tilbakestrømming. Reaksjonsblandingen ble tømt i 1n saltsyre og ekstrahert med dietyleter (2 ganger). De forenede organiske fasene ble vasket en gang med vann, to ganger med mettet vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning, tørket ($MgSO_4$) og befridd fra oppløsningsmiddel. Resten ble tatt ut med toluol og inndampet (2 ganger).

b) Resten ble oppløst i 500 ml tørket metanol, blandet med 40,0 g kaliumkarbonat og omrørt i 1,5 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble vidtgående befridd for metanol i vakuum og resten tømt i 2n saltsyre/toluol. Den vandige fasen ble ekstrahert to ganger med toluol, de forenede organiske fasene ble vasket en gang med mettet vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning, tørket ($MgSO_4$) og inndampet. Flashkromatografi på kiselgel (cykloheksan/eddikester = 2/1) gav 25,6 g (0,040 mol, 60%) "Eksempel 52".

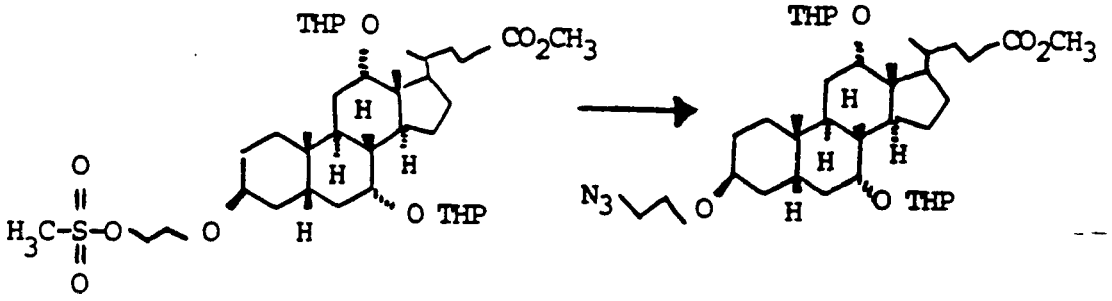
$C_{37}H_{62}O_8$ (634), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 641 ($M+Li^+$).

Eksempel 53



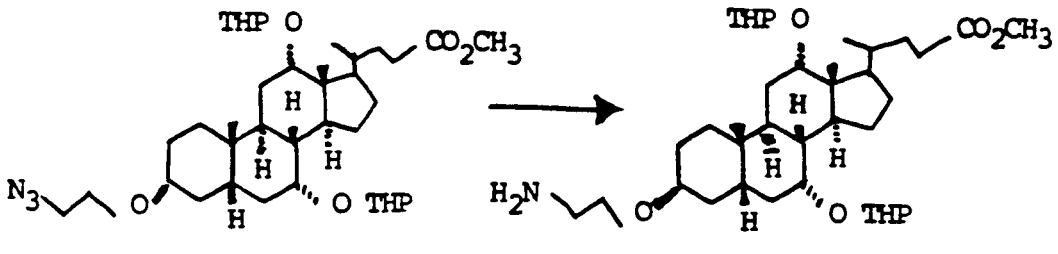
I analogi til Eksempel 19 ble "Eksempel 53" oppnådd.

Eksempel 54



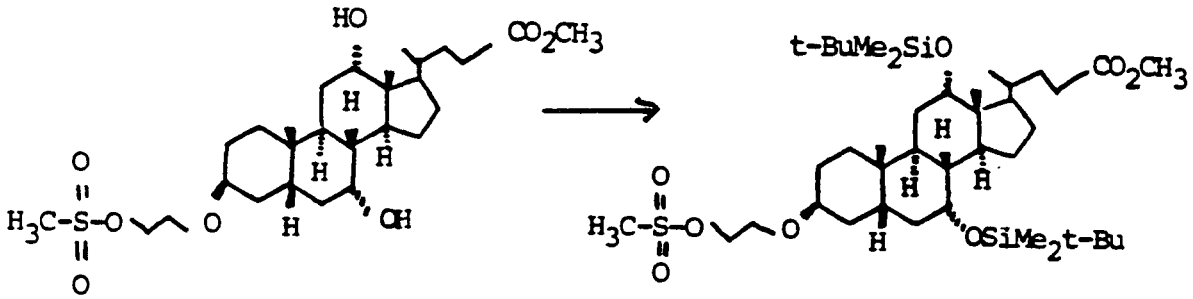
I analogi til Eksempel 20 ble "Eksempel 54" oppnådd.

Eksempel 55



I analogi til Eksempel 21 ble "Eksempel 55" oppnådd.
$C_{37}H_{63}NO_7$ (633), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 640 ($M+Li^+$).

Eksempel 56

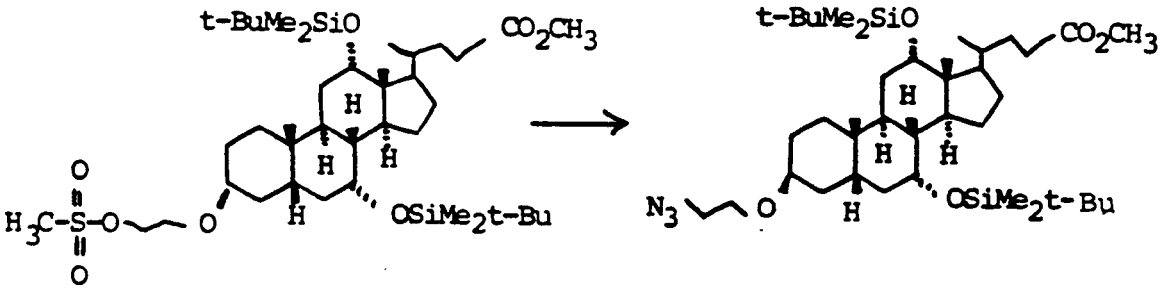


Til en oppløsning med 24,5 g (0,045 mol) "Eksempel 19" og 26,4 ml (0,227 mol) 2,6-dimetylpyridin i 150 ml diklormetan

ble ved 0°C 31,2 ml (0,136 mol) tert-butyldimetylsilyltriflat dråpevis tilsatt. Man lot det omrøres 15 minutter ved 0°C og 2 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i mettet vandig $NaHCO_3$-løsning og ekstrahert med diklormetan (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med magnesiumsulfat og inndampet. Flashkromatografi på kiselgel (eddikester/cykloheksan = 1/3) gav 23,5 g (0,03 mol, 67%) "Eksempel 56".

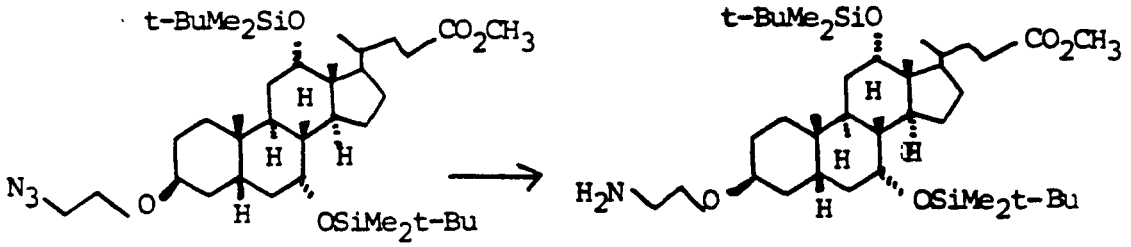
$C_{40}H_{76}O_8Si_2S$ (772), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 779 ($M+Li^+$).

Eksempel 57



23,4 g (0,03 mol) Eksempel 56 ble analog til Eksempel 20 kvantitativt overført til azidet "Eksempel 57".

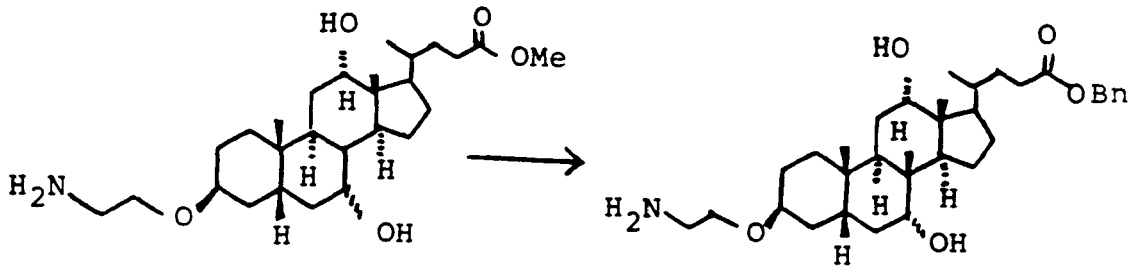
Eksempel 58



Azidet "Eksempel 57" ble hydratisert i analogi til Eksempel 21. Utbytte etter kromatografi på kiselgel (eddikester/MeOH/NEt_3 = 18/1/1) 10,0 g (0,014 mmol, 48%) med hensyn til 0,03 mol "Eksempel 56".

$C_{39}H_{75}NO_5Si_2$ (693), MS (FAB, 3-BNA/LiJ): 700 ($M+Li^+$).

Eksempel 59

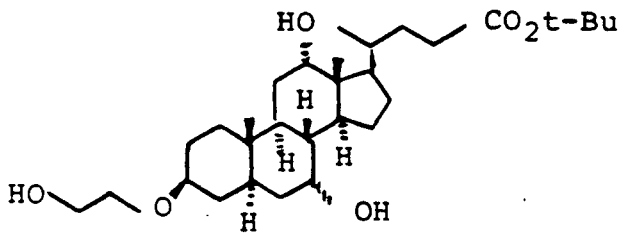


Bn = Benzyl

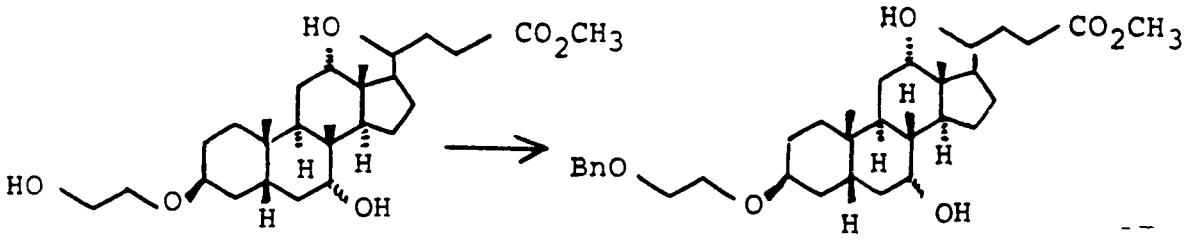
En oppløsning med 500 mg (1,07 mmol) Eksempel 21 og 76 mg (0,33 mmol) tetraetylortotitanat i 10 ml tørr benzylalkohol ble omrørt i 8 timer ved 100°C. Etter avkjøling ble 100 ml eddikester tilsatt. Blandingen ble rystet med 1N HCl (1 gang) og 8% $NaHCO_3$-oppløsning (1 gang). Den organiske fasen ble tørket med $MgSO_4$ og inndampet. Kromatografi på kiselgel (eddikester/metanol/NEt_3 5:1:1) gav 360 mg (6,64 mmol, 62%) benzylester "Eksempel 59".

$C_{33}H_{51}NO_5$ (541), MS (FAB): 542 ($M+H^+$).

Eksempel 60



Eksempel 60a



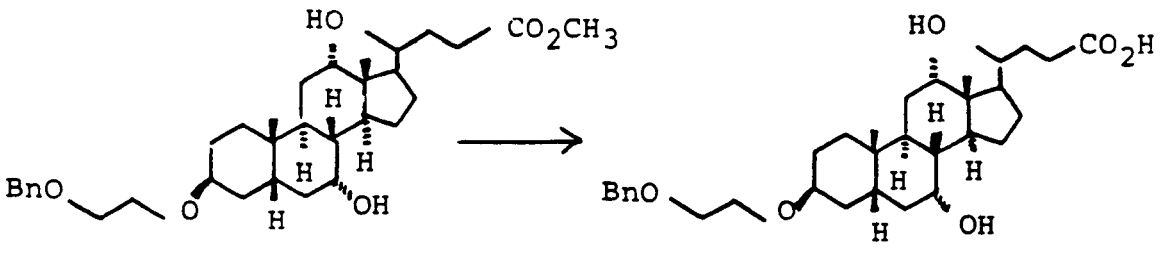
Bn = Benzyl

42 g (0,09 mol) Eksempel 11 ble omrørt i 270 ml N-etyldiisopropylamin med 61,5 g (0,36 mol) benzylbromid i 3 timer ved 100°C (badtemperatur). Deretter ble reaksjonsproduktet tømt i en blanding med 1,8 liter vann og 180 ml konsentrert svovelsyre og ekstrahert med eddikester (2 ganger). De forenede organiske fasene ble vasket en gang med 1N saltsyre, vann og mettet, vandig $NaHCO_3$-oppløsning, tørket over $MgSO_4$ og inndampet.

Kromatografi av resten på kiselgel med eddikester/cykloheksan = 1/1 gav 14,54 g (0,026 mol, 29,0%) "Eksempel 60a".

$C_{34}H_{52}O_6$ (556), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 563/M+Li$^+$).

Eksempel 60b



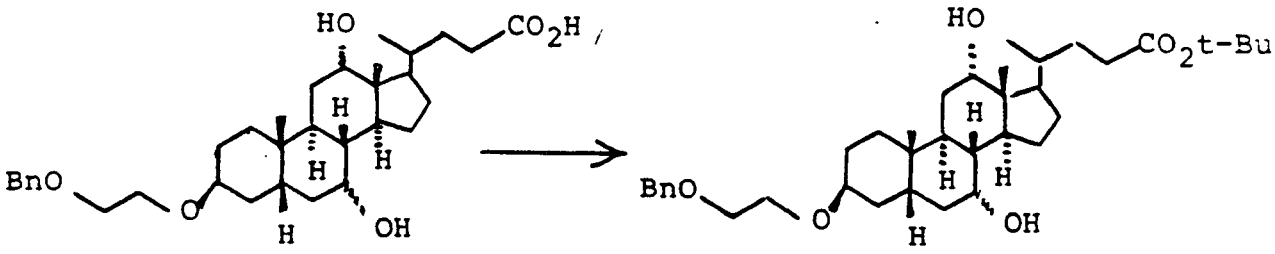
16,14 g (0,029 mol) Eksempel 60a ble oppløst i 450 ml metanol, blandet med 37 ml (0,037) 1 N vandig natronlut og kokt i 8 timer under tilbakestrømming. Deretter ble metanolet tatt av i rotasjonsinndamper, resten løst i 320 ml vann og blandet med 37 ml (0,037 mol) 1 N vandig saltsyre. Den

dannede syren ble ekstrahert med eddikester (2 ganger). De forenede organiske fasene ble vasket 2 ganger med vann, tørket over $MgSO_4$ og inndampet. Den krystallinske resten ble anriket med 150 ml diisopropyleter, suget av og tørket i vakuum. Det ble oppnådd 13,85 g (0,025 mol, 88,0%) "Eksempel 60b" med smeltepunkt 144-146°C.

$C_{33}H_{50}O_6$ (542), MS (FAB, 3-NBA/TFA): 565 ($M+Na^+$).

--

Eksempel 60c



a) Anhydriddannelse

13,8 g (0,0254 mol) Eksempel 60b ble oppløst i 250 ml abs. tetrahydrofuran og 7,69 g (0,0762 mol) trietylamin. Ved romtemperatur ble det dråpevis tilsatt 6,28 (0,03 mol) 2,6-diklorbenzoylklorid og deretter omrørt i 3 timer under tilbakestrømming.

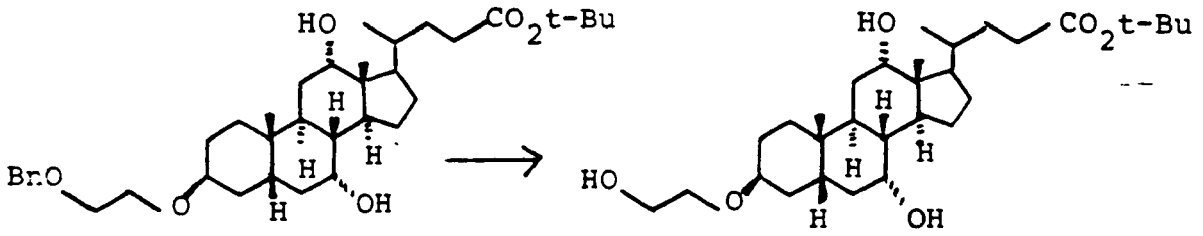
b) Esterdannelse

Den under a) fremstilte anhydridoppløsningen ble avkjølt til +10°C og etter hverandre blandet med 28,12 g (0,38 mol) tert. butanol og 3,1 g (0,0254 mol) 4-dimetylamino-pyridin, deretter ble det i løpet av 1 time oppvarmet til koking og omrørt i 4 timer under tilbakestrømming. Deretter ble reaksjonsblandingen vidtgående befridd for tetrahydrofuran i vakuum. Resten ble tatt ut i eddikester og gjennomvasket 3 ganger med vann, tørket med $MgSO_4$ og inndampet.

Kromatografi av resten på kiselgel med eddikester/cyklo-

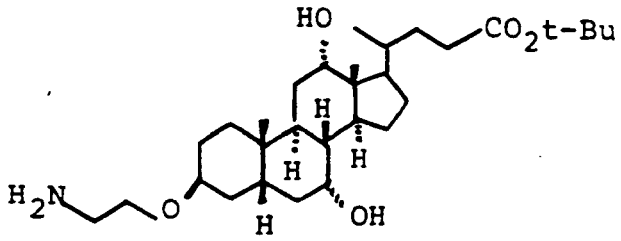
heksan = 1/1 gav 6,85 g "Eksempel 60c". (0,0114 mol, 45%). Smeltepunkt: 79-80°C.

Eksempel 60d



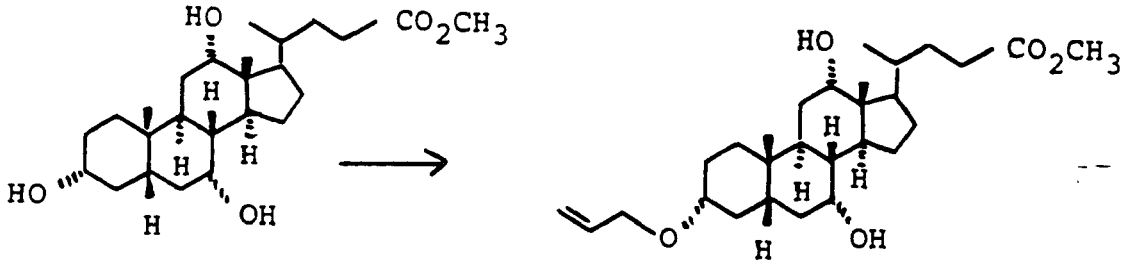
7,14 g (0,0119 mol) Eksempel 60c ble hydratisert i 250 ml eddikester over 1,5 g Pd/C-katalysator (10%) ved romtemperatur og normaltrykk. Etter avslutning av hydrogenopptaket ble katalysatoren filtrert av og filtratet inndampet. Det ble oppnådd 6,0 g "Eksempel 60d" (0,0117 mol, 98,9%)
$C_{30}H_{52}O_6$ (508), MS (FAB, 3-NBA/LiCl, 515 $M+Li^+$).

Eksempel 60e



I analogi til Eksemplene 19-28 ble det fra Eksempel 60d fremstilt "Eksempel 60e".
$C_{30}H_{53}N\ O_5$ (507); MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 514 ($M+Li^+$).

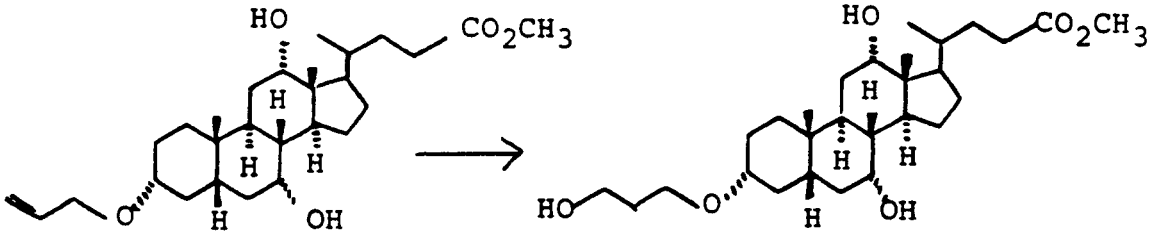
Eksempel 61



42,2 g (0,1 mol) kolsyremetylester, 300 ml (1,8 mol) N-etyldiisopropylamin og 10 ml (0,12 mol) allylbromid ble oppvarmet i 8 timer under tilbakestrømming. Etter hver times reaksjonstid ble ytterligere hver gang 5 ml allylbromid tilsatt (DC-kontroll, cykloheksan/eddikester = 1:1). Reaksjonsblandingen ble tømt i 400 ml kons. H_2SO_4/2.000 ml vann og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble vasket med 1 N HCl, vann og mettet $NaHCO_3$-oppløsning. Tørking ($MgSO_4$), avtaging av oppløsningsmiddelet og kromatografi av resten på kiselgel (n-heptan/eddikester = 4:1 —> 3:1 —> 2:1) gav 21,91 g (0,047 mol, 47%) "Eksempel 61".

$C_{28}H_{46}O_5$ (462), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 469 ($M+Li^+$).

Eksempel 62



(1) Fremstilling av teksylboran: Under argonatmosfære ble det ved 0°C til 85 ml 1 molar BH_3.THF-oppløsning (THF) tilsatt 85 ml 1 molar 2,3-dimetylbutenoppløsning (THF). Man lar det omrøres ved 0°C.

(2) Hydroborering: Til den etter (1) fremstilte oppløsningen ble det ved 0°C dråpevis tilsatt 8,6 g (18,59 mmol) olefin Eksempel 61 i 25 ml THF. Etter 3 timer ved 0°C lar man temperaturen stige til romtemperatur (DC-kontroll). Etter 16 timer ved romtemperatur ble frisk fremstilt teksylboranoppløsning (THF) dråpevis tilsatt. Man lar den på nytt omrøres ved romtemperatur. Etter at ikke noe utgangsmateriale kan påvises, ble reaksjonsblandingen forsiktig overført under argonatmosfære under intensiv omrøring i vandig natronlut (pr. ekvivalent boran 1 ekvivalent NaOH). Deretter ble det under isavkjøling dråpevis tilsatt 30 prosent hydrogenperoksidoppløsning. (2 ekvivalenter pr. 1 ekvivalent boran). Etter 20 min. ved 0°C ble det oppvarmet i 30 min. til 50°C. For bedre faseadskillelse ble mettet koksaltoppløsning tilsatt. Den vandige fasen ble ekstrahert med etylacetat (2 ganger) og de forenede organiske fasene ble vasket med mettet natriumbisulfitt-oppløsning (2 ganger) og deretter med natriumkloridoppløsning (1 gang). Tørking med $MgSO_4$, avtaging av oppløsningsmiddelet og kromatografi på kiselgel (etylacetat —> etylacetat/MeOH = 20:1) gav 5,0 g (10,4 mmol, 56%) "Eksempel 62".

Rf (etylacetat): 0,18

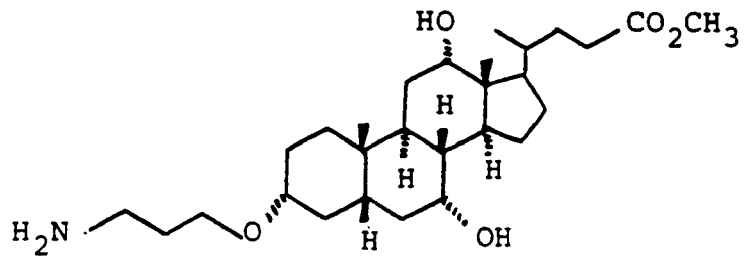
$C_{28}H_{48}O_6$ (480); MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 487 ($M+Li^+$).

Deretter ble 1,0 g av den sekundære alkoholen oppnådd.

Rf (etylacetat): 0,27.

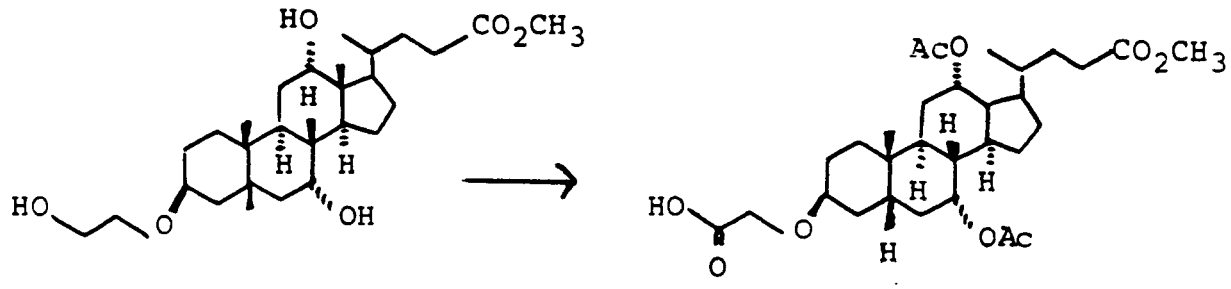
Eksempel 63

I analogi til Eksemplene 19-28 ble "Eksempel 63" oppnådd fra Eksempel 62.

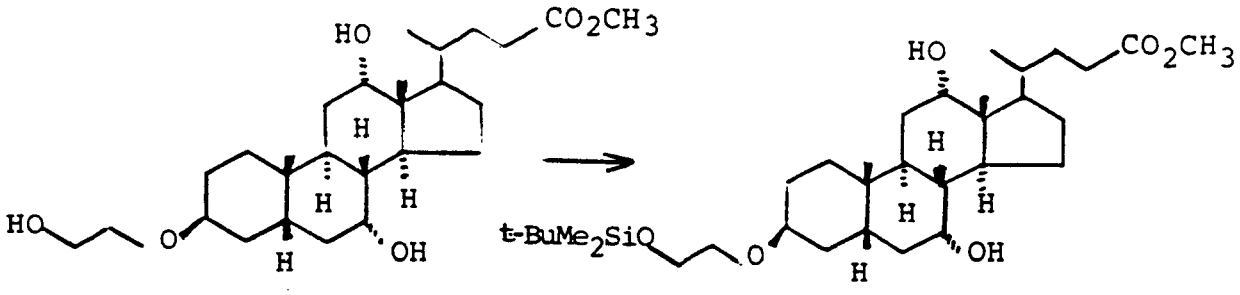


(X-G med α-konfigurasjon i 3-C)
$C_{28}H_{49}NO_5$ (479); MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 486 ($M+Li^+$).

Eksempel 64



Trinn a)

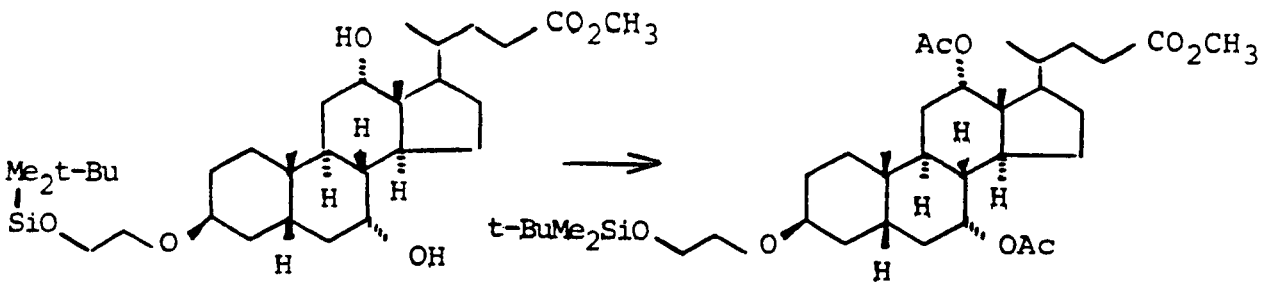


75 g (0,161 mol) Eksempel 11 ble omrørt med 21,6 g (0,177 mol) 4-dimetylaminopyridin og 26,7 g (0,177 mol) tert.-butyldimetylsilylklorid i 500 ml tørr diklormetan i 4 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen blir tømt i vann og

ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene blir tørket ($MgSO_4$) og inndampet. Utbytte 93,6 g (kvantitativ) silyleter. Til preparative formål var det ikke nødvendig med en videre rensing.

$C_{33}H_{60}O_6Si$ (580); MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 587 $M+Li^+$).

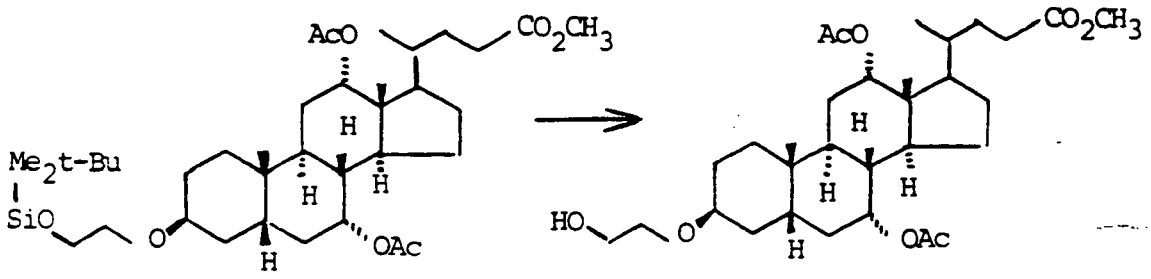
Trinn b)



Til 10 g (0,0172 mol) av den utvunnede silyleter ifølge trinn a) og 5,3 g (0,043 mol) 4-dimetylaminopyridin i 100 ml tørr pyridin ble det ved 0°C dråpevis tilsatt 4,1 ml (0,043 mol) eddiksyreanhydrid. Man lar det omrøres i 4 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i vann og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble vasket med mettet vandig $NaHCO_3$-oppløsning og tørket ($MgSO_4$). Avdamping av oppløsningsmiddelet og kromatografi på kiselgel (eddikester/cykloheksan = 1/3) gav 10 g (0,015 mol, 87,7%) diacetat.

$C_{37}H_{64}O_8Si$ (664); MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 671 ($M+Li^+$).

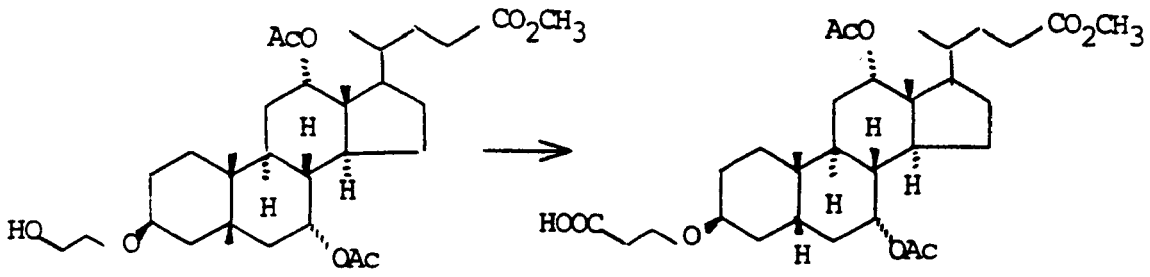
Trinn c)



10 g (0,015 mol) av den utvunnede diacetat ifølge trinn b) ble omrørt med 5,2 g (0,0165 mol) tetrabutylammoniumfluoridtrihydrat i 100 ml tetrahydrofuran i 1 time ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i vann og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket ($MgSO_4$) og inndampet. Kvantitativt utbytte av alkohol. Til preparative formål er det ikke nødvendig med en videre rensing.

$C_{31}H_{50}O_8$ (550); MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 557 ($M+Li^+$).

Trinn d)

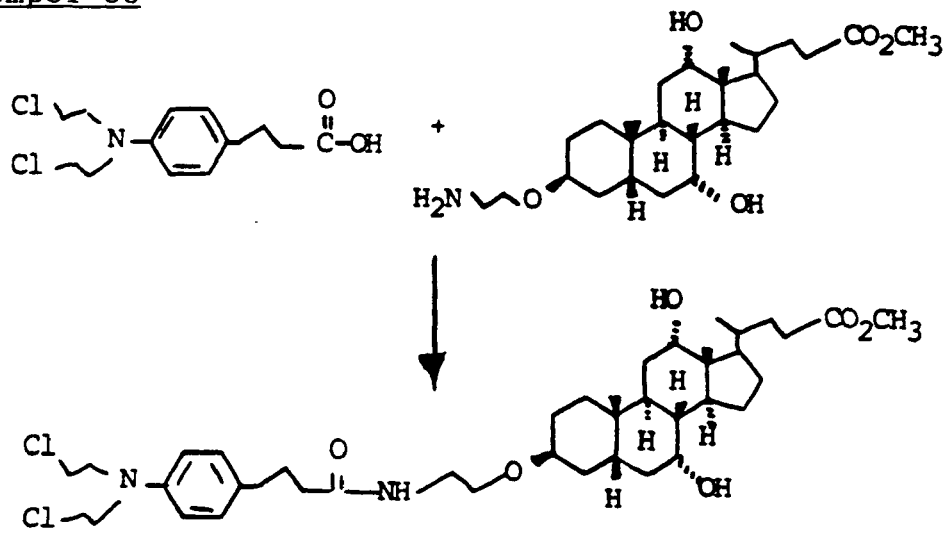


7,35 g (0,0133 mol) av den utvunnede alkoholen ifølge trinn c) ble omrørt med 50 g (0,133 mol) pyridiniumdikromat i 150 ml tørr dimetylformamid i 24 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i vann og ekstrahert med dietyleter (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket ($MgSO_4$) og inndampet. Kromatografi på kiselgel (eddikester/cykloheksan = 9/1) gav 5,1 g (0,009 mol, 58%) "Eksempel 64".

$C_{31}H_{48}O_9$ (564); MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 571 ($M+Li^+$).

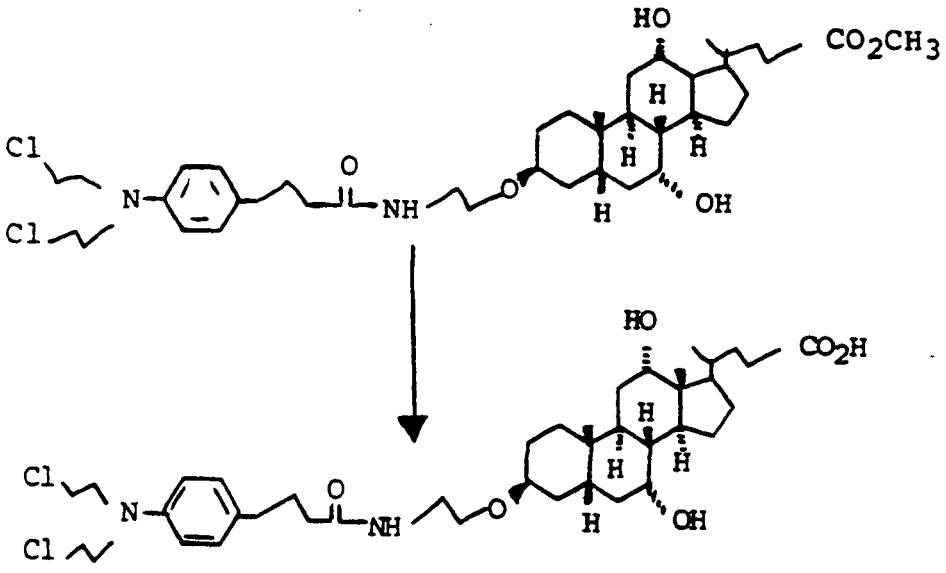
3. W-X-G, X = et mellomledd

Eksempel 65



Til 1,96 g (6,44 mmol) klorambucil (Sigma) i 100 ml THF/ 20 ml trietylamin ble det ved 0°C dråpevis tilsatt 0,62 ml (6,44 mmol) klormaursyreetylester og omrørt i 15 min. Ved 0°C ble 3,0 g (6,44 mmol) Eksempel 21, oppløst i THF, dråpevis tilsatt og deretter omrørt i 30 min. ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i vann og ekstrahert tre ganger med eddikester. De forenede organiske fasene ble tørket ($MgSO_4$) og inndampet. Kromatografi på kiselgel (eddikester/ metanol = 9/1) gav 3,9 g (5,2 mmol, 81%) "Eksempel 65".
Smp.: 45-50°C.
$C_{41}H_{64}Cl_2N_2O_6$ (750), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 751 ($M+Li^+$).

Eksempel 66

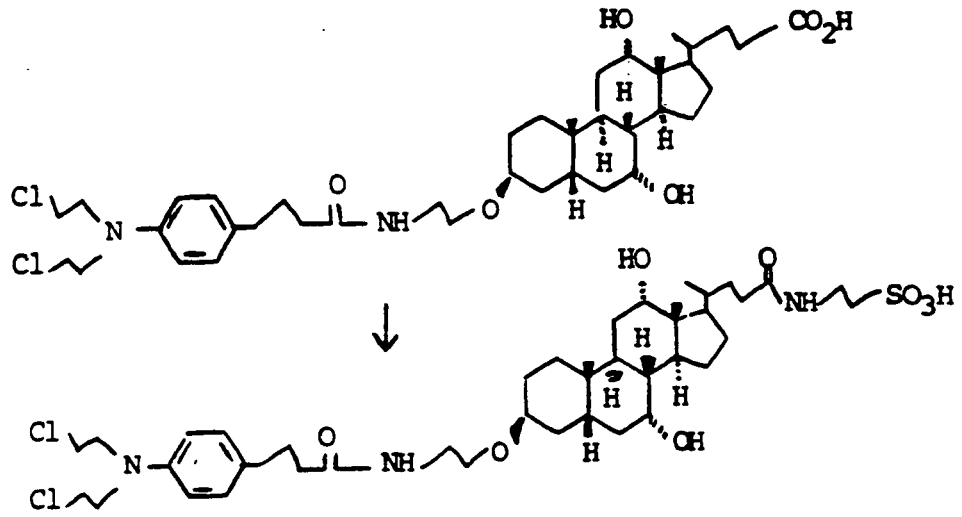


Til en løsning med 1,96 g (2,6 mmol) Eksempel 65 i 20 ml etanol drypper man 5 ml 1n vandig natronlut. Etter 3 timer ved romtemperatur ble ytterligere 5 ml 1n vandig natronlut tilsatt og omrørt videre i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble tømt i 200 ml vann, nøytralisert med 1n vandig saltsyre og ekstrahert tre ganger med eddikester. De forenede organiske fasene ble tørket ($MgSO_4$) og inndampet.

--

Utbytte: 1,91 g (2,6 mmol, kvant.) "Eksempel 66"
Smp.: 60-70°C
$C_{40}H_{62}Cl_2N_2O_6$ (736), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 743 ($M+Li^+$).

Eksempel 67



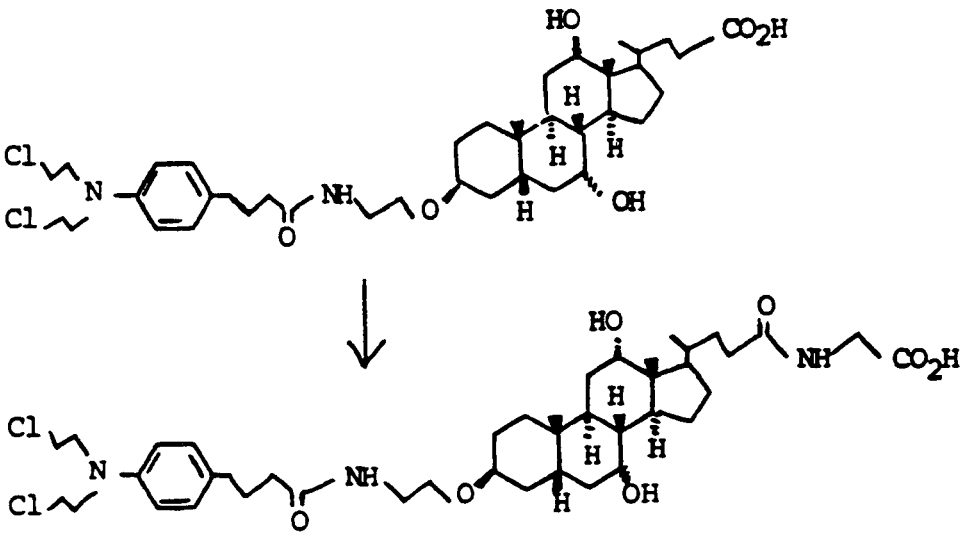
Til en oppløsning med 1,5 g (2,03 mmol) Eksempel 66 og 0,97 ml (4,06 mmol) tri-n-butylamin i 10 ml dioksan ble det ved 0°C dråpevis tilsatt 0,2 ml (2,03 mmol) klormaursyreetylester og omrørt i 15 min. ved 0°C. Deretter ble en løsning med 0,508 g (4,06 mmol) taurin i 4 ml 1n vandig natronlut ved 0°C dråpevis tilsatt. Man lar det omrøres i 1 time ved romtemperatur, tømmer i 200 ml vann og nøytraliserer med 1n vandig saltsyre. Det ble ekstrahert med eddikester under tilsetning av litt metanol (3 ganger) og de forenede organiske fasene tørkes ($MgSO_4$). Avtaging av oppløsnings-

middelet og flashkromatografi på kiselgel (eddikester/metanol = 4/1, deretter 2/1) gav 1,59 g (1,89 mol, 93%) "Eksempel 67".

Smp.: 130-140°C

$C_{42}H_{67}Cl_2N_3O_8S$ (843), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 856 ($M+Li^+-H$).

Eksempel 68



Til en oppløsning med 1,5 g (2,03 mmol) Eksempel 66 og 0,97 ml (4,06 mmol) tri-n-butylamin i 10 ml dioksan ble det ved 0°C dråpevis tilsatt 0,2 ml (2,03 mmol) klormaursyreetylester og omrørt i 15 min. ved 0°C. Deretter ble en oppløsning med 0,305 g (4,06 mmol) glysin i 4,0 ml 1n vandig natronlut tilsatt og omrørt i 4 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble tømt i 200 ml vann, nøytralisert med 1n vandig saltsyre og ekstrahert med eddikester. De forenede organiske fasene ble tørket ($MgSO_4$), inndampet og flashkromatografert på kiselgel (eddikester/metanol = 2/1).

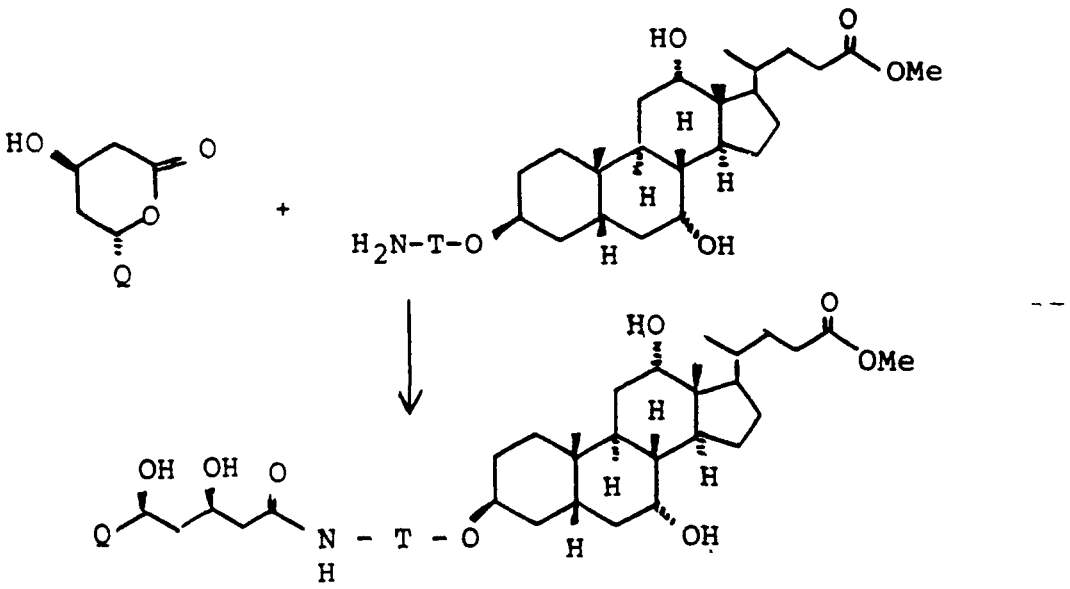
Utbytte: 1,15 g (1,45 mmol, 71%) "Eksempel 68".

Smp.: 75-85°C

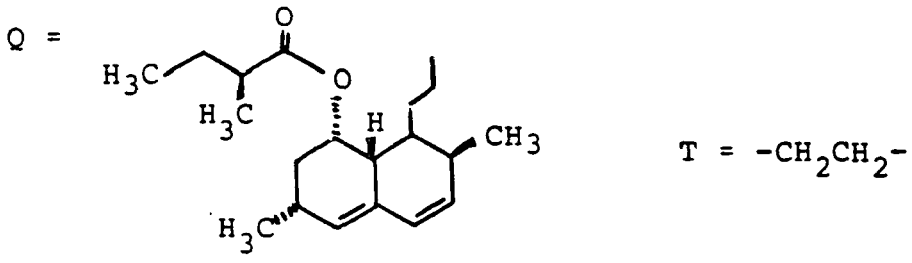
$C_{42}H_{65}Cl_2N_3O_7$ (793), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 806 ($M+2\ Li^+-H$).

Til: W-X-G, med X = et mellomledd.

Eksemplene 69-78



Eksempel 69



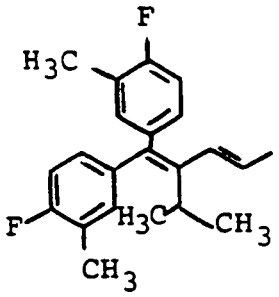
En blanding av 750 mg (1,61 mg) Eksempel 21, 5 ml trietylamin, 200 mg (1,61 mmol) dimetylaminopyridin (DMAP) og 651 mg (1,61 mmol) mevinolin i 25 ml tørr THF ble oppvarmet i 48 timer under tilbakestrømming. Oppløsningsmiddelet ble tatt av og resten kromatografert på kiselgel (eddikester/MeOH = 19:1).

Utbytte: 900 mg (1,03 mmol, 64%) "Eksempel 69"

Smp.: 78-80°C

$C_{51}H_{83}NO_{10}$ (869), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 876 ($M+Li^+$).

Eksempel 70

Q = 

T = $-CH_2CH_2-$

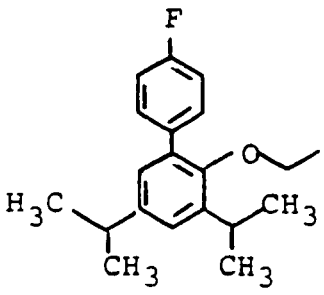
Analogt til Eksempel 69 ble det med Eksempel 21 oppnådd "Eksempel 70".

Smp.: 70-75°C

$C_{53}H_{75}F_2NO_2$ (891), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 898 ($M+Li^+$).

(Til fremstilling av laktonkomponenten se DE 37.22.807-A); se Tetrahedron Letters 29, 929-930 [1988], der det er beskrevet forbindelser uten de med F nabostilte metylgruppene).

Eksempel 71

Q = 

T = $-CH_2CH_2-$

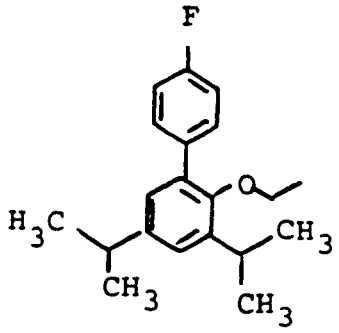
Analogt til Eksempel 69 ble det med Eksempel 21 oppnådd "Eksempel 71".

Smp.: 65-70°C.

$C_{51}H_{76}FNO_9$ (865), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 872 ($M+Li^+$).

(Til fremstilling av laktonkomponenten se DE 38.19.999-A), Eksempel 1 se også beskrivelsen før den farmakologiske delen i foreliggende søknad).

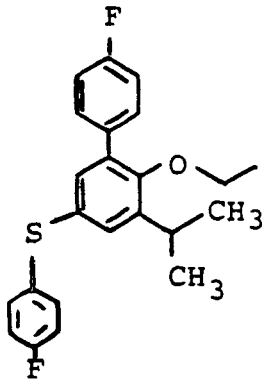
Eksempel 72

Q = 

T = $-CH_2CH_2CH_2-$

Analogt til 69 ble det med Eksempel 22 oppnådd "Eksempel 72". $C_{52}H_{78}FNO_9$ (879), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 886 ($M+Li^+$).

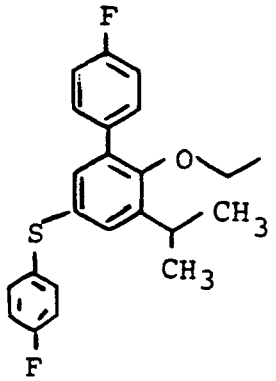
Eksempel 73

Q = 

T = $-CH_2CH_2-$

Analogt til 69 ble det med Eksempel 21 oppnådd "Eksempel 73". $C_{54}H_{73}F_2NO_9S$ (949), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 956 ($M+Li^+$).
(Til fremstilling av laktonkomponenten se DE P 39.29.913).

Eksempel 74

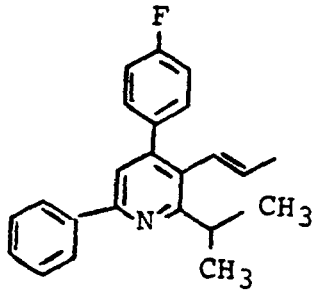
Q = 

T = $-CH_2CH_2CH_2-$

Analogt til 69 ble det med Eksempel 22 oppnådd "Eksempel 74".
$C_{55}H_{75}F_2NO_9S$ (963), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 970 ($M+Li^+$).

Eksempel 75

Q =

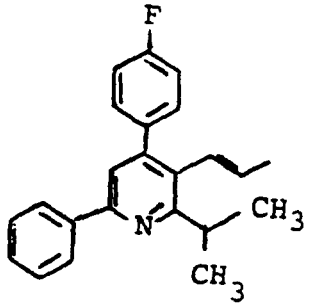


T = $-CH_2CH_2-$

Analogt til 69 ble det med Eksempel 21 oppnådd "Eksempel 75".
Smp.: 74-76°C.
$C_{54}H_{73}FN_2O_8$ (896), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 903 ($M+Li^+$).

Eksempel 76

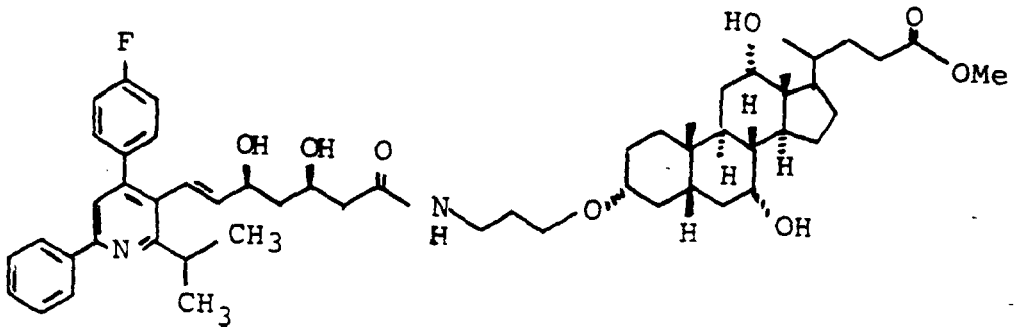
Q =



T = $-CH_2CH_2CH_2-$

Analogt til 69 ble det med Eksempel 22 oppnådd "Eksempel 76".
$C_{55}H_{75}FN_2O_8$ (910), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 917 ($M+Li^+$).

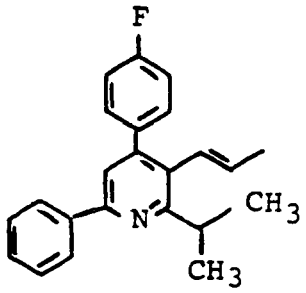
Eksempel 77



Analogt til 69 ble det med Eksempel 63 oppnådd "Eksempel 77". $C_{55}H_{75}FN_2O_8$ (910), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 917 ($M+Li^+$).

Eksempel 78

Q =

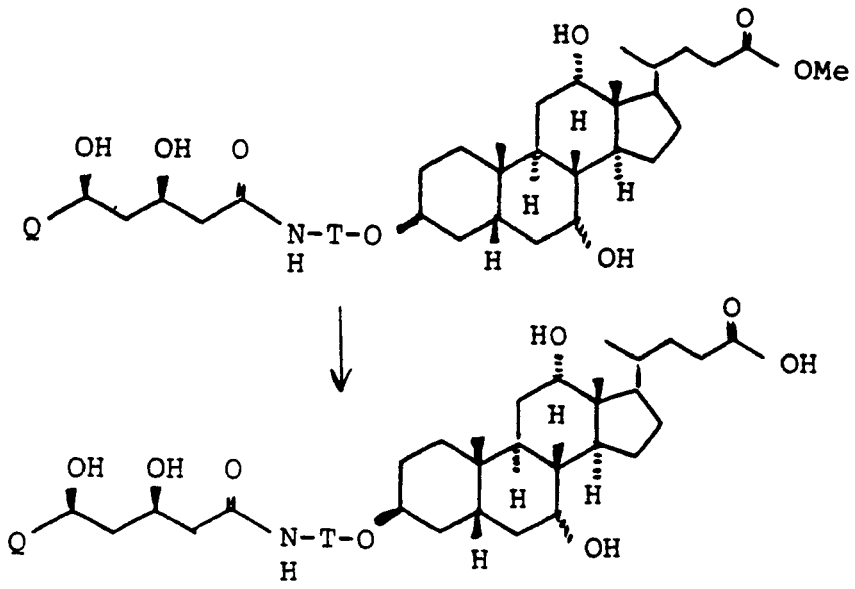


T = $-CHCH_2-$ (CH_3)

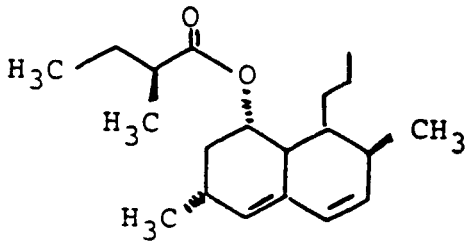
Analogt til 69 ble det med Eksempel 28 oppnådd "Eksempel 78". $C_{55}H_{75}FN_2O_8$ (910), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 917 ($M+Li^+$).

Eksemplene 79-88

Variant A

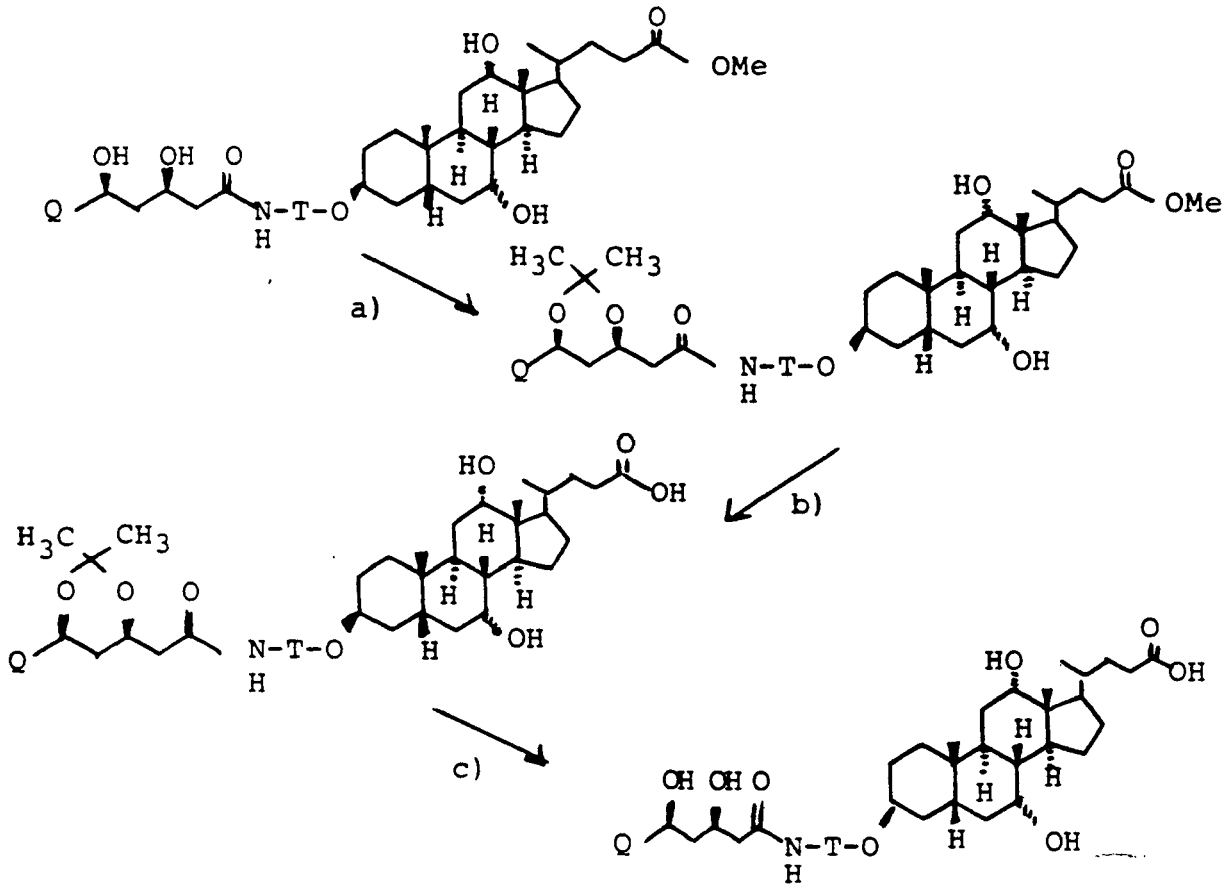


Eksempel 79

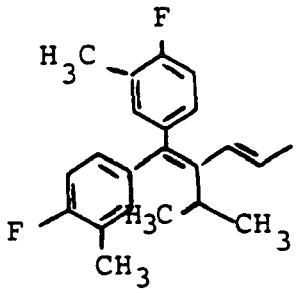
Q =  T = $-CH_2CH_2-$

250 mg (0,29 mmol) Eksempel 69 ble oppløst i 5 ml etanol og blandet med 2,0 ml 1N vandig natronlut. Etter 6 timers omrøring ved romtemperatur ble det nøytralisert med 1N saltsyre og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med $MgSO_4$ og inndampet.
Utbytte 230 mg (0,27 mmol, 94%) "Eksempel 79".
$C_{50}H_{81}NO_{10}$ (855), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 862 ($M+Li^+$).

Variant B



Eksempel 80

Q = 

T = $-CH_2CH_2-$

a) 400 mg (0,45 mmol) Eksempel 70 og en krystall p-toluolsulfonsyre ble oppløst i 20 ml aceton/dimetoksypropan 1:1 og omrørt ved romtemperatur. Etter 15 min. ble oppløsningsmiddelet inndampet og resten kromatografert på kiselgel (kloroform/metanol 19:1).
Utbytte 390 mg (0,42 mol, 93%) acetonid.
$C_{56}H_{79}F_2NO_8$ (931), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 938 ($M+Li^+$).

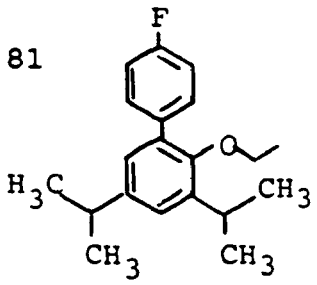
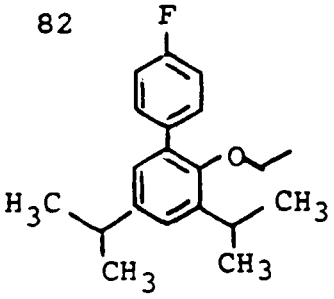
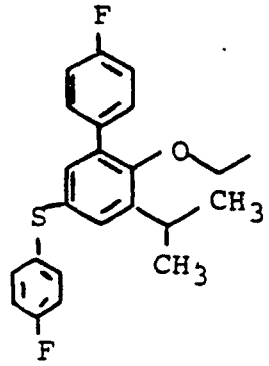
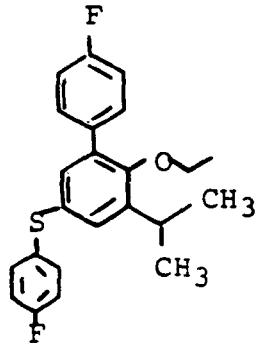
b) 390 mg (0,42 mmol) acetonid ble oppløst i 20 ml etanol og blandet med 5 ml 1N vandig natronlut. Etter 5 timers omrøring ved romtemperatur ble det nøytralisert med 2N saltsyre og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med $MgSO_4$ og inndampet. Råproduktet ble omsatt uten videre rensing.

c) Råproduktet fra b) ble oppløst i 20 ml THF og blandet med 5 ml 2N saltsyre. Etter 2 timers omrøring ble 100 ml vann tilsatt og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med $MgSO_4$ og inndampet. Flashkromatografi på kiselgel (diklormetan/metanol 9:1) gav 250 mg (0,29 mmol, 68%) "Eksempel 80c".
$C_{52}H_{73}F_2NO_8$ (877), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 884 ($M+Li^+$).

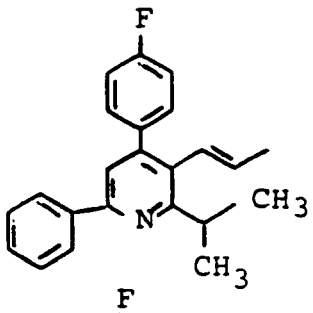
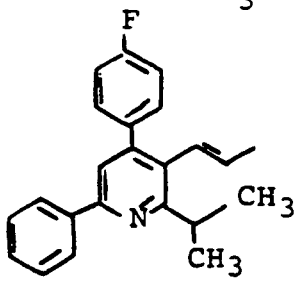
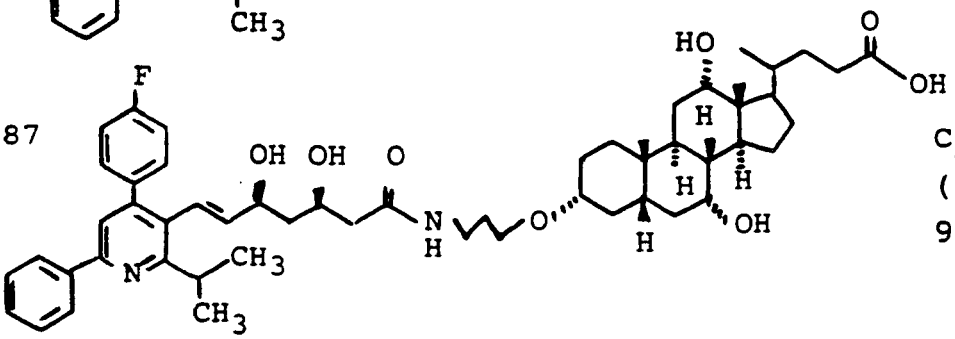
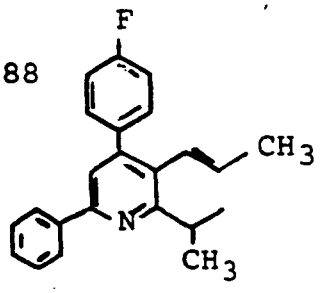
Eksemplene 81-88

Analogt til 79 eller 80 ble "Eksemplene 81-88" oppnådd fra 71-78.

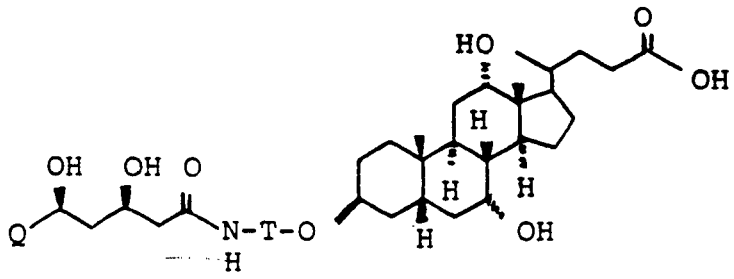
Tabell 6

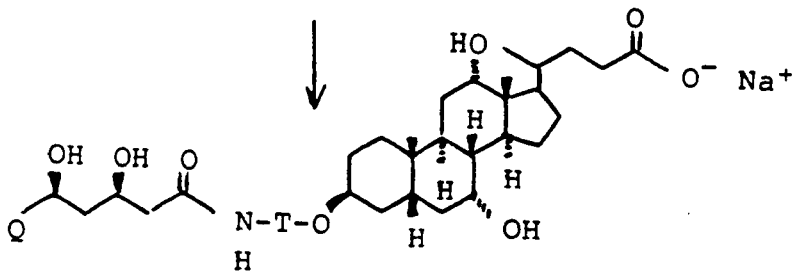
Eks.	Q	T	Utgangs-materiale	MS (FAB,3-NBA/ LiJ eller LiCl
81		$-CH_2CH_2-$	71	$C_{50}H_{74}FNO_9$ (851) 858 ($M+Li^+$)
82		$-CH_2CH_2CH_2-$	72	$C_{51}H_{76}FNO_9$ (865) 872 ($M+Li^+$)
83		$-CH_2CH_2-$	73	$C_{53}H_{71}F_2NO_9S$ (935) 936 ($M+H^+$)
84		$-CH_2CH_2CH_2-$	74	$C_{54}H_{73}F_2NO_9S$ (949) 956 ($M+Li^+$)

Fortsettelse Tabell 6

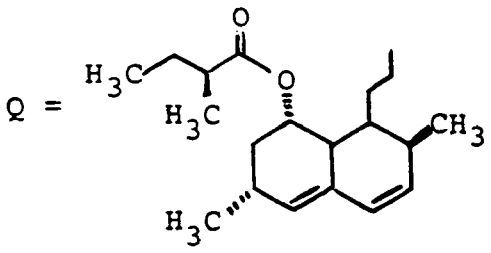
Eks.	Q	T	Utgangs-materiale	MS (FAB,3-NBA/ LiJ eller LiCl
85		$-CH_2CH_2-$	75	$C_{53}H_{71}FN_2O_3$ (882) 889 ($M+Li^+$)
86		$-CH_2CH_2CH_2-$	76	$C_{54}H_{73}FN_2O_8$ (896) 903 ($M+Li^+$)
87				$C_{54}H_{73}FN_2O_8$ (896) 903 ($M+Li^+$)
88		$-CH(CH_3)-CH_2-$	78	$C_{54}H_{73}FN_2O_8$ (896) 903 ($M+Li^+$)

Eksemplene 89-98





Eksempel 89



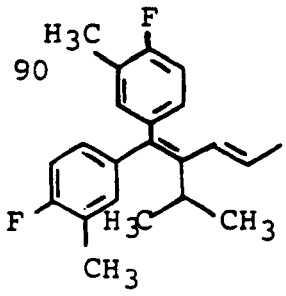
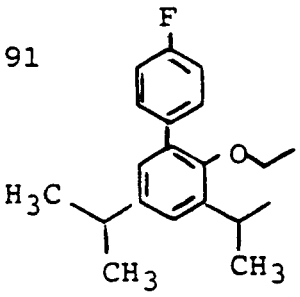
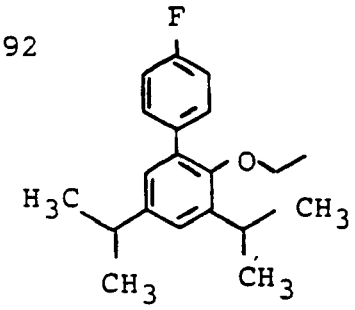
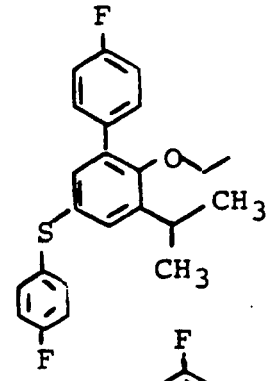
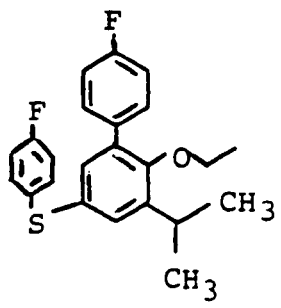
T = $-CH_2CH_2-$

150 mg (0,175 mmol) Eksempel 79 ble oppløst i 10 ml etanol og blandet med 1,75 ml 0,1 N vandig natronlut. Etter 10 minutters omrøring ved romtemperatur blir oppløsningsmiddelet inndampet. Utbytte 150 mg (kvant.) natriumsalt "Eksempel 89".

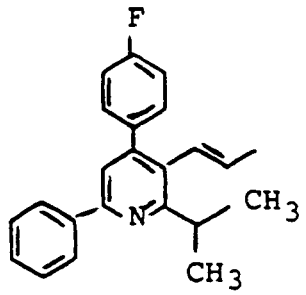
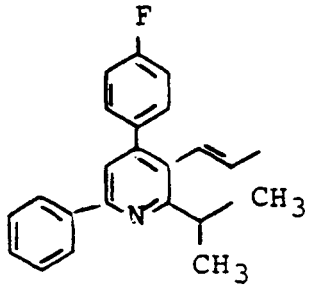
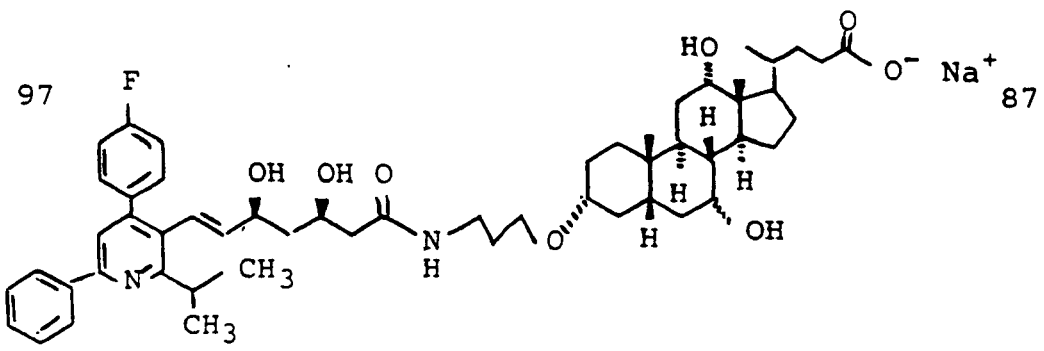
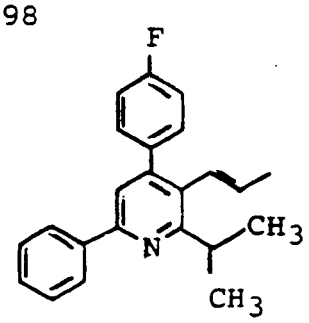
Eksemplene 90-98

Analogt til 89 ble "Eksemplene 90-98" oppnådd.

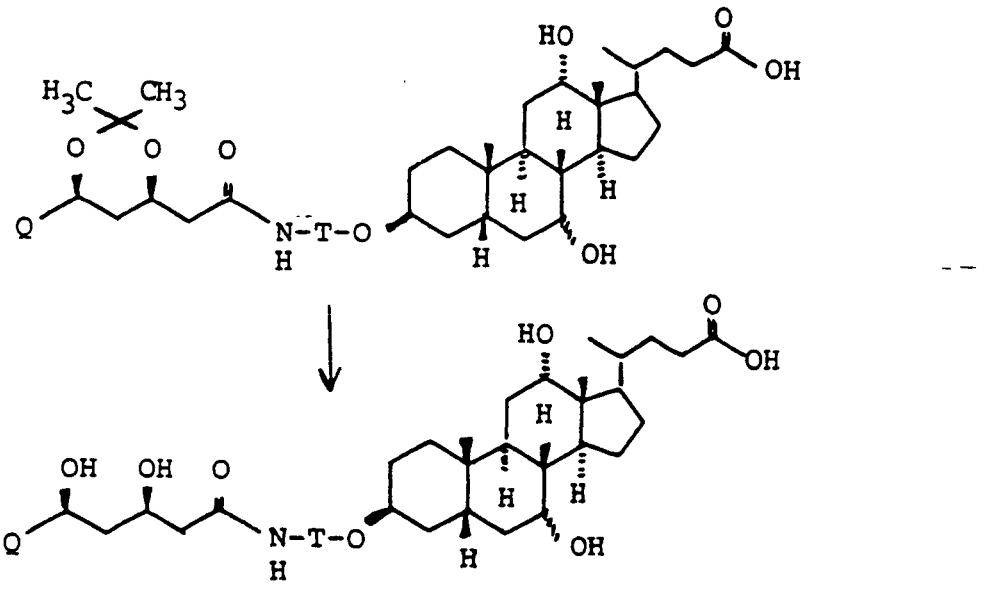
Tabell 7

Eks.	Q	T	Utgangsmateriale
90		$-CH_2CH_2-$	80
91		$-CH_2CH_2-$	81
92		$-CH_2CH_2CH_2-$	82
93		$-CH_2CH_2-$	83
94		$-CH_2CH_2CH_2-$	84

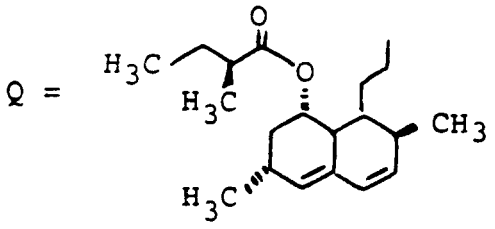
Fortsettelse Tabell 7

Eks.	Q	T	Utgangsmateriale
95		$-CH_2CH_2-$	85
96		$-CH_2CH_2CH_2-$	86
97			87
98		$-CHCH_2-$ (CH$_3$)	88

Eksemplene 99-108



Eksempel 99



T = $-CH_2CH_2-$

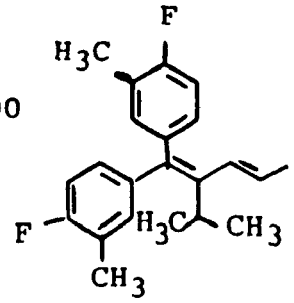
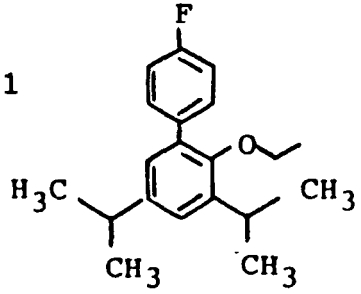
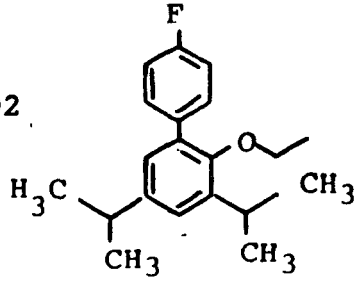
400 mg (0,45 mmol) acetonid fra 69 (se Eksemplene 79-88, variant B) ble oppløst i 40 ml absolutt THF, blandet med 0,12 ml (0,90 mmol) trietylamin og avkjølt til 0°C. Det ble tilsatt 0,07 ml (0,68 mmol) klormaursyreetylester og omrørt i 15 minutter. Deretter ble en løsning med 100 mg (1,3 mmol) glysin i 12 ml 0,1 N vandig natronlut dråpevis tilsatt. Det ble oppvarmet til romtemperatur og omrørt ytterligere 1 time. Blandingen ble tømt i vann, surgjort med 2N saltsyre og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med $MgSO_4$ og inndampet. Resten ble oppløst i 50 ml THF, blandet med 10 ml 1N saltsyre og omrørt ved romtemperatur i 4 timer. Den ble tømt i vann, ekstrahert med eddikester (3 ganger), de forenede organiske fasene tørket med $MgSO_4$ og inndampet.

Flashkromatografi på kiselgel (kloroform/metanol 7:3) gav 230 mg (0,25 mmol, 56%) "Eksempel 99".
$C_{52}H_{84}N_2O_{11}$ (912), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 919 ($M+Li^+$).

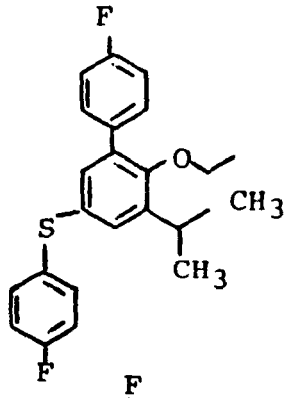
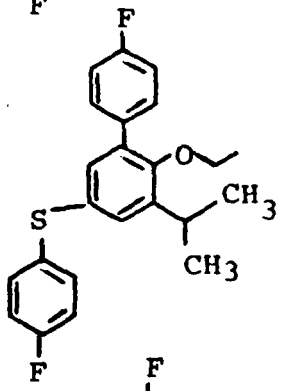
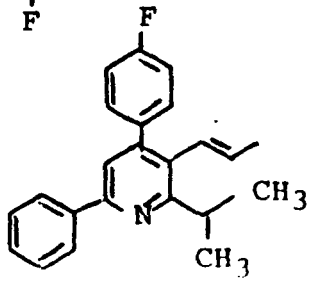
Eksemplene 100-108

Analogt til 99 ble "Eksemplene 100-108" oppnådd.

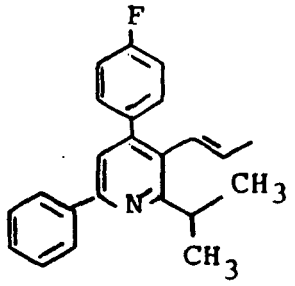
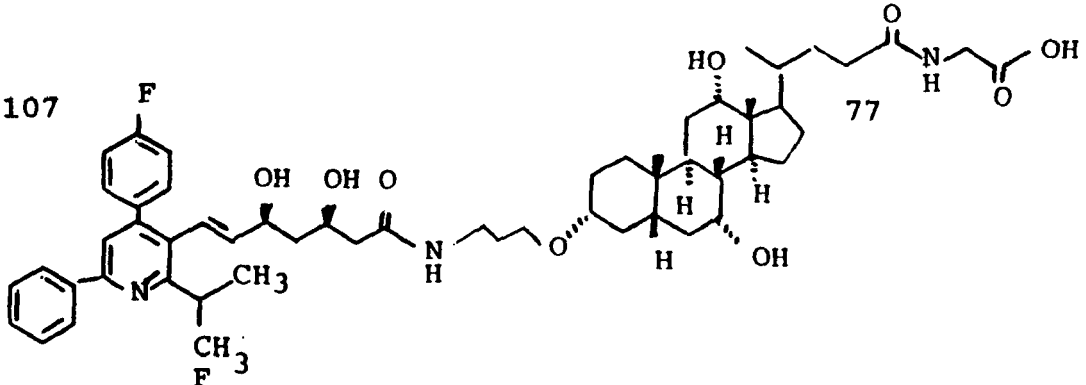
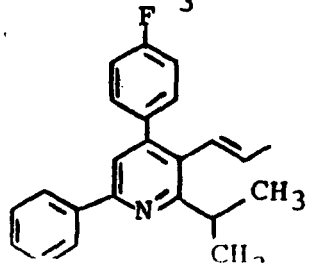
Tabell 8

Eks.	Q	T	Utgangsmateriale: Acetonid fra (se Eks. 79-88, variant B)	MS (FAB, 3-NBA) LiCl eller LiJ)
100		$-CH_2CH_2-$	70	$C_{54}H_{76}F_2N_2O_9$ (934) 941 ($M+Li^+$)
101		$-CH_2CH_2-$	71	$C_{52}H_{77}FN_2O_{10}$ (908) 935 ($M+Na^+$)
102		$-CH_2CH_2CH_2-$	72	$C_{53}H_{79}FN_2O_{10}$ (922) 929 ($M+Li^+$)

Tabell 8 (forts.)

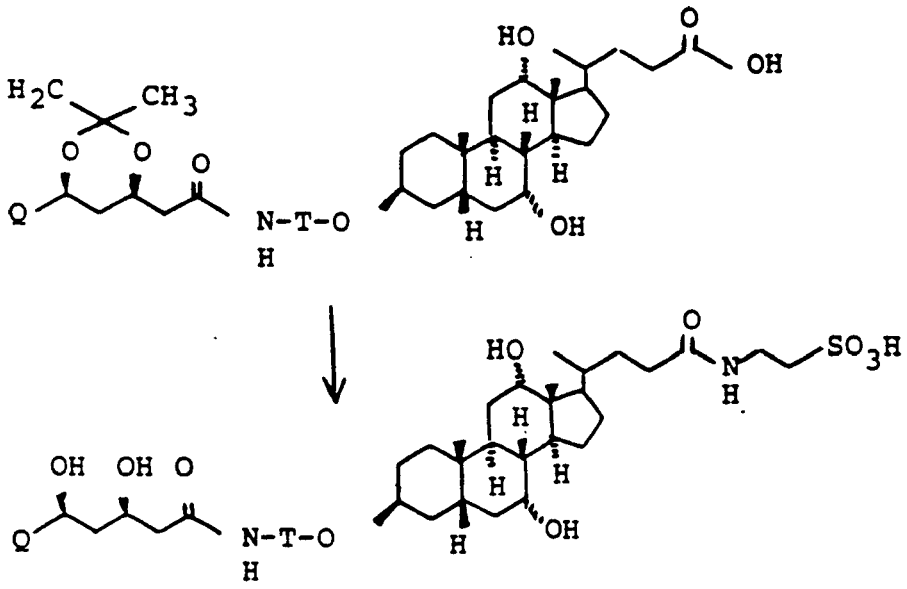
Eks.	Q	T	Utgangsmateriale: Acetonid fra (se Eks. 79-88, variant B)	MS (FAB, 3-NBA) LiCl eller LiJ)
103		$-CH_2CH_2-$	73	$C_{55}H_{74}F_2N_2O_{10}S$ (992) 1015 ($M+Na^+$)
104		$-CH_2CH_2CH_2-$	74	$C_{56}H_{76}F_2N_2O_{10}S$ (1006) 1029 ($M+Na^+$)
105		$-CH_2CH_2-$	75	$C_{55}H_{74}FN_3O_9$ (939) 946 ($M+Li^+$)

Tabell 8 (forts.)

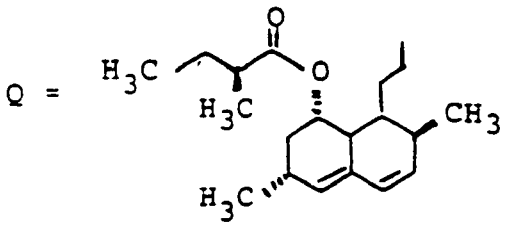
Eks.	Q	T	Utgangsmateriale: Acetonid fra (se Eks. 79-88, variant B)	MS (FAB, 3-NBA) LiCl eller LiJ)
106		$-CH_2CH_2CH_2-$	76	$C_{56}H_{76}FN_3O_9$ (953) 960 ($M+Li^+$)
107			77	$C_{56}H_{76}FN_3O_9$ (953) 960 ($M+Li^+$)
108		$-CHCH_2-$ CH_3	78	$C_{56}H_{76}FN_2O_9$ (953) 960 ($M+Li^+$)

Analogt til Eksemplene 89-98 ble fra Eksemplene 100-108 deres Na-salter fremstilt.

Eksemplene 109-118



Eksempel 109



T = $-CH_2CH_2-$

400 mg (0,45 mmol) acetonid fra 69 (se Eksemplene 79-88, variant B) ble oppløst i 40 ml absolutt THF, blandet med 0,12 ml (0,90 mmol) trietylamin og avkjølt til 0°C. Det ble tilsatt 0,07 ml (0,68 mmol) klormaursyreetylester og omrørt i 15 minutter. Deretter ble en oppløsning med 160 mg (1,3 mmol) taurin i 12 ml 0,1 N vandig natronlut dråpevis tilsatt. Det ble oppvarmet til romtemperatur og omrørt ytterligere 1 time. Blandingen ble tømt i vann, surgjort med 2N saltsyre og ekstrahert med eddikester (3 ganger). De forenede organiske fasene ble tørket med $MgSO_4$ og inndampet. Resten ble oppløst

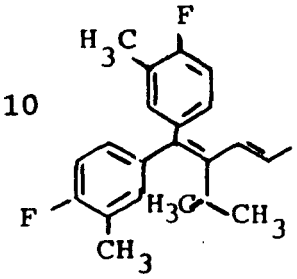
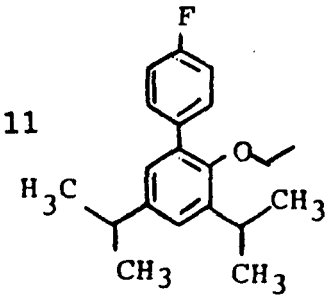
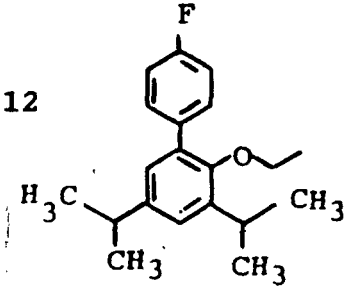
i 50 ml THF, blandet med 10 ml 1N saltsyre og omrørt ved romtemperatur i 4 timer. Den ble tømt i vann, ekstrahert med eddikester (3 ganger), de forenede organiske fasene tørket med $MgSO_4$ og inndampet.

Flashkromatografi på kiselgel (diklormetan/metanol 7:3) gav 270 mg (0,28 mmol, 62%) "Eksempel 109".
$C_{52}H_{86}N_2O_{12}S$ (962), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 969 ($M+Li^+$).

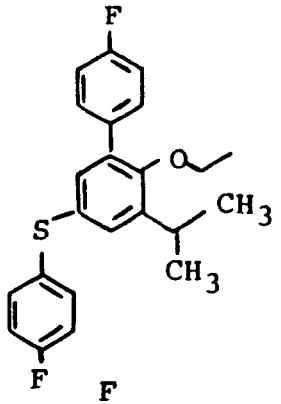
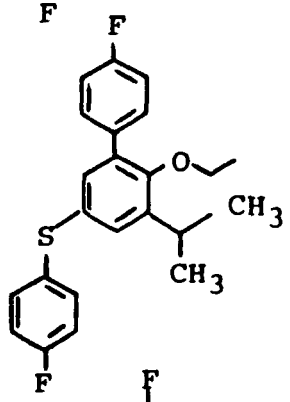
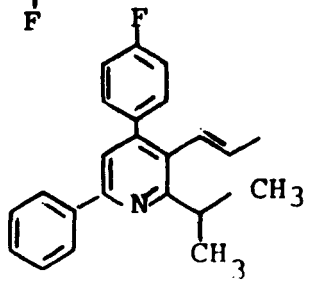
Eksemplene 110-118

Analogt til 109 ble "Eksemplene 110-118" oppnådd.

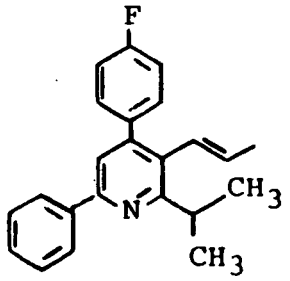
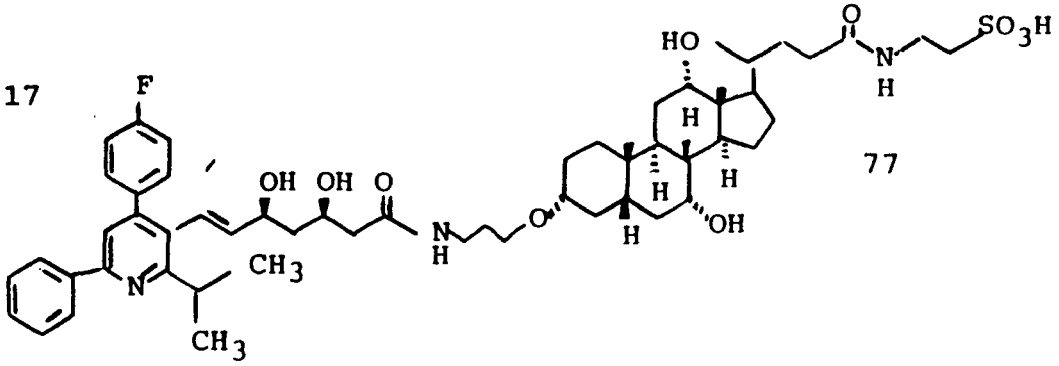
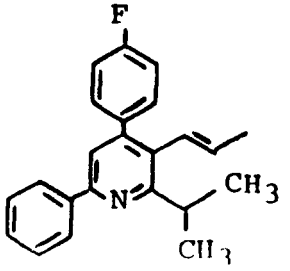
Tabell 8

Eks.	Q	T	Utgangsmateriale: Acetonid fra (se Eks. 79-88, variant B)	MS (FAB, 3-NBA) LiCl eller LiJ)
110		$-CH_2CH_2-$	70	$C_{54}H_{78}F_2N_2O_{10}S$ (984) 991 ($M+Li^+$)
111		$-CH_2CH_2-$	71	$C_{52}H_{79}FN_2O_{11}S$ (958) 981 ($M+Na^+$)
112		$-CH_2CH_2CH_2-$	72	$C_{53}H_{81}FN_2O_{11}S$ (972) 995 ($M+Na^+$)

Tabell 8 (forts.)

Eks.	Q	T	Utgangsmateriale: Acetonid fra (se Eks. 79-88, variant B)	MS (FAB, 3-NBA) LiCl eller LiJ)
113		$-CH_2CH_2-$	73	$C_{55}H_{76}F_2N_2O_{11}S_2$ (1042) 1065 ($M+Na^+$)
114		$-CH_2CH_2CH_2-$	74	$C_{56}H_{78}F_2N_2O_{11}S_2$ (1056) 1079 ($M+Na^+$)
115		$-CH_2CH_2-$	75	$C_{55}H_{76}FN_3O_{10}S$ (989) 996 ($M+Li^+$)

Tabell 8 (forts.)

Eks.	Q	T	Utgangsmateriale: Acetonid fra (se Eks. 79-88, variant B)	MS (FAB, 3-NBA) LiCl eller LiJ)
116		$-CH_2CH_2CH_2-$	76	$C_{56}H_{78}FN_3O_{10}S$ (1003) 1010 ($M+Li^+$)
117			77	$C_{55}H_{76}FN_3O_{10}S$ (1003) 1010 ($M+Li^+$)
118		$-CHCH_2-$ CH_3	78	$C_{56}H_{78}FN_3O_{10}S$ (1003) 1010 ($M+Li^+$)

Analogt til Eksemplene 89-98 ble det fra Eksemplene 109-118 fremstilt deres Na-salter.

W - X - G, W = modellpeptid (D-alanyl-peptid)

Fremstilling av modellpeptider til kobling til gallesyrer

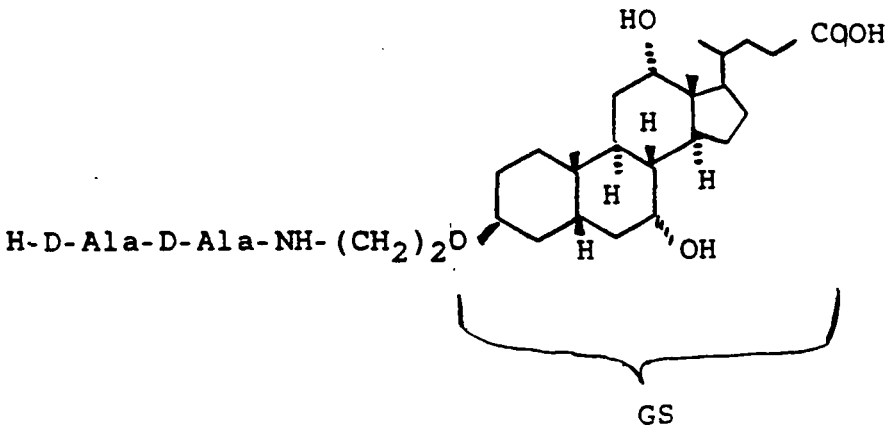
De til kobling i Eksempel 21 anvendte N-terminalbeskyttede D-alanyl-peptider (beskyttelsesgruppe f.eks. benzyloksykarbonyl h.h.v. Boc: tert-butyloksykarbonyl) h.h.v. deres aktivestere blir fremstilt og karakterisert innenfor peptidkjemien generelt med vanlige metoder (se f.eks. Houben-Weyl, bind 15/1 og 15/2).

De N-terminalbeskyttede oligo-D-alanyl-peptidene blir enten sammenbundet i form av deres aktivestere, f.eks. som N-hydroksysuccinimid (OSu) - h.h.v. 1-hydroksybenzotriazol (OBt)-ester, eller ved hjelp av kondensasjonsreagenser (f.eks. dicykloheksylkarbodiimid) under tilsetning av en racemiseringshemmende reagens, for eksempel N-hydroksy-succinimid (HOSu) h.h.v. 1-hydroksybenzotriazol (HOBt) med aminofunksjonen til gallesyrederivatet.

Etterfølgende blir peptidbeskyttelsesgruppen såvel som metylestergruppen til gallesyrederivatet fjernet, hvorved det gjennom den her anvendte ortogonale beskyttelsesgruppe-strategien kan avspalte den N-terminale beskyttelsesgruppen f.eks. ved hydrering (Z) eller acidolytisk (Boc), mens metylestergruppen til gallesyrederivatet blir forsåpet, også syntesen av delbeskyttede gallesyre-peptidkonjugater er mulig.

De til enhver tid aktuelle mellomproduktene såvel som sluttproduktet blir renset bl.a. søylekromatografisk og tynnsjiktkromatografisk såvel som karakterisert ved hjelp av ^{1}H-NMR-spektroskopi.

Eksemplene 119-121



Eksempel 119

Z-D-Ala-D-Ala-NH-$(CH_2)_2$-GS-OCH_3

Man oppløser 485 g (1,04 mmol) Eksempel 21 og 467 mg (1,14 mmol) Z-D-Ala-D-Ala-OSu i 10 ml diklormetan og omrører i 1,5 time ved romtemperatur. Etter fjerning av oppløsningsmiddelet i vakuum oppnår man 930 mg fast rest, som blir kromatografert på en kiselgelsøyle (50x2 cm, Matrex silikagel 70-200 µm). Elueringsmiddel: Diklormetan/metanol/eddiksyre 85:10:5.

Fraksjonene 3 og 4 inneholdt det ønskede produktet; Fraksjon 4 inneholdt ytterligere noe N-hydroksysuccinimid, som etter fjerning av oppløsningsmidlene ved pulverisering av resten med vann h.h.v. sterkt fortynnet saltsyre kan bli fjernet.

Etter forening av begge fraksjonene fikk man 450 mg (57%) "Eksempel 119" som hvitt fast stoff.

R_f (diklormetan/metanol/eddiksyre 85:10:5): 0,76.

R_f (n-butanol/eddiksyre/vann 40:40:10): 0,89.

Eksempel 120

H-D-Ala-D-Ala-NH-$(CH_2)_2$-GS-OCH_3

280 mg (0,37 mmol) Z-D-Ala-D-Ala-NH-$(CH_2)_2$-GS-OCH_3 blir oppløst i 5 ml metanol. Man skyller reaksjonsbeholderen flere ganger med inertgass, tilsetter 28 mg hydreringskatalysator (palladium/aktivt kull, 10%) og hydratiserer i 3 timer ved romtemperatur. Etter den angitte tiden foreligger det etter tynnsjiktskromatografi (diklormetan/metanol/eddiksyre 85:10:5) ikke noe edukt. Reaksjonsblandingen bir membranfiltrert (Schleicher og Schuell, RC 58, 0,2 µm), filtratet inndampet i rotasjonsinndamper, resten blandet to ganger med dietyleter og inndampet på nytt i rotasjonsinndamper. Man fikk 225 mg (98%) hvit-gult pulveraktig faststoff, som blir tatt ut i metanol og omrørt videre i 10 min. under tilsetning av aktiv kull ved romtemperatur. Etter filtrering, inndamping av oppløsningsmiddel i vakuum og tørking fikk man 190 mg (83%) "Eksempel 120" som hvitt pulver.

R_f (n-butanol/eddiksyre/vann 40:40:10): 0,55.

Eksempel 121

H-D-Ala-D-Ala-NH-$(CH_2)_2$-GS-OH

Man oppløser 120 mg (0,19 mmol) H-D-Ala-D-Ala-NH-$(CH_2)_2$-GS OCH_3 i 2 ml metanol, drypper til 2 ml 0,1 N vandig natriumhydroksid-oppløsning ved romtemperatur og omrører i 4 timer ved samme temperatur. Deretter innstiller man reaksjonsoppløsningen med 2N vandig saltsyre til pH 3 og damper i rotasjonsinndamper inntil tørrhet.

Man pulveriserer resten i litt etanol og filtrerer uløst materiale vekk. Filtratet blir bragt til tørking, pulverisert en gang med eter og en gang med pentan, filtrert og tørket. Man får 107 mg "Eksempel 121" som hvitt faststoff (inneholder videre ca. 10% natriumklorid).

Utbytte: 85%

R_f (n-butanol/eddiksyre/vann 40:40:10): 0,54.

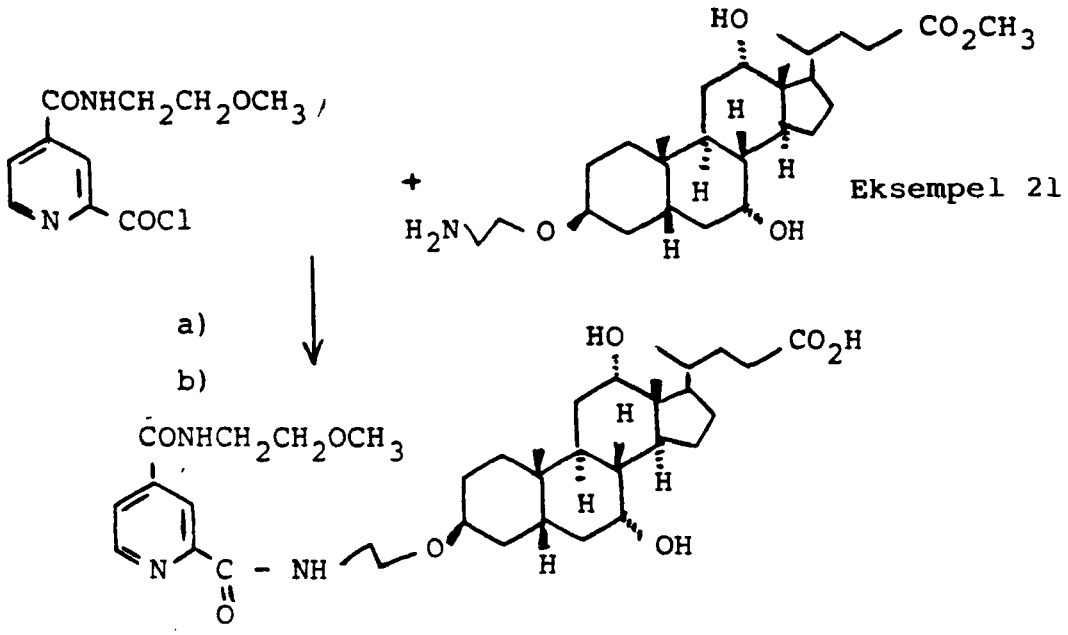
I analogi til Eksempel 121 ble Eksempel 122 oppnådd.

Eksempel 122

Z-D-Ala-D-Ala-NH-$(CH_2)_2$-GS-OH

Z = benzyloksykarbonyl

Eksempel 123

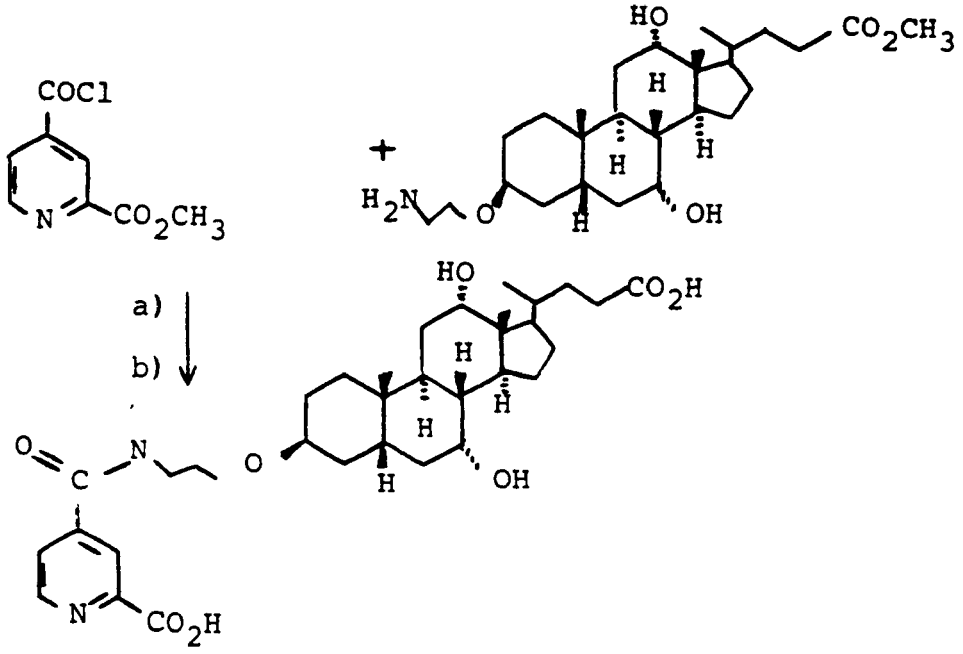


a) Til 500 mg (2,23 mmol) syreklorid (fremstilt fra tilsvarende karboksylsyre ved omsetning med tionylklorid/katalytisk mengde DMF, 2 timer tilbakestrømming) i 25 ml metylenklorid ble ved 0°C dråpevis tilsatt 1,04 g (2,23 mmol) Eksempel 21 i 5 ml metylenklorid/1 ml trietylamin. Deretter lar man det omrøres i 2 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen blir tømt i vann og den vandige fasen ekstraheres med metylenklorid (3 ganger). De forenede organiske fasene ble vasket med mettet $NaHCO_3$-oppløsning (1 gang) og tørket ($MgSO_4$). Avtaging av oppløsnings-

middelet og kromatografi på kiselgel (eddikester/metanol = 15:1) ga 314 mg.

b) 100 mg (1,49 mmol) av det oppnådde produktet ifølge a) ble oppløst i 20 ml etanol og omrørt med 4 ml 1 N NaOH over natten. Det ble tilsatt 4 ml saltsyre til nøytralisering og ekstrahert med eddikester. De forenede organiske fasene ble vasket med mettet natriumkloridoppløsning og tørket ($MgSO_4$). Avtaging av oppløsningsmiddelet gav 89,1 mg "Eksempel 123".
$C_{36}H_{55}N_3O_8$ (657), MS (FAB, 3-NBA/LiJ): 664 ($M+Li^+$).

Eksempel 124



Analogt til Eksempel 123 ble "Eksempel 124" oppnådd.
$C_{33}H_{48}N_2O_8$ (600), MS (FAB, 3-NBA/LiCl): 607 ($M+Li^+$), 613 $(M+2Li-H)^+$, 619 $(M+3Li-2H)+$.

Fremstillingsspesifikasjon av laktonkomponenten i Eksempel 71 etter DE 38.19.999:

Syntese av 4(R)-hydroksy-6(S)-[(2,4-diisopropyl-6-p-fluor-fenyl)-fenoksymetyl]tetrahydro-2H-pyran-2-on

Trinn 1

2,4-diisopropylfenol

Blandingen med 145 g (0,65 mol) 3,5-diisopropyl-2-hydroksy-benzosyre (XI), 540 ml (588 g, 4,55 mol) chinolin og 7,5 g (0,024 mol) kobberkromitt ($2CuO \cdot Cr_2O_3$) blir omrørt i 2 timer ved 190°C (225°C utetemperatur). Man avkjøler til ca. 10°C, surgjør under videre avkjøling med ca. 1 l halvkonsentrert saltsyre til pH 1 til 2, ekstraherer med toluol og vasker ekstraktet med 2 N saltsyre, deretter med vann og deretter med $NaHCO_3$-oppløsning. Man tørker, filtrerer, inndamper og destillerer i høyvakuum. Man får 105 g av tittelforbindelsen XIII som lysgul olje, kp. 81 til 84°C/0,2 Torr.

^{1}H-NMR($CDCl_3$): δ 1,20 (6H, d); 1,25 (6H,d); 3,00 (2H, 2xhept.); 4,10 (1H,s,br); 6,50-7,00 (3H,m)

Trinn 2

2,4-diisopropyl-6-bromfenol

Til 95°C varm oppløsning med 102,3 g (0,57 mol) 2,4-diisopropylfenol i 900 ml iseddik tilsetter man 1 g jernpulver, deretter dråpevis 101 g (32,2 ml, 0,63 mol) brom i løpet av 90 minutter. Man omrører i ytterligere 1 time ved 100°C, avkjøler, fordeler reaksjonsblandingen mellom toluol og vann og vasker toluolfasen med $NaHCO_3$-oppløsning. Man tørker, filtrerer, inndamper og destillerer resten i høyvakuum. Man får 125 g av tittelforbindelsen som lysgul olje, kp. 85°C/0,15 Torr.

^{1}H-NMR($CDCl_3$): δ 1,20 (6H, d); 1,25 (6H,d); 2,80 (~~1H~~, hept.); 3,25 (1H,hept.); 5,33 (1H,s); 6,87–7,20 (2H,m)

MS (70eV): m/e = 256/258 (M^+), 241/243 (M^+-CH_3).

Trinn 3

1-benzyloksy-2,4-diisopropyl-6-brombenzol

Suspensjonen med 166,5 g (1,2 mol) kaliumkarbonat i 124 g (0,48 mol) av bromfenol over, 91,52 g (0,72 mol) benzylklorid og 2 l 2-butanon blir oppvarmet i 24 timer med tilbakestrømming.

Man avkjøler, suger det uorganiske faste stoffet av, inndamper filtratet i vakuum og fordeler resten mellom toluol og vann. Toluolfasen blir vasket med mettet koksaltoppløsning, tørket, filtrert og inndampet. Resten blir kromatografert med cykloheksan/toluol 9:1 på kiselgel. Man får 155 g av tittelforbindelsen som fargeløs olje.

Mindre rester benzylklorid blir fjernet i høyvakuum. Man kan også oppnå rensing med destillasjon. (Kp. 150°C/0,15 Torr).

^{1}H-NMR($CDCl_3$): δ 1,18 (6H, d); 1,22 (6H,d); 2,80 (1H, hept.); 3,32 (1H,hept.); 4,90 (2H,s); 6,93–7,60 (7H,m)

MS (70eV): m/e = 346/348 (M^+), 267, 254/256, 91.

Trinn 4

1-benzyloksy-2,4-diisopropyl-6-p-fluorfenyl-benzol

Man fremstiller Grignard-forbindelsen fra 48,62 g (0,14 mol) bromidet i trinn 3 og 3,53 g (0,147 mol) Mg-spon i 120 ml absolutt THF (~ 60°C, 1 time). Denne Grignard-oppløsningen blir raskt tilsatt løsningen med 31,08 g (0,14 mol) 4-fluorjodbenzol og 3,23 g (2,8 mmol) tetrakis(trifenylfosfin)-palladium (0) i 140 ml absolutt THF. Indretemperaturen stiger i løpet av 15 minutter fra 55 til 60°C. Etter 7 minutter danner det seg et bunnfall. Man omrører i 1 time ved 50 til 58°C og lar det stå over natten ved romtemperatur, fordeler mellom eter og 1 N saltsyre, vasker eterfasen med 1 N saltsyre, deretter med vann og deretter med mettet $NaHCO_3$-

oppløsning. Man tørker, filtrerer og inndamper. Etter behov renser man produktet med kromatografi med cykloheksan/toluol 4:1 på kiselgel eller ved destillasjon (kp. 180°C/0,3 Torr). Man oppnår 49,3 g av tittelforbindelsen som fargeløst faststoff, smp. 65 til 67°C.

^{1}H-NMR($CDCl_3$): δ 1,30 (12H, d); 2,95 (1H,hept.); 3,45 (1H, hept.); 4,40 (2H,s); 6,90-7,80 (11H,m)
MS (CI): m/e = 363 ($M+H^+$), 362 (M^+), 285, 263.

Trinn 5

2,4-diisopropyl-6-p-fluorfenyl-fenol
Til en oppløsning med 49,3 g (0,136 mol) benzyleter fra trinn 4 i 1 l eddikester og 100 ml iseddik tilsetter man 4 g 10% Pd på kull og ryster i 20 minutter i en hydrogenatmosfære (kraftig H_2-opptak). Man filtrerer katalysatoren av, inndamper, tar resten flere ganger i toluol og inndamper hver gang i vakuum. Man oppnår 34,4 g av tittelforbindelsen som fargeløs olje, kp. 115°C/0,1 Torr.

^{1}H-NMR($CDCl_3$,270MHz): δ 1,25 (6H, d); 1,29 (6H,d); 2,87 (1H, hept.); 3,31 (1H,hept.); 4,95 (1H,s,-br); 6,88 (1H, d); 7,08 (1H,d); 7,18 (2H,m); 7,45 (2H,m).
MS (70eV): m/e = 272 (M^+), 257 (M^+-CH_3).

Trinn 6

6(S)-((2,4-diisopropyl-6-p-fluorfenyl)-fenoksymetyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2(R,S)-metoksy-4(R)-(t-butyldifenylsilyloksy)-2H-pyran
Til suspensjonen med 27,6 g (0,2 mol) kaliumkarbonat og en spatelspiss-hydrochinon i 250 ml abs. DMSO tilsetter man 27,2 g (0,1 mol) fenol fra trinn 5. Man omrører i 1 time ved romtemperatur og tilsetter deretter oppløsningen med 56 g (0,11 mol) 6(S)-jod-metyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(R,S)-metoksy-

4(R)-(t-butyldifenylsilyloksy)-2H-pyran (fremstilling se EP-A 0.216.127, R_7 = t-butyldifenylsilyl) i 250 ml abs. DMSO. Man omrører i 4 timer ved 50-55°C indretemperatur. DC (kiselgel, 1. Utvikling med cykloheksan/eddikester 9:1, 2. Utvikling med cykloheksan/eddikester 15:1) viste fullstendig omsetning av jodid (R_f 0,5), noe restlignende utgangsfenol (R_f 0,7), hovedsakelig produkt med formel V (R_f 0,6). Man lar det avkjøles og fordeler reaksjonsblandingen mellom eter og halvmettet koksaltoppløsning. Den vandige fasen blir ekstrahert nok en gang med eter. De forenede organiske fasene blir vasket med koksaltoppløsning, tørket over $MgSO_4$, filtrert og inndampet. Råproduktet blir kromatografert med toluol/cykloheksan 2:1, deretter 100% toluol, deretter toluol/eddikester 30:1 på kiselgel. Man oppnår 51 g av tittelforbindelsen som fargeløs harpiks.

^{1}H-NMR($CDCl_3$): δ 1,10 (9H,s); 1,28 (12H,d); 1,4-2,2 (4H, m); 2,93 (2H,2xhept.); 3,40 (2H,m); 3,53 (3H, s); 3,97-4,40 (2H,qui+m); 4,87 (1H, dd); 6,87-7,90 (16H,m)

MS (CI): m/e = 654 (M^+), 597 (M^+-tert.-Bu), 539, 519, 323, 283, 135, 127.

Trinn 7

6(S)-(2,4-diisopropyl-6-p-fluorfenyl)-fenoksymetyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2-(R,S)-hydroksy-4(R)-(t-butyldifenylsilyloksy)-2H-pyran

Løsningen med 40,2 g (61,4 mmol) laktoneter fra trinn 6 i 3 l THF, 3 l vann og 4,2 l iseddik blir omrørt i 24 timer ved 80-85°C (utetemperatur). Oppløsningsmiddelet blir fjernet i vakuum og resten tatt av 3 ganger med toluol i vakuum. Kromatografi med cykloheksan/eddikester 12:1 med 2 l kiselgel gir 33,4 g (utbytte 85%) av tittelforbindelsen som fargeløst amorft pulver.

MS (FAB): m/e = 640 (M^+), 519, 367, 323, 283, 271, 257.

Trinn 8

6(S)-(2,4-diisopropyl-6-p-fluorfenyl)-fenoksymetyl)-3,4,5,6-tetrahydro-4-(R)-(t-butyldifenylsilyloksy)-2H-pyran-2-on

Til en oppløsning med 33,4 g (52,1 mmol) laktol fra trinn 7 og 19,25 g (52,1 mmol) tetrabutylammoniumjodid i 2,5 l absolutt metylenklorid tilsetter man under omrøring og avkjøling 46,9 g (208,4 mmol) N-jodsuccinimid. Man omrører under lysutelukkelse under nitrogen i 1 time ved 10°C, 20 timer ved romtemperatur. Man vasker reaksjonsoppløsningen med vann, deretter 2 ganger med $NaHSO_3$-oppløsning, deretter med mettet NaCl-oppløsning, tørker, filtrerer og inndamper. Resten blir oppløst i litt metylenklorid og filtrert med cykloheksan/eddikester 92:8 med kiselgel. Man oppnår 32,1 g av tittelforbindelsen som fargeløs harpiks.

^{1}H-NMR($CDCl_3$,270MHz): δ 1,06 (9H,s); 1,23 (6H,d); 1,26 (6H, d); 1,59 (2H,m); 2,41 (1H,dd); 2,59 (1H,dm); 2,90 (1H,hept.); 3,36 (1H, hept.); 3,48 (2H, AB fra ABX); 4,29 (1H,qui); 4,80 (1H,m); 6,96 (1H,d); 7,03 (2H,m); 7,10 (1H,d); 7,36-7,52 (8H,m); 7,58-7,73 (4H,m)

MS (70eV,70°C): m/e = 638 (M^+), 581 (M^+-tert.-Bu), 539, (581 - propen), 283, 199.

Trinn 9

4(R)-hydroksy-6(S)-[(2,4-diisopropyl-6-p-fluorfenyl)-fenoksy-metyl]-tetrahydro-2H-pyran-2-on

Til en oppløsning med 31,0 g (48,5 mmol) silylforbindelse fra trinn 8 i 1,5 l tetrahydrofuran (filtrert over basisk Al_2O_3) tilsetter man 11,65 g (194 mmol) iseddik, etterfulgt av 45,92 g (145,5 mmol) tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat. Man omrører i 20 timer ved romtemperatur. Oppløsningsmiddelet blir fjernet i vakuum og resten blir raskt fordelt mellom eter og vann. Den vandige fasen blir ekstrahert ytterligere

to ganger med eter. De forenede organiske fasene blir vasket med mettet koksaltoppløsning, tørket med $MgSO_4$, filtrert og inndampet.

Resten blir tatt ut i toluol og inndampet i vakuum. Råproduktet blir kromatografert med cykloheksan/eddikester 1:1 med 2 kg kiselgel.

Man får 15,7 g (utbytte 81%) av tittelforbindelsen som fargeløst faststoff, smp. 145-147°C.

^{1}H-NMR($CDCl_3$,270MHz): δ 1,25 og 1,27 (12H,2xd); 1,67 (1H,s,br); 1,76 (1H, dtd); 1,87 (1H,ddd); 2,58 (1H,ddd); 2,69 (1H,dd); 2,91 (1H,hept.); 3,39 (1H,hept.); 3,54 (2H, AB fra ABX); 4,38 (1H,qui); 4,68 (1H,m); 6,97 (1H,d); 7,10 (3H,d+m); 7,51 (2H,m).

MS (FAB): m/e = 400 (M^+), 257.

Fremstillingsspesifikasjon for laktonkomponenten for Eksempel 73 ifølge DE 39.29.913.

Trinn 1

2-brom-6-isopropyl-fenol

198,1 ml (3,85 mol) brom ble ved -5 til 0°C dråpevis tilsatt til en oppløsning med 470 g natriumhydroksid i 2 l vann. Blandingen ble omrørt i ytterligere 10 min. ved denne temperatur. Den oppstående natriumhypobromid-oppløsningen ble ved -5 til 0°C dråpevis tilsatt en oppløsning med 464 g av en 40% vandig dimetylamin-oppløsning (4,11 mol) i 50 ml vann. Blandingen ble omrørt i ytterligere 30 min., deretter ble den organiske fasen adskilt og den vandige fasen ekstrahert 2 ganger med 750 ml metylenklorid. De forenede organiske fasene ble tørket kort over magnesiumsulfat og filtrert. Filtratet ble ved -10°C dråpevis tilsatt til en oppløsning med 500 g

(3,67 mol) orto-isopropylfenol i 900 ml metylenklorid. Etter tilsetning av ca. 2/3 av filtratet dannes et faststoff og reaksjonsblandingen ble viskøs og vanskelig rørbar. 500 ml metylenklorid ble tilsatt ved -10°C og blandingen ble omrørt ytterligere en time. Det faste stoffet ble suget av, vasket med litt kald metylenklorid, suspendert i 1,5 l 2N svovelsyre og omrørt ved romtemperatur, inntil samtlig av det faste stoffet hadde blitt omdannet til en olje. Den organiske fasen ble skylt av, den vandige fasen ekstrahert med metylenklorid. De forenede organiske fasene ble vasket med koksaltoppløsning, tørket og oppløsningsmiddelet ble fjernet i vakuum. Resten ble destillert i vannstrålevakuum gjennom en 30 cm Vigreux-kolonne.

391,7 g (1,82 mol) fargeløs olje, kp. 122-124°C/21 Torr;
Utbytte 49,6%
NMR (60 MHz): δ = 1,20 (d,6H,CH_3); 3,23 (sept.,1H,CH); 5,42 (s,1H, OH); 6,4-7,2 (m,3H,arom,.H).

Trinn 2

2-(p-fluorfenyl)-6-isopropyl-fenol

a) Til 18,7 g (0,77 mol) magnesiumspon blir tre jodkrystaller tilsatt og tilsetningsstedet blir oppvarmet med et varmluftsapparat (Fön), inntil joddamp er synlig i kolben. Det blir avkjølt til romtemperatur og 20 ml abs. THF blir tilsatt. 131,3 g (0,75 mol) p-bromfluorbenzol blir fylt i en 500 ml dryppetrakt og tilsatt derfra ca. 2 ml i reaksjonskolben. Den brune fargen i reaksjonsblandingen forsvant raskt og det foregikk sterk varmeutvikling ved tilbakestrømming. Straks ble ytterligere 50 ml abs. THF tilsatt til reaksjonsblandingen og p-bromfluorbenzol i dråpetrakten ble fortynnet med 200 ml THF. Denne oppløsningen ble deretter dråpevis tilsatt slik at en svakere tilbakestrømming kunne bli opprettholdt. Deretter ble reaksjonsblandingen kokt i ytterligere 1 time under tilbakestrømming og deretter avkjølt til 50°C.

b) I en annen kolbe ble det fra løsningen med 52,0 g (0,24 mol) 2-brom-6-isopropyl-fenol distribuert i 150 ml abs. THF ved hjelp av 20 minutters gjennomstrømming av nitrogen med oppløst oksygen. 1,7 g (1,5 mmol) tetrakis(trifenylfosfin)-palladium(0) ble tilsatt under minimering av oksygenkontakt.

Deretter ble Grignard-oppløsningen fra trinn a) overført ved hjelp av en dobbelkanyle ("Flex-Needle", firma Aldrich) under nitrogentrykk, hvoretter det oppstod en varmeutvikling. Hastigheten på overføringen er valgt slik at en mindre tilbakestrømming kan bli opprettholdt. Deretter ble det oppvarmet ytterligere 6 timer til tilbakestrømming. Reaksjonsblandingen ble avkjølt og tømt i 500 g is/100 ml kons. saltsyre. Den organiske fasen ble skylt av og den vandige fasen ble ekstrahert med 3 x 100 ml eter. De forenede organiske fasene ble vasket med 100 ml mettet koksaltoppløsning, tørket og oppløsningsmiddelet tatt av. Resten ble destillert i vakuumpumpe gjennom en 30 cm Vigreux-kolonne. Etter forløpet (30-65°C/0,2 Torr) destillerte det rene produktet (kp. 107-109°C/0,5 Torr) som fargeløs olje, som under forløpet og for tiden også krystalliserte allerede i destillasjonsbroen (smp. 44-46°C). For å unngå en forstoppelse av broen ble denne temperert til ca. 50°C. Utbytte 37,8 g tittelforbindelsen (164 mmol); 68,4% av teoretisk. GC-analyse (30 m dampet silika-søyle DB-5 "polydifenyldimetylsiloksan", sjikttykkelse 0,25 µm, indrediameter 0,32 mm, 180°C, inj. 240°C, 1 bar H_2): t_{ret}: 4,46 min., renhet > 99,9%.

NMR (270 MHZ): δ = 1,28 (d,6H,CH_3); 3,32 (sept.,1H,CH); 5,08 (s,1H,OH); 6,9-7,5(m,7H,arom.-H)

MS (DCI, isobutan) : m/e : 231 ($M+H^+$), 230 (M^+), 215 (M^+-CH_3)

Trinn 3

2-(p-fluorfenyl)-4-tiocyanato-6-isopropyl-fenol

Suspensjonen med 70,9 g (838 mmol, 5,0 ekvivalenter) natriumtiocyanat i 200 ml metanol ble omrørt i 20 min. ved romtemperatur. 40,0 g (173,8 mmol, 1,0 ekv.) 2-(p-fluorfenyl)-6-isopropyl-fenol ble tilsatt og blandingen ble omrørt i 20 minutter. 14,32 ml (277,8 mmol, 1,6 ekv.) brom ble oppløst i 50 ml metanol (eksoterm) og denne løsningen ble dråpevis tilsatt ved 15-20°C i løpet av 20 minutter til reaksjonsoppløsningen over. Reaksjonsblandingen ble farget gul og fenolen løste seg fullstendig. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 30 min. DC (toluol/cykloheksan 1:1) viste fullstendig omsetning av utgangsmaterialene (R_f=0,54). Ved siden av tittelforbindelsen (R_f=0,32) oppstod det som forurensning bare en mindre mengde med tilsvarende para-brom-forbindelse, som ble kromatografert sammen med utgangsmaterialet (R_f=0,54), men på grunn av forskjellig farging kan den bli adskilt. Reaksjonsblandingen ble tømt i 400 g is/400 ml 2 N saltsyre og ekstrahert med 4 x 200 ml toluol. Ekstraktet blir vasket med vandig natriumsulfitt-oppløsning, filtrert, vasket med mettet koksaltoppløsning, tørket og inndampet i vakuum.

Det gjenværende gule faste stoffet ble oppløst i 500 ml varm cykloheksan og det ble tilsatt 5 g aktiv kull. Deretter ble det kokt i 5 minutter under tilbakestrømming og den varme suspensjonen filtrert i vakuum. Det avsugede aktive kullet ble ettervasket med 20 ml varm cykloheksan. Det nesten fargeløse filtratet avkjøltes langsomt og ble deretter videre avkjølt i 12 timer ved 10°C.

De fargeløse krystallene (tittelforbindelsen) ble suget av og tørket i vakuum. 47,6 g (165,7 mmol) utbytte tilsvarer 95,3%; smp.: 94,5-96°C.

NMR (60 MHz): δ = 1,26 (d,6H,CH_3); 3,32 (sept.,1H,CH); 5,46 (s,1H,OH); 7,0-7,6 (m,6H,arom.-H)

MS (DCI, isobutan) : m/e : 288 ($M+H^+$), 272 (M^+-CH_3), 261.

Trinn 4

2-(p-fluorfenyl)-4-(p-fluorfenyltio)-6-isopropyl-fenol

En THF-oppløsning (100 ml) med p-fluorfenylmagnesiumbromid [fra 3,11 g (128 mmol) magnesium og 22,0 g (13,8 ml, 126 mmol) p-bromfluorbenzol] ble fremstilt som i trinn 2. Oppløsningen med 6,04 g (21 mmol) 2-(p-fluorfenyl)-4-tiocyanato-6-isopropyl-fenol (fra trinn 3) i 50 ml THF ble ved 50°C dråpevis tilsatt og ytterligere 2 timer omrørt ved 40-50°C. Blandingen ble avkjølt og tømt i 500 ml iskald 2N saltsyre. Den ble ekstrahert tre ganger med 200 ml eter og 200 ml eter. De forenede ekstraktene ble vasket med koksaltoppløsning, tørket og oppløsningsmiddelet ble fjernet i vakuum.

Den gjenværende oljen (tittelforbindelsen) (7,5 g, 21 mmol, utbytte ~ 100%) var ren ifølge DC (cykloheksan/etylacetat 9:1) og ^1H-NMR.

NMR (60 MHz): δ = 1,25 (d,6H,CH_3); 3,31 (sept.,1H,CH); 5,22 (s,1H,OH); 6,8-7,8 (m,10H,arom.-H)

MS (DCI, isobutan) : m/e : 357 ($M+H^+$), 356 (M^+).

Trinn 5

(3R-5S)-6-metylsulfonyloksy-3,5-O-isopropyliden-3,5-dihydroksyheksansyre-tert.-butylester

Til en oppløsning med 175,7 g (676 mmol) (3R,5S)-6-hydroksy-3,5-O-isopropyliden-3,5-dihydroksyheksansyre-tert.-butylester (se EPA 0.319.847) i 1,7 l abs. metylenklorid og 1,7 l abs. pyridin drypper man ved 0-5°C 116,2 g (1,01 mol, 1,5 ekv.) metanosulfonsyreklorid. Man omrører 90 min. under isavkjøling, inndamper deretter reaksjonsblandingen ved 30°C i vakuum og fjerner hovedmengden av resterende pyridin etter opptaking i toluol og avtrekking i vakuum. Resten ble tatt ut

i toluol og vasket to ganger med vann, en gang med mettet natriumhydrogenkarbonat-oppløsning, en gang med mettet natriumkloridoppløsning, deretter tørket, filtrert og inndampet i vakuum. Den gjenværende oljen krystalliserte seg praktisk talt fullstendig ved romtemperatur i løpet av noen minutter. Krystallene ble suget av, pulverisert i filter, vasket med kald petroleter og tørket i vakuum.

Man oppnådde 192,0 g (568 mmol) fargeløst fast stoff, smp. 75-76°C. Inndamping av filtratet, avsuging av krystallene og vasking med litt kald petroleter gav videre 34,8 g (103 mmol) lett forurenset produkt, smp. 69-73°C. Samlet utbytte av tittelforbindelse: 226,8 g (671 mmol, 99,3%).

NMR (270 MHz, CD_2Cl_2): δ = 1,18-1,33 (m,1H,CH_2,aksial), 1,36 (s,3H,CH_3), 1,42 (s,9H,tert.-Bu), 1,46 (s,3H,CH_3), 1,56 (dt,1H,-CH_2,ekv.), 2,36 (AB-del til ABX-system,2H,CH_2), 3,03 (s,3H,CH_3-SO_2), 4,09-4,23 (m,3H,OCH_2 og O-CH), 4,24-4,37 (m,1H,OCH).

MS (DCI-isobutan): m/e = 283 ($M+H^+$ - >=).

Trinn 6

{2,2-dimetyl-4(S)-[(2-p-fluorfenyl-4-p-fluorfenyltio-6-isopropyl)-fenoksymetyl]-6(R)-tert.-butoksykarbonylmetyl}-1,3-dioksolan

Til en løsning med 4,0 g (11,2 mmol) 2-(p-fluorfenyl)-4-p-fluorfenyltio)-6-isopropyl-fenol (trinn 4) i 25 ml tørr heksametylfosforsyretriamid (HMPT) tilsetter man 2,02 g (14,6 mmol), 1,3 ekv.) pulverformig kaliumkarbonat og ca. 10 mg krone-eter 18-Crown-6 (firma Aldrich). Man omrører suspensjonen i 20 min. ved romtemperatur, tilsetter deretter 4,55 g (13,5 mmol, 1,2 ekv.) (3R,5S)-6-metylsulfonyloksy-3,5-O-isopropyliden-3,5-dihydroksyheksansyre-tert.-butylester

(trinn 5) og omrører i 2 dager ved 75-80°C. Reaksjonsblandingen farget seg mørk og ble tyktflytende. Den ble tømt i 200 ml vandig natriumdihydrogenfosfat-oppløsning og ekstrahert flere ganger med eter. De forenede ekstraktene ble vasket med mettet koksaltoppløsning, tørket i vakuum og inndampet og det gav 8,64 g av en brunlignende olje.

Søylekromatografi (cykloheksan/etylacetat 10:1 pluss 1 o/oo trietylamin) gav 4,96 g (8,28 mmol, 74,0% utbytte) av en blekgul, seig olje (tittelforbindelse).

NMR (270 MHz, C_6D_6): δ = 0,98-1,07 (m,2H,CH_2), 1,19 + 1,20 (2xd,6H,$CH(CH_3)_2$), 1,38 (s,9H,-tert.-Bu), 1,39 + 1,41 (2xs,6H, $OC(CH_3)_2$), 2,12 (dd,1H,CH_2CO_2), 2,42 (dd,1H,CH_2CO_2), 3,27 (dd,1H,O-CH_2), 3,37 (dd,1H,O-CH_2), 3,65 (sept.,1H,$\underline{CH}(CH_3)_2$), 3,65-3,76 (m,1H,O-CH), 4,10-4,21 (m,1H,O-CH), 6,60+6,82 (AA'BB'-system,4H,arom.-H), 7,12-7,18 (m,2H,arom.-H), 7,22-7,29 (m,3H, arom.-H), 7,45 (d,1H,arom-H)

MS (DCI, isobutan): m/e = 598 (M^+), 543 (M + H^+ - >=), 485.

Trinn 7

3(R),5(S)-dihydroksy-6-[(2-p-fluorfenyl-4-p-fluorfenyltio-6-isopropyl)-fenoksy]-heksansyre-tert.-butylester

Oppløsningen med 4,47 g (7,47 mmol) acetonid fra trinn 6 i 50 ml tetrahydrofuran, 50 ml etanol og 5 ml 2 N saltsyre ble omrørt i 16 timer ved romtemperatur. DC (cykloheksan/etylacetat 1:1) viste nesten kvantitativ omdannelse fra utgangsmaterialene (R_f = 0,78) til produktet (R_f = 0,59). Reaksjonsblandingen ble helt i vandig natriumhydrogenkarbonat-oppløsning og ekstrahert flere ganger med eter. Ekstraktene ble

vasket med mettet koksaltoppløsning, tørket og inndampet i vakuum. Resten (4,46 g brunlignende olje) ble renset med søylekromatografi (cykloheksan/etylacetat 2:1) og det gav 3,37 g (6,03 mmol) tittelforbindelse som fargeløs olje (utbytte 80,8%).

NMR (270 MHz, C_6D_6): δ = 1,1-ca. 1,4 (m,partiell fordekket med sterke singuletter,2H,CH_2), 1,18 (d,6H,CH($\underline{CH_3}$)$_2$, 1,31 (s,9H,-tert.-Bu), 2,00 (dd,1H,CH_2-CO_2), 2,13 (dd,1H,CH_2-CO_2), 3,15 (s, bred,1H,OH), 3,36 (AB-del til ABX-systemer,2H,OCH_2), 3,52 (s,bred,1H,OH), 3,56 (sept.,1H,-C$\underline{H}$(CH_3)$_2$, 3,76-3,96 (m,2H,2x C$\underline{H}$OH), 6,61+6,79 (AA'BB'-system,-4H,arom.-H), 7,14-7,27 (m,5H,-arom.-H), 7,45 (d,1H, arom.-H).

MS (FAB, 3-NBA): m/e = 558 (M^+), 519, 503 (M^+ -$>$= + H^+), 356 (M^+ til fenolbyggesten).

Trinn 8

4(R)-hydroksy-6(S)-[(2-p-fluorfenyl-4-p-fluorfenyltio-6-isopropyl)-fenoksymetyl]-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-2-on

Til en oppløsning med 5,59 g (10,0 mmol) tert.-butylester (trinn 7) i 20 ml metylenklorid ble det dråpevis tilsatt 5 ml trifluoreddiksyre. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 2 timer ved romtemperatur. DC (cykloheksan/etylacetat 1:1) viste kvantitativ omdannelse av tert.-butylester (R_f=0,37) til lakton (R_f=0,12) og mindre upolare forurensninger. Reaksjonsblandingen ble avstumpet med natriumhydrogenkarbonat-pulver, deretter innstilt nøytralt med natriumkarbonat-pulver, deretter rystet i vann og eterbehandlet flere ganger. De forenede organiske fasene ble vasket med natriumhydrogenkarbonat-oppløsning, deretter med koksaltoppløsning, tørket,

filtrert og inndampet. Resten ble kromatografert med cykloheksan/etylacetat 1:1 med en kiselgelsøyle og gav 3,88 g (8,0 mmol, utbytte 80%) av et fargeløst faststoff (tittelforbindelse), smp. 170-172°C.

NMR (270 MHz): δ = 1,30+1,32 (2xd,6H,CH($\underline{CH_3}$)$_2$), 1,72-1,94 (m,3H,CH_2 og OH), 2,67 (AB-del til ABX-system,2H,CH_2CO_2), 3,47 (sept.,1H,C$\underline{H}$(CH_3)$_2$), 3,59 (AB-del til ABX-system,2H,OCH_2), 4,40 (m,1H,C$\underline{H}$-OH), 4,72 (m,1H,CH-OCO), 6,80-7,55 (m,10H, arom.-H).

MS (DCI, isobutan): m/e = 484 (M^+), 467 (M^+-OH).

Farmakologiske data

Organselektiv virkning av farmakon-gallesyrekonjugater

Klorambucil, [4-(bis-N-(2'-kloretyl)-aminofenyl]-smørsyre, er et zytostatikum til behandling av maligne tumorer. Klorambucil blir hovedsakelig utskilt via nyrene. Ved kovalent kobling med klorambucil til gallesyrer blir det oppnådd en leverspesifikk virkning av klorambucil, som blir begrunnet med følgende eksperimenter.

1. Vekselvirkning av klorambucil-gallesyrekonjugater med bindeproteiner for gallesyrer i leverceller

Gallesyrer blir tatt ut fra portåreblod i leverparenchymcellene og utskilt igjen i gallen. Transporten av gallesyrene gjennom membranen til blod- og gallesiden i levercellen, transporten av gallesyrene i forskjellige celleorganeller som mitochondrier, endoplasmatiske retikulum etc. og transport i cytoplasma av levercellen foregår med forskjellige spesifikke bindeproteiner for gallesyrene. Gallesyrene binder seg også til regulatoriske proteiner og enzymene i gallesyremetabolismen.

Disse fysiologisk relevante bindeproteinene for gallesyrene blir molekylært identifisert og karakterisert i metoden med fotoaffinitetsmarkering. Prinsippet i denne metoden består i at fotoreaktivt radioaktivt merkede gallesyrederivater som er analoge til de naturlige gallesyrene blir bundet til de fysiologiske bindeproteinene. Ved bestråling med UV-lys blir i disse derivatene høyreaktive kjemiske mellomprodukter som karben, nitren eller radikaler frembragt, som på grunn av sin høyere reaktivitet ved addisjon til dobbeltbindingen eller innføring i enkeltbindingen reagerer raskt med bindeproteinene og binder kovalent til disse. Ved denne kovalente sammenbindingen av radioaktive gallesyrederivater med bindeproteinet blir også bindeproteinene radioaktivt merket, og kan etter adskillelse av de forskjellige proteinene i en levercelle bli identifisert f.eks. ved elektroforese og deres molekylvekt kan bli bestemt.

Dersom en slik fotoaffinitetsmerking blir gjennomført i nærvær av et stoff X', som eventuelt kan bindes til de gallesyrebindende proteinene, vil X' konkurrere med de radioaktive gallesyrederivatene om binding til de gallesyrebindende proteinene; den radioaktive merkingen av tilsvarende bindeprotein blir dermed mindre i nærvær av X'. Hvis X' på grunn av et stoff ikke blir bundet til de gallesyrebindende proteinene, blir merkingen av de gallesyrebindende proteinene ikke mindre med nærvær av X'.

$3,6 \times 10^6$ friskt isolerte hepatozytter fra rottelever (ca. 3 mg protein) i 1,5 ml buffer I (118 mM NaCl, 4,74 mM KCl, 0,59 mM KH_2PO_4, 0,59 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 1,185 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 24,87 mM $NaHCO_3$, 1,25 mM $CaCl_2$, 5,5 mM D-glukose, pH 7,35. Buffer blir gassbehandlet i 1 time med karbogen (95% O_2/5% CO_2)), blir inkubert ved 37°C i mørke med 1,25 µM (25 µCi) (7,7-azo-3α-12α-dihydroksy-5β[3β-^{3}H]cholan-24-oyl)-2-aminoetansulfonsyre i fravær eller nærvær av 250 µM "Eksempel 3" og deretter bestrålt ved 350 nm i en Rayonet RPR-100 fotoreaktor med 16 RPR 3.500 Å-lamper i 5 min. Deretter blir cellesuspensjonen fortynnet med 10 ml iskald buffer I og cellene blir sedimentert ved 3 minutters sentrifugering ved 1.000 x g. Cellene blir på nytt resuspendert i 10 ml buffer I og sedimentert igjen ved sentrifugering. Bunnfallet blir tatt ut i 600 µl Tris/HCl-buffer (pH 6,8)/2% natriumdodecylsulfat (SDS)/5% 2-merkaptoetanol/10% glyserin/0,001% bromfenolblå, oppvarmet 5 min. ved 90°C og sentrifugert i 20 min. ved 40.000 x g. Den klare supernatanten med de oppløseliggjorte proteinene ble behandlet videre. Hver 100 µl (500 µg protein) ble tatt ut på diskontinuerlige SDS-plategeler (200 x 170 x 2,7 mm, samlet akrylaminkonsentrasjon 12%) og proteinene ble adskilt ved elektroforese ved 50 V spenning. Etter elektroforesen ble gelene fiksert i 12,5% trikloreddiksyre-oppløsning og farget med 0,08% Serva blå R 250-oppløsning i 25% etanol/8% eddiksyre/67% vann. Etter innfarging ble gelene ekvilibrert i 20 min. i 1 M natriumsalisylat-oppløsning i 70% metanol og deretter tørket.

Fordelingen av radioaktivt markerte proteiner ble bestemt i metoden med fluorografi ved påføring av den tørkede gelen på Kodak-X-Omat AR røntgenfilm og eksponering ved -80°C i 14 d. Den svertede filmen ble målt ved densitometri. Tap av merking hos de forskjellige gallesyrebindende proteinene ved nærvær av "Eksempel 3" i løpet av fotoaffinitetsmerkingen blir angitt i % med hensyn til kontroller.

Molekylvekt til gallesyrebindende levercelleproteiner	% hemming gallesyre-bindende proteiner ved 250 µM "Eksempel 3"
67.000 (Albumin)	90,5
54.000 (Transportprotein i membran)	89,6
48.000 (Transportprotein i membran)	88,8
43.000 (Zytoskjelettprotein)	88,1
36.000 (Transportprotein i zytoplasma)	98,1
33.000 (Bindeprotein i mitochondrier)	93,2

2. Alkylering av proteiner i leverceller med "Eksempel 5"

Friskt isolerte hepatocytter (2×10^6) i 2 ml buffer I blir inkubert ved 37°C med 30 µCi "Eksempel 5". Etter 10, 30, 40 og 60 min. blir det hver gang tatt ut 500 µl cellesuspensjon (500 µg protein) og fortynnet med 10 ml iskald buffer I. Etter 3 minutters sentrifugering ved 1.000 x g ble bunnfallet suspendert på nytt i 10 ml buffer I og suspensjonen sentrifugert på nytt. Cellebunnfallene blir hver oppløst i 100 µl 62,5 mM Tris/HCl-buffer (pH 6,8)/2% SDS/5% 2-merkaptoetanol/10% glyserin/0,001% bromfenolblå, sentrifugert i 30 min. ved 48.000 x g og den klare supernatanten blir tatt ut på diskontinuerlige SDS-plategeler (200 x 170 x 2,7 mm). Etter elektroforetisk adskillelse blir gelene fiksert og farget. Til bestemmelse av fordeling av radioaktiviteten ble de enkelte gelbanene oppdelt i 2 mm utsnitt, proteinene ble fordøyet ved inkubasjon med 0,5 ml Biolute S, og etter

tilsetning av 5 ml scintillator-Quickszint 501 blir prøven målt i et væskescintillasjonsapparat.

Inkubasjonstid (min.)	Molekylvekter merkede leverproteiner (i kDa)	Radioaktivitet i merkede leverproteiner (i cpm)
0	/	< 30
10	48, 67	48: 408; 67: 102
30	122, 54, 48, 42, 33, 28	122: 1.064; 54: 1.811 48: 1.375; 42: 1.777 33: 1.116; 28: 2.190
40	122, 60, 54, 48, 42, 33, 28	122: 1.549; 54: 2.385 48: 2.420; 42: 2.650 33: 1.474; 28: 2682
60	122, 54, 48, 42 35, 33, 28	122: 997; 54: 1.949 48: 2.074; 42: 1.725 28: 2.163

"Eksempel 5" fører til en radioaktiv merking av proteiner i levercellen, såvel som i membranen som også i cytoplasma og i celleorganellene. Ved siden av de kjente fysiologisk relevante gallesyrebindende proteinene (54, 48, 33 kDa) blir også andre proteiner i levercellen merket (f.eks. 122, 35, 28 kDa).

Disse eksperimentene viser at de alkylerende, for de farmakologisk virkningsrelevante egenskapene til klorambucil også blir oppnådd etter kobling av virkestoffet til gallesyrene. De funnede radioaktive markeringene dreier seg om en merking av proteiner ved det intakte klorambucil-gallesyrekonjugatet, da den radioaktive markeringen er lokalisert i gallesyredelen.

Forbindelsene W-X-G ifølge oppfinnelsen blir også tatt ut av levercellene og kan alkylere proteiner. Egenskapene til klorambucil-molekylene (alkylerende virkning) og også til gallesyrene (benyttelse av spesifikk transportvei for gallesyrer) er forenet i W-X-G.

3. Metabolisering av "Eksempel 5" ved friskt isolerte hepatocytter

Friskt isolerte hepatocytter (1,8 x 10^6) i 750 µl buffer I blir inkubert med 5,5 µCi "Eksempel 5" ved 37°C. Etter 10, 20, 30, 40 og 60 min. ble hver gang 100 µl av cellesuspensjonen tatt ut, fortynnet med 10 ml iskald buffer I og sentrifugert i 5 min. ved 1.000 x g. Cellebunnfallet ble blandet 2 ganger hver gang med 100 µl kloroform/metanol-oppløsning (1/1, v/v) til ekstrahering av gallesyren. De organiske ekstraktene ble inndampet i en N_2-strøm, resten tatt ut i 20 µl dioksan og påført HPTLC-tynnsjiktsplater. Etter utvikling av kromatogrammene med n-butanol/eddiksyre/vann (9/1/2, v/v/v) som løpemiddel blir platene tørket, sprayet med 1 M natriumsalicylat-oppløsning i metanol og etter tørking belagt på en Kodak-X-Omat AR-røntgenfilm. Etter 1 ukes eksponering ved -80°C blir filmen fremkalt og fordelingen av radioaktivitet ved densitometri blir bestemt. Fordelingen av radioaktivitet er angitt i % på de enkelte metabolittene.

Inkubasjons-tid (min.)	"Eksempel 5" R_f=0,49	Metabolitt 1 R_f=0,32	Metabolitt 2 R_f=0,36	Metabolitt 3 R_f=0,21
10	31,34	33,79	38,03	5,62
20	26,51	29,49	32,25	11,74
30	23,76	29,88	34,18	12,16
40	13,78	33,52	40,93	11,75
60	11,00	33,7	45,7	10,3

Metabolitt 1: (3α,12β-dihydroksy-5β[12α-^{3}H]cholan-24-oyl)-2-aminoetansulfonsyre

Metabolitt 2: (3α,12α-dihydroksy-5β[12β-^{3}H]cholan-24-oyl)-2-aminoetansulfonsyre

Metabolitt 3: ikke identifisert

"Eksempel 5" blir tatt ut fra levercellene i det indre av cellen og frembragt til det intracellulære området i metabolismen. Klorambucil-gallesyrekonjugatet blir raskt hydrolytisk spaltet i virkestoffets frie klorambucil og gallesyre, klorambucil blir også bragt i form av gallesyrekonjugater i cellen med gallesyretransportsystemet, for der å virke farmakologisk.

Som gallesyrekoblet cytostatika er de dermed særlig egnet til behandling av malignomer og deres metastaser av slike celler, som med letthet kan oppta gallesyrer.

4. Interaksjon av gallesyrederivater med det intestinale gallesyretransportsystemet i terminal tynntarm

4.1 Fremstilling av børstekantmembranvesikler fra ileum i småkaniner

Fremstillingen av børstekantmembranvesikler fra tarmcellene i tynntarmen foregikk med den såkalte Mg^{2+}-presipitasjonsmetoden. Hannlige Neuseeland-småkaniner (2-2,5 kg kroppsvekt) ble tatt livet av ved intravenøs injeksjon av 0,5 ml T-61^{R}. Tynntarmen ble tatt ut og spylt med iskald fysiologisk koksaltoppløsning. Den terminale 3/10 delen av tynntarmen (målt i oral-rektal retning, dvs. den terminale ileum, som inneholder det aktive Na^{+}-avhengige gallesyre-transportsystemet) blir anvendt til fremstilling av børstekantmembranvesikler. Tarmene ble innfrosset i kunststoffposer under nitrogen ved -80°C. Til fremstilling av membranvesiklene ble de innfrosne tarmene tatt ut ved 30°C i vannbad. Mucosa ble skrapet av og suspendert i 60 ml iskald 12 mM Tris/HCl-buffer (pH 7,1)/300 mM mannitt, 5 mM EGTA/10 mg/l fenylmetylsulfonylfluorid/1 mg/l trypsin-inhibitor fra soyabønner (32 U/mg)/0,5 mg/l trypsin-hemmer fra kalvelunge (193 U/mg)/ 5 mg/l bacitracin. Etter fortynning i 300 ml med iskaldt destillert vann ble det homogenisert med en Ultraturrax (18-

Stab, IKA Werk Staufen, BRD) i 3 minutter ved 75% av maks. belastning under isavkjøling. Etter tilsetning av 3 ml 1 M $MgCl_2$-oppløsning (sluttkonsentrasjon 10 mM) lar man ekstraktet stå i 1 minutt ved 0°C. Ved tilsetning av Mg^{2+} aggregerer cellemembranen og presipiterer med unntak av børstekantmembranen. Etter en 15 minutters sentrifugering ved 3.000 $\bar{x}$ g (5.000 rpm, SS-34-rotor) blir bunnfallet kastet og supernatanten, som inneholder børstekantmembranene, blir sentrifugert i 30 minutter ved 26.700 x g (15.000 rpm, SS-34-rotor). Supernatanten blir kastet og bunnfallet blir homogenisert på nytt i 60 ml 12 mM Tris/HCl-buffer (pH 7,1)/ 60 mM mannitt, 5 mM EGTA med en Potter Elvehjem homogenisator (Braun, Melsungen, 900 rpm, 10 Hübe). Etter tilsetning av 0,1 ml 1 M $MgCl_2$-oppløsning og 15 minutters inkubasjonstid ved 0°C blir det på nytt sentrifugert i 15 minutter ved 3.000 x g. Supernatanten blir deretter sentrifugert igjen i 30 minutter ved 46.000 x g (15.000 rpm, SS-34-rotor). Bunnfallet blir tatt ut i 30 ml 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4/300 mM mannitt og suspendert på nytt homogent med 20 Hübe i en Potter Elvejhem homogenisator ved 1.000 rpm. Etter 30 minutters sentrifugering ved 48.000 x g (20.000 rpm, SS-34-rotor) ble bunnfallet tatt ut i 0,5 til 2 ml Tris/Hepes-buffer (pH 7,4/280 mM mannitt (sluttkonsentrasjon 20 mg/ml) og suspendert på nytt ved hjelp av en tuberkulinsprøyte med en 27 Gauge-nål. Vesiklene blir enten anvendt umiddelbart etter fremstillingen til transportundersøkelse eller oppbevart ved -196°C i 4 mg porsjoner i flytende nitrogen.

4.2 Hemming av Na^+-avhengige [^{3}H]taurocholat-opptak i børstekantmembranvesikkel i ileum

Opptaket av substrater i børstekantmembranvesikkel ble bestemt ved hjelp av den såkalte membranfiltreringsteknikken. 10 µl av vesikkelsuspensjonen (100 µg protein) ble pipettert på veggen til et lite polystyrolinkubasjonsrør (11 x 70 mm), som inneholdt inkubasjonsmediet med tilsvarende ligander (90 µl). Inkubasjonsmediet inneholdt 0,75 µl = 0,75 µCi [^{3}H(G)]-taurocholat (spesifikk aktivitet: 2,1 Ci/mmol),/

0,5 µl 10 mM taurocholat/8,75 µl natrium-transport-buffer (10 mM Tris/Hepes (pH 7,4)/100 mM mannitt/100 mM NaCl) (Na-T-P) h.h.v. 8,75 µl kalium-transport-buffer (10 mM Tris/Hepes (pH 7,4)/100 mM mannitt/100 mM KCl) (K-T-P) og 80 µl av vedkommende inhibitoroppløsning, oppløst etter hvert eksperiment i Na-T-buffer h.h.v. K-T-buffer. Inkubasjonsmediet ble filtrert gjennom et polyvinylidenfluorid-membranfilter (SYHV LO 4NS, 0,45 um, 4 mmø, Millipore, Eschborn, BRD). Ved blanding av vesikler med inkubasjonsmediet ble transportmålingen startet. Konsentrasjonen av taurocholat i inkubasjonsblandingen utgjorde 50 µM. Etter ønsket inkubasjonstid (vanligvis 1 min.) ble transporten stoppet gjennom tilsetning av 1 ml iskald stoppoppløsning (10 mM Tris/Hepes, (pH 7,4)/150 mM KCl). Den oppstående blandingen blir raskt suget av i vakuum fra 25 til 35 mbar over et membranfilter av cellulosenitrat (ME 25, 0,45 µm, 25 mm diameter, Schleicher & Schuell, Dassell, BRD). Filteret blir ettervasket med 5 ml iskald stoppoppløsning.

Til måling av opptak av radioaktivt merket taurocholat blir det benyttet membranfilter med 4 ml av scintillators Quickszint 361 (Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt, BRD) og radioaktiviteten blir målt i væske-scintillasjonsmåling i et måleapparat TriCarb 2.500 (Canberra Packard GmbH, Frankfurt, BRD). De målte verdiene blir oppnådd etter kalibrering av utstyret ved hjelp av standardprøver og etter korrektur evt. foreliggende kjemiluminescens som dpm (dekomposisjoner pr. minutt).

Kontrollverdiene blir hver gang undersøkt i Na-T-P og K-T-P. Differansen mellom opptak i Na-T-P og K-T-P gir den Na^+-avhengige transportandelen. Ved at IC_{50} Na^+ hver gang ble betegnet som konsentrasjon på hemmer, som den Na^+-avhengige transportandelen var hemmet til 50% - med hensyn til ~~kon~~trollen ; gjelder tilsvarende for angivelse av IC_{25}- og IC_{75}-verdiene.

Resultater se Tabell 1

Tabell 1

Innvirkning av gallesyrederivater på Na+-avhengige taurocholat-opptak

Derivater	Eksempler	IC_{25}	IC_{50}	IC_{75}
Naturlige gallesyrer	Taurocholat		48 µM	
	Taurochenodesoksycholat		23 µM	
	Taurolitocholat		12 µM	
	Taurolitocholat-3-sulfat		245 µM	
	Klorambucil	ingen hemming		
Klorambucil	Eksempel 66	60 µM	86,5 µM	148 µM
	Eksempel 68	60 µM	89 µM	250 µM
	Eksempel 67	24 µM	47,5 µM	270 µM
Peptid	Eksempel 119	48 µM	134 µM	
	Eksempel 120	38 µM	87 µM	178 µM
	Eksempel 121	30 µM	84 µM	172 µM
	Eksempel 122	19 µM	107 µM	237 µM
HMG-CoA-reduktase-hemmer	Eksempel 125	12 µM	46 µM	104 µM
	Eksempel 85	18 µM	43 µM	64 µM
	Eksempel 105	11 µM	22,5 µM	45 µM
	Eksempel 115 (Na-salt)	12 µM	28 µM	44 µM
	Eksempel 87	16 µM	56 µM	70 µM
	Eksempel 81	15 µM	38 µM	64 µM
	Eksempel 82 (Na-salt)	17 µM	48 µM	80 µM
	Eksempel 101	19 µM	40 µM	68 µM
	Eksempel 86	14 µM	62 µM	87 µM
	Eksempel 111	10 µM	24 µM	39 µM
	Eksempel 94	4,5 µM	13 µM	24 µM
	Eksempel 93	3,2 µM	8 µM	23 µM
	Eksempel 90	3,8 µM	12 µM	27 µM

5. Opptak av gallesyrederivater gjennom leveren fra portåre-blod og utskillelse i gallen

Til undersøkelse av selektive opptak av gallesyrederivater i leveren og deres hepatotropiske virkning blir narkotiserte rotter injisert tilsvarende derivat som bolus i en mesenterialvene og analysering av utskillelsen av dette derivatet såvel som tilsvarende virkestoff h.h.v. virkestoff-metabolitt i gallen.

5.1 In vivo-perfundert lever

Hannlige Spraque-Dawley-rotter (300-500 g kroppsvekt) ble satt vekk fra fôr, men fikk vann ad libitum. I uretannarkose (5 ml/kg i.m. uretan 30%) ble etter tracheotomi abdomen åpnet med mediansnitt. Pylorus blir ligert og gallegangen kanylert ved fremskyving av en polyetylenslange (d = 0,05 mm) fram til foran leveren og gallen drenert. Sekretvolumet blir målt i 15 minutters avstander. Etter et 60 minutters forløp blir substansene (0,5 ml av en 1 mM oppløsning i 0,9% NaCl-oppløsning) i løpet av 30 sek. applisert i en mesenterialvene og gallen blir oppsamlet i de forangivende tidsintervallene (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 min.). Deretter blir gallesyrederivatet applisert, og etter en 2 timers samleperiode blir tilsvarende virkestoff applisert. 120 min. etter testsubstans-tilsetning blir blærevolumet målt og urinen eventuelt oppsamlet. Galle- og urinprøvene blir i løpet av forsøket lagret på is og deretter dypfrosset.

5.2 Analyse av gallesyrederivater i gallen

Hver 10 µl galleprøve blir tatt ut med mikrocaps (Firma Drummond, Broomall, USA) på DC-pater (10 x 20 cm, kiselgel 60 spesialsjikt-tykkelse 0,25 mm, nr. 37581 Firma Riedel-de Haen, Seelze, BRD) og tynnsjiktplaten blir tørket i luft i 20 minutter.

Platene blir utviklet i følgende løpemidler:

Substans	Løpemiddel
Klorambucil	Kloroform/metanol (10/1, v/v)
Eksempel 67	Butanol/iseddik/vann (9/2/1, v/v)
Eksempel 125 K^+-salt	Butanol/iseddik/vann (9/2/1, v/v)
Eksempel 85	Butanol/iseddik/vann (9/2/1, v/v)
Eksempel 87	Kloroform/metanol (3/1, v/v)
Eksempel 86	Kloroform/metanol (3/1, v/v)

Bestanddelene i løpemiddelet blir fremstilt på vanlig måte med høyest mulig renhetsgrad. Etter utvikling og tørking av platene blir fordelingen av virkestoffene og gallesyrederivatene, h.h.v. deres metabolitter bestemt ved densitometri (Densitometer CD 50, DESAGA; Heidelberg). Påvisningen foregår i refleksjonsmodus ved lineær avtasting ved bølgelengdene 252 nm (klorambucil/klorambucil-konjugat) h.h.v. 260 nm (resterende substanser).

For bedømmelse av kromatogrammene blir relativ intensitet av gallesyrederivatene, virkestoffene h.h.v. virkestoffmetabolittene angitt på en kromatogram i flateenheter.

Tabell 2A

W: Klorambucil
W-X-G: Eksempel 67

Konsentrasjon av W, W-X-G h.h.v. W-metabolitt i flate-enheter (lineær-modus til densitometer)

Tid	W (stamforbindelse)	W-X-G (Gallesyre-virkestoff-derivat)		
	Kons. av W eller en metabolitt av W i galle	(1) Kons. av W eller en metabolitt av W i galle	(2) Kons. W-X-G i galle	Sum (1) + (2)
2'	1.012	0	1.207	1.207
4'	885	0	17.803	17.803
6'	1.044	0	21.762	21.762
8'	1.160	0	27.280	27.280
10'	810	0	27.346	27.346
15'	689	0	16.673	16.673
20'	1.481	0	10.748	10.748
30'	704	0	5.375	5.375
40'	511	0	1.273	1.273
50'		0	828	828
60'	620	0	633	633
70'	1.769	0	826	826
80'	501	0	635	635
90'	813	0	638	638
100'	523	0	559	559
110'	604	0	408	408
120'	531	0	383	383

303450

Tabell 2B

Tid	W (stamforbindelse) Eksempel 125 K^+-salt			W-X-G (gallesyre-virkestoff-derivat) Eksempel 85		
	Utgangssubstans Eksempel 125	Polar metabolitt	Sum stam-forbindelse + metabolitt	Polar metabolitt fra Eks. 125	W-X-G stam-forb.	Sum stam-forb. + metabolitt
2'	960	760	1.720	3.240	2.440	5.680
4'	1.320	1.200	2.520	3.440	3.680	7.120
6'	1.480	2.400	3.880	4.160	4.600	8.760
8'	1.440	2.200	3.640	4.920	4.240	9.160
10'	3.741	2.658	6.399	6.000	3.640	9.640
15'	5.212	2.277	7.489	6.040	2.680	8.720
20'	8.747	2.782	11.529	6.200	2.400	8.600
30'	10.171	2.757	12.928	4.160	1.960	6.120
40'	5.482	2.007	8.840	3.560	1.920	5.480
50'	4.320	2.302	6.622	2.920		
60'	3.157	2.891	6.048	2.520		
70'	2.134	2.059	4.193	2.440		
80'	1.409	2.233	3.642			
90'	1.053	2.042	3.095			
100'	1.276	2.005	3.281			
110'	1.523	1.935	3.458			
120'	1.554	1.441	3.955			
	Konsentrasjon i lineær-modus til densitometer			Konsentrasjon i lineær-modus til densitometer		

303450

Tid	Eksempel 86 Polar metabolitt fra Eks. 125	W-X-G (stam-forbind.	Sum stam-forbindelse + metabolitt	Eksempel 87 Polar metabolitt fra Eks. 125	W-X-G stam-forb.	Sum.stam-forb. + metabolitt
2'	1.040	120	1.160	560	720	1.280
4'	1.120	1.440	2.560	600	1.000	1.600
6'	1.720	3.240	4.960	640	1.680	2.320
8'	2.880	3.680	6.560	720	2.280	3.000
10'	4.080	3.480	7.560	1.000	2.440	3.440
15'	5.160	1.920	7.080	1.040	2.240	3.280
20'	4.880	720	5.600	1.640	2.080	3.720
30'	4.160	320	4.480	1.600	1.480	3.080
40'	3.080	< 50	< 3.130	1.520	920	2.440
50'	2.960	< 50	< 3.010	1.840	520	2.360
60'	2.560	< 50	< 2.610	2.000	400	2.400
70'	2.120	< 50	< 2.170	1.520	360	1.880
80'	1.920	< 50	< 1.970	1.680		
90'	1.680	< 50	< 1.730	1.600		
100'	1.440	< 50	< 1.490	1.440		
110'	1.280	< 50	< 1.330	1.440		
120'	1.040	< 50	< 1.090			
	Konsentrasjonsangivelse i lineær-modus til densitometer			Konsentrasjonsangivelse i lineær-modus til densitometer		

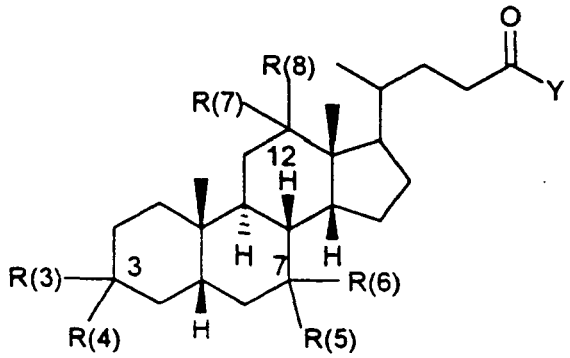
303450

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive gallesyrederivater med formel I

W - X - G I

bestående av en modifisert gallesyrerest G:



G

hvor R(3) - R(8) er like eller forskjellige og har følgende betydning:

en binding til W-X-, hvori det samlet kan være bundet inntil to W-X-enheter,
R(3) og R(4), R(5) og R(6), R(7) og R(8) sammen med oksygen betyr en karbonylgruppe,

				O	O	O	O
				‖	‖	‖	‖
H,	-SL,	-NHL,	$-NL_2$,	-S-C-L,	-NH-C-L,	-O-P-OL,	-O-S-OL,
						|	‖
						OL	O

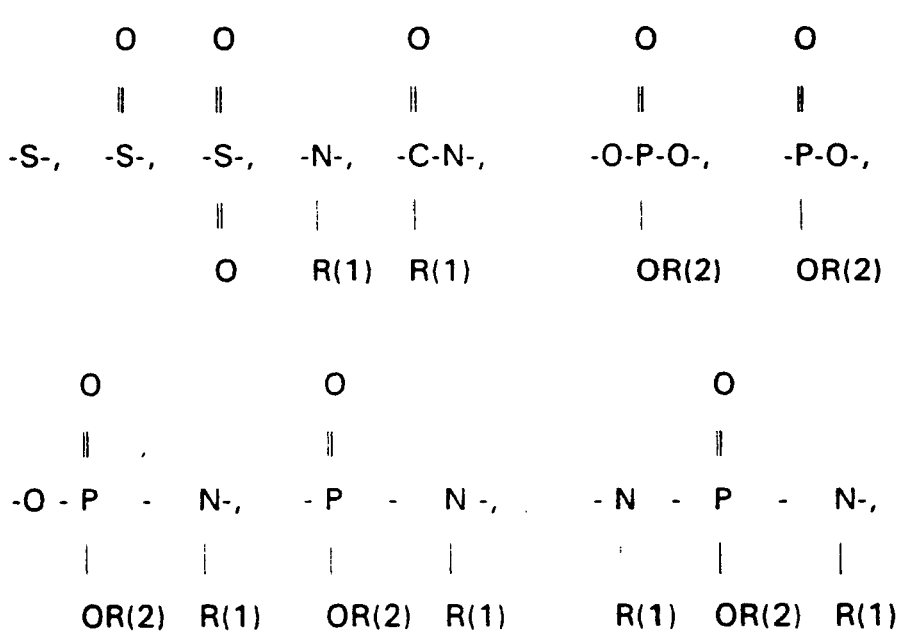
-L, hvori L betyr:

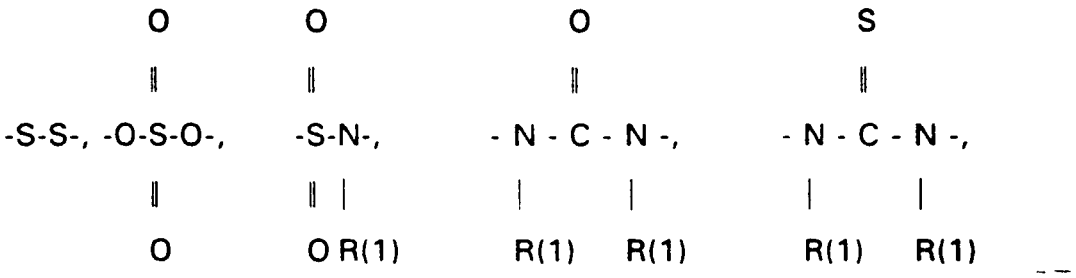
H, en mettet eller umettet alkylrest med 1-10 C-atomer, som er forgrenet eller uforgrenet, cykloalkyl med 3-8 C-atomer, en fenylrest (som er usubstituert eller substituert 1-3

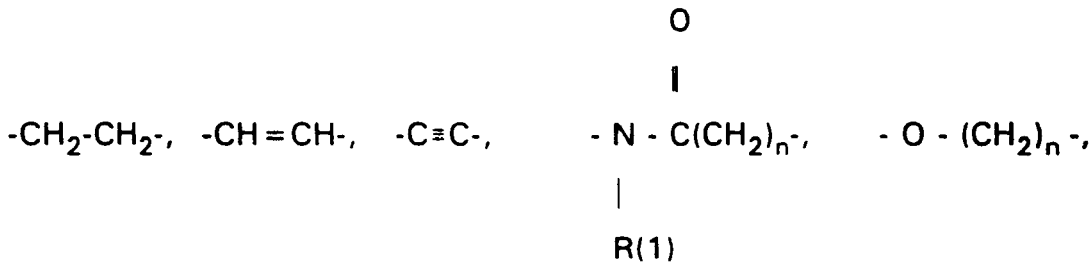
ganger med F, Cl, Br, (C_1-C_4)-alkyl eller (C_1-C_4)-alkoksy, en benzylrest som er usubstituert eller substituert 1-3 ganger med F, Cl, Br, (C_1-C_4)-alkyl eller (C_1-C_4)-alkoksy;

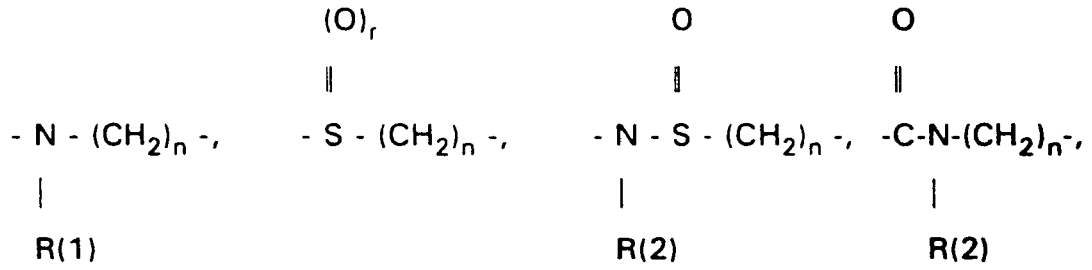
og hvori Y betyr -OH, -ONa, -OMe eller $-NHCH_2CH_2SO_3H$;

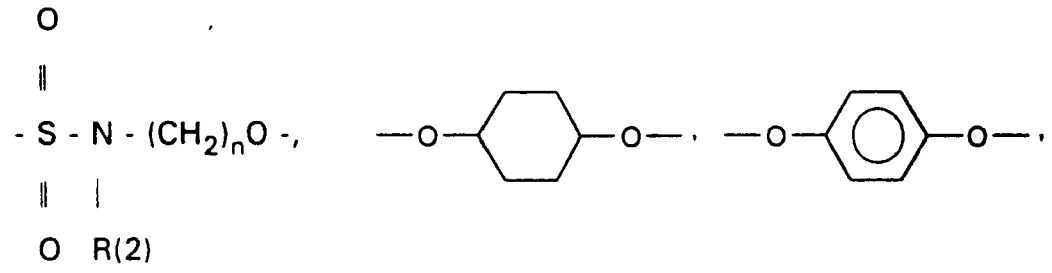
et forbindelsesledd X som er en direktebinding eller et mellom ledd X:

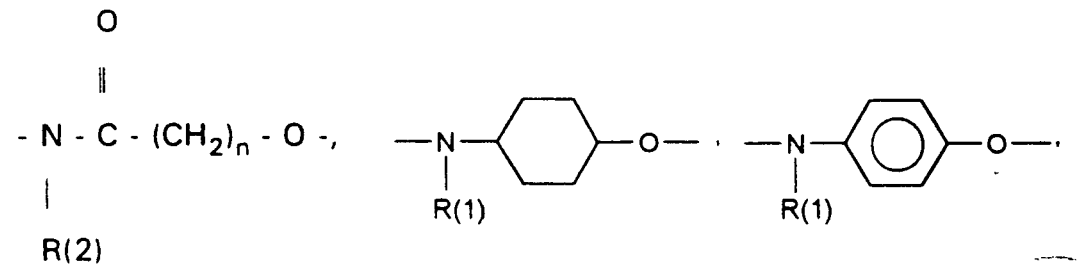


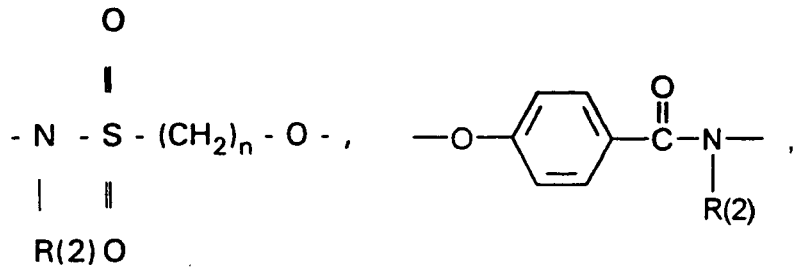


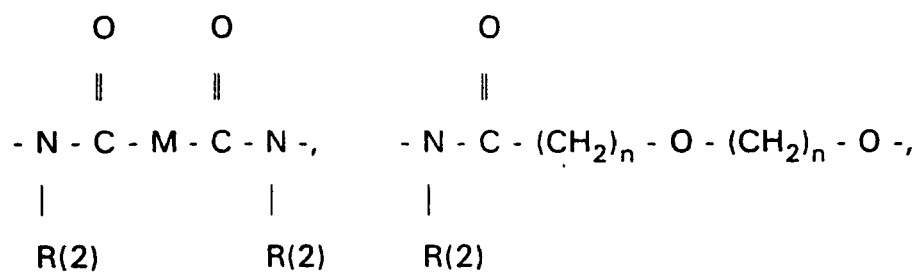


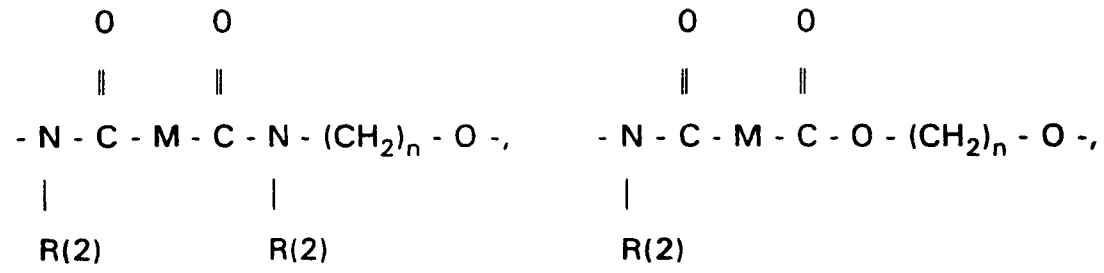












hvori R(1) = H, (C_1-C_8)-alkyl; gruppen R(2)-C(=O)-, fenyl, benzyl, usubstituert eller 1-3 ganger substituert med F, Cl, Br, (C_1-C_4)-alkyl eller alkoksy med 1-4 C-atomer

R(2) = H, (C_1-C_8)-alkyl, fenyl, benzyl, usubstituert eller 1-3 ganger substituert med F,

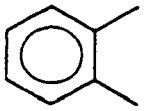
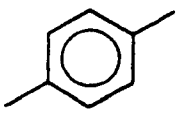
Cl, Br, (C_1-C_4)-alkyl eller alkoksy med 1-4 C-atomer

m = 0-6

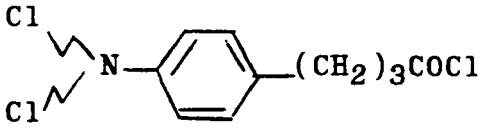
n = 1-16

p = 1, 2, 3

r = 0-2 og

M = $-(CH_2)_m-$, $-(C=C)_p-$, $-C\equiv C-$,  , 

og en virkestoffdel W, der W er klorambucil,



HMG-CoA Reductase-hemmer, eller prolylhydroksylasehemmer, k a r a k t e r i s e r t v e d at at man

a) i tilfelle X = en direkte binding, bringer en gallesyre G på en av dens -OH-grupper i 3, 7 eller 12 posisjon til reaksjon med en aktivert form av en karboksylsyregruppe av virkestoffet W eventuelt under tilsetning av en base eller

b) i tilfelle X = en direkte binding, bringer en gallesyre G på en av dens med en beskyttelsesgruppe beskyttede -OH-grupper i 3, 7 eller 12 posisjon til reaksjon med en aktivert form av en karboksylsyregruppe av virkestoffet W eventuelt under tilsetning av en base eller

c) i tilfelle X = et mellomledd, bringer karboksylsyregruppen eller aktivert karboksylsyregruppe av virkestoffet til reaksjon med den terminale aminogruppen av X fra G-X delen eventuelt under tilsetning av en base eller

d) i tilfelle X = et mellomledd, bringer en gallesyre G som i 3, 7 eller 12 posisjon bærer en aminogruppe til reaksjon på denne aminogruppen med en terminalkarbok-

sylsyregruppe eller aktivert karboksylsyregruppe av X fra X-W delen eventuelt under tilsetning av en base.