



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **310239**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 H 5/04, A 61 K 31/70

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19975644	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1996.06.05, PCT/US96/09578
(22) Inng. dag	1997.12.04	(85) Videreføringsdag	1997.12.04
(24) Løpcedag	1996.06.05	(30) Prioritet	1995.06.05, US, 461675
(41) Alm. tilgj.	1998.02.04		
(45) Meddelt dato	2001.06.11		

(71) Patenthaver	Eisai Co Ltd, 6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, JP
(72) Oppfinner	William J. Christ, Andover, MA, US Daniel P. Rossignol, Andover, MA, US Seiichi Kobayashi, Tsuchiura-shi, Ibaraki-ken, JP Tsutomu Kawata, Andover, MA, US
(74) Fullmektig	Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Substituerte liposakkarider anvendelige ved behandling og forebygging av endotoksemi**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Nye substituerte liposakkarider nyttige for profylaktisk og lindrende behandling av endotoksemi omfattende sepsis, septikemi og forskjellige former for septisk sjokk og metoder for anvendelse av disse midlene er beskrevet. Også beskrevet er metoder for fremstilling av disse midlene og mellomprodukter nyttige i dem.

OMRÅDE FOR OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse angår forbindelser som er nyttige for profylaktisk og positiv behandling av endotoksin-smitte, omfattende sepsis, septikemi, endotoksemi og forskjellige former av septisk sjokk, og anvendelse av disse forbindelser for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av sepsis ved bolusinjeksjon.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Oppfinnelsen angår analoger av Lipid A som er nyttige som inhibitorer av endotoksemi.

Forekomst av gram negativ bakteriemi i USA er beregnet å være omtrent 100,000 til 300,000 tilfeller pr. år, med en dødelighet på 30 - 60%. Antibiotika blir vanligvis anvendt som den primære kjemoterapi for denne sykdom; imidlertid kan deres baktericide virkning resultere i sprengning av bakterien og samtidig frigjøring av endotoksin, dvs. lipopolysakkarid- (LPS) gruppen på bakteriens ytre membran. Frigjort LPS fremkaller en rekke patofysiologiske hendelser hos pattedyr (kollektivt betegnet gram-negativ endotoksemi eller sepsis-syndrom). Disse omfatter feber, generell betennelse, disseminert intravaskulær koagulering (DIC), hypotensjon, akutt nyresvikt, akutt respiratory distress syndrom (ARDS), hepatocellulær destruksjon og hjerte-svikt.

Selv om endotoksin initierer septisk sjokk, har det liten eller ingen direkte toksisk virkning på vev, men setter istedet igang en immunobiologisk respons som fører til en kaskade av frigjøring av cytokiner, så som tumor-nekrose-faktor (TNF), interleukin-1, interleukin-6 og interleukin-8 og andre biologiske mediatorer, så som nitrogenoksyd, så vel som en rekke sekundære mediatorer (f.eks., prostaglandiner, leukotriener, interferoner, blodplate-aktiverende faktor, endorfiner og kolonistimulerende faktorer). Dannelse av patofysiologiske konsentrasjoner av disse cytokiner og inflammatoriske mediatorer innvirker på vasomotorisk aktivitet, mikrovaskulær permeabilitet og aggregering av leukocytter og blodplater, hvilket

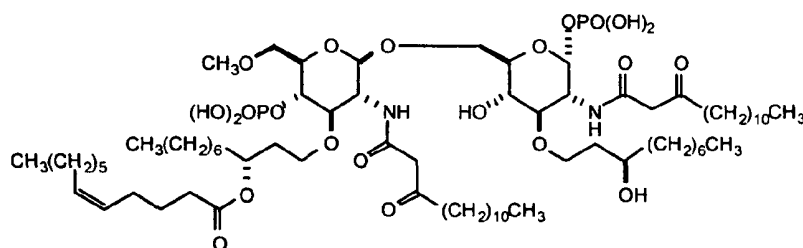
fremkaller et syndrom betegnet systemisk inflammatorisk respons-syndrom (eller SIRS) og septisk sjokk.

Det bakterielle lipopolysakkarid-molekylet har tre hoved-regioner: et langkjedet polysakkarid (O Antigen), en kjerne-region og en Lipid A-region. Hele lipopolysakkarid-molekylet, så vel som noen av dets individuelle komponenter har toksiske virkninger som beskrevet ovenfor. Imidlertid er mesteparten av disse toksiske virkningene antatt å kunne tilskrives Lipid A-delen. Strukturelt er Lipid A sammensatt av et difosorylert disakkarid acylert med langkjedede fettsyrer.

Behandling av endotoksin-relaterte sykdommer har generelt vært styrt mot kontroll av den inflammatoriske respons. Slik terapi omfatter kortikosteroid-behandling, som er antatt å bedre endotoksin-medierte cellemembran-skade og redusere produksjon av visse biologiske mediatorer; administrering av antistoffer for å nøytralisere bakteriell LPS; behandling med midler for å undertrykke hypotensjon eller med naloxon som synes å blokkere de hypotensive virkningene knyttet til sepsis-syndrom, og behandling med ikke-steroidale anti-inflammatoriske medikamenter som er angitt å blokkere cyklooxygenaser og derved redusere produksjon av visse sekundære mediatorer så som prostaglandiner og tromboksan.

Ingen av disse terapiene har imidlertid hittil resultert i en betydelig reduksjon i sykdom og dødelighet som er et resultat av sepsis og septisk sjokk-syndrom. Det har således lenge vært behov for midler for positiv behandling av disse lidelser.

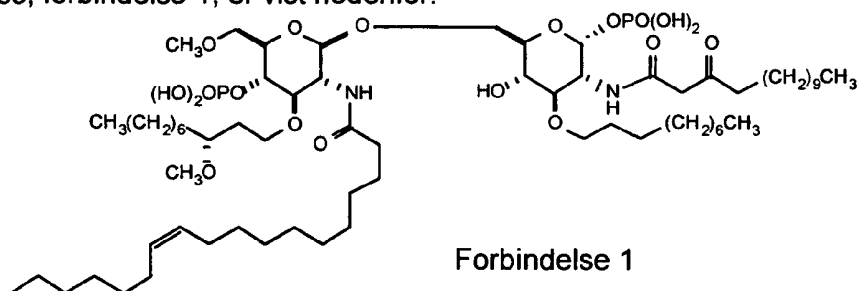
Christ, et al., "Anti-Endotoxin Compounds," U.S.S.N. 07/935,050, innlevert 25. August 1992, hvis innhold er inkludert ved referanse, beskriver visse disakkarid-forbindelser, så som B531 vist nedenfor, som er nyttige for behandling av endotoksemi.



B531

Andre referanser som beskriver visse lipodisakkarider omfatter Macher, et al., britisk patent 2,179, 945, Meyers, et al., britisk patent 2,220,211, Shiba, et al., europeisk patent 172,581, Anderson, et al., U. S. Patent 4,495,346 og Shiba, et al., U. S. Patent 5,066,794.

Foreliggende oppfinnelse angår forbindelser som kan brukes ved behandling av sepsis, septisk sjokk, endotoksemi og beslektede lidelser ved anvendelse av nye liposakkarid-analoger. Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse har fordeler ved farmasøytisk anvendelse, så som forbedret farmakologisk selektivitet, effektivitet og spesielt øket virkningsvarighet. En representativ forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, forbindelse 1, er vist nedenfor:



Forbindelse 1

Lidelsene ovenfor omfatter, men er ikke begrenset til, sepsis, septikemi (omfattende, men ikke begrenset til endotoksemi), endotoksemi som er et resultat av gram negativ bakteriemi (med medfølgende symptomer som feber, generell inflammasjon, disseminert intravaskulær koagulering, hypotensjon, akutt nyresvikt, akutt respiratory distress syndrom, adult respiratory distress syndrom (ARDS), hepatocellulær destruksjon og/eller hjertesvikt) og forskjellige former for septisk sjokk

(omfattende, men ikke begrenset til endotoksisk sjokk). Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse vil også være nyttige ved profylaktisk eller positiv behandling av lokalisert eller systemisk inflammatorisk respons på infeksjon med forskjellige typer organismer, omfattende gram negative bakterier og ved sykdommer relatert til translokasjon av gram negative bakterier eller endotoksin fra tarmen.

Sammen blir disse lidelsene betegnet systemisk inflammatorisk respons-syndrom eller SIRS (For en beskrivelse av disse betegnelse, se Bone, et al., Chest 1992; 101: 1644-55).

Definisjoner

I henhold til foreliggende oppfinnelse og som anvendt her, er følgende betegnelser definert med følgende betydninger, hvis ikke annet spesielt er angitt.

Betegnelsen "alkyl" betegner alifatiske organiske grupper som kan være forgrenede eller lineære og som eventuelt kan være substituert med ett eller flere halogen-atomer i hvilken som helst stilling i alkylkjeden. Alkyl-grupper omfatter både grupper som har en enkel ubesatt valens, for eksempel $\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ og alkylene-grupper som har to ubesatte valenser, for eksempel $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$. Som det vil være klart for fagfolk på området, vil enkle eller doble ubesatte valenser anvendes etter hva som passer for å beskrive forbindelser som er kjemisk stabile.

Betegnelsen "prodrug" som anvendt her betyr en hvilken som helst forbindelse som har mindre egen aktivitet enn "medikamentet", men som når det blir administrert til et biologisk system danner "medikament"-substansen enten som et resultat av spontan kjemisk reaksjon eller ved en enzym-katalysert eller metabolisk reaksjon. Referanse er gjort til forskjellige prodrugs så som acyl-estere, karbonater, fosfater og uretaner, inkludert her som eksempler. Gruppene illustrert er eksempler, og ikke altomfattende, og fagfolk på området kan fremstille andre kjente varianter av prodrugs. Slike prodrugs av forbindelsene med formel I omfattes av omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Betegnelsen "farmasøytisk godtagbart salt" omfatter salter av forbindelser med formel I avledet fra en kombinasjon av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse og en organisk eller uorganisk syre eller base. Forbindelsene med formel I er nyttige både i ikke-ionisert form og saltform. I praksis innebærer anvendelse av saltform base-form, og begge former omfattes av omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Betegnelsen "geometriske isomerer" betegner "trans" eller "cis" isomerer som generelt er forstått av fagfolk på området. Alle geometriske isomerer omfattes av omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Videre kan forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse inneholde asymmetriske karbonatomer og kan således eksistere som stereoisomerer, både enantiomerer og diastereomerer. Alle stereoisomerer og blandinger derav skal omfattes av omfanget av foreliggende oppfinnelse. Syntese-eksemplene angitt her gir den mest foretrukne isomer. Det er klart at i tillegg til sukker-gruppen kan ytterligere asymmetriske karbonatomer være til stede i forbindelser med formel I, for eksempel i sidekjeder. I dette tilfellet omfattes alle de resulterende diastereomerene av omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Kort beskrivelse av figurene

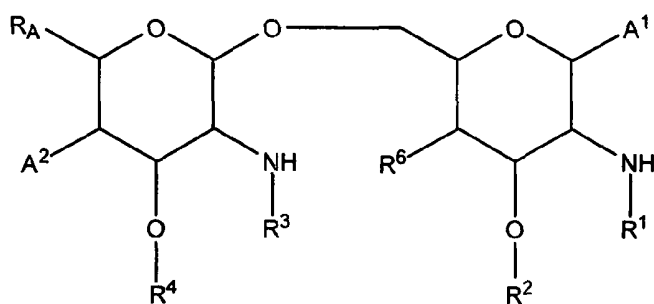
Figur 1 viser hemning av frigjøring av $\text{TNF-}\alpha$ av Forbindelse 1, hvilket illustrerer hemning av LPS-mediert fremkalling av tumor nekrose faktor (TNF) i fullblod fra mennesker, av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 2 viser det generelle skjema anvendt for å analysere antagonistisk effektivitet til medikamentet etter inkubering i fullblod forskjellige tider.

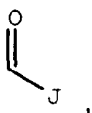
Figur 3 viser sammenhengen mellom tid og evnen til test-forbindelsen til å hemme $\text{TNF-}\alpha$ og demonstrerer at Forbindelse 1 har en overlegen virkningsvarighet som LPS-antagonist sammenlignet med B531. Disse data er gjennomsnittet av 7 separate eksperimenter, hvert kjørt in triplo.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSENNYE LIPOSAKKARIDER

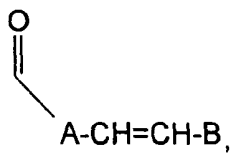
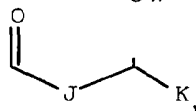
I et aspekt angår foreliggende oppfinnelse substituerte liposakkarider som omfatter forbindelser med den generelle formel I



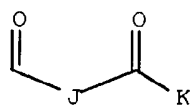
hvor R¹ er valgt fra gruppen bestående av



OW



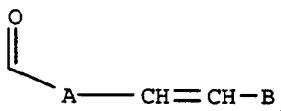
og



hvor hver J og K uavhengig er lineær eller forgrenet C1 til C15 alkyl;

R^2 er lineær eller forgrenet C5 til C15 alkyl;

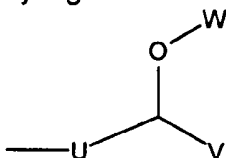
R^3 er valgt fra gruppen bestående av lineær eller forgrenet C5 til C18 acyl,



hvor hver A, B og D uavhengig er lineær eller forgrenet C1 til C15 alkyl;

R^4 er valgt fra gruppen bestående av

lineær eller forgrenet C4 til C20 alkyl og



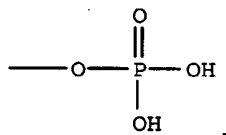
hvor hver U og V uavhengig er lineær eller forgrenet C2 til C15 alkyl og W er

hydrogen eller lineær eller forgrenet C1 til C5 alkyl;

R_A er R^5 eller $R^5\text{-O-CH}_2\text{-}$, idet R^5 er lineær eller forgrenet C1 til C5 alkyl;

R^6 er hydroksy;

A^1 og A^2 er



eller et farmasøytisk godtagbart salt derav.

Utførelsesformer av formelen ovenfor omfatter de følgende eller kombinasjoner av de følgende:

R^2 er C8 til C15 lineær eller forgrenet alkyl;

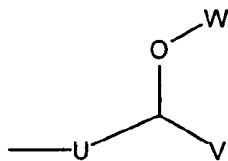
R^2 er C9 til C12 lineær eller forgrenet alkyl;

R^2 er C10 lineær eller forgrenet alkyl;

dobbeltbindingene i R^3 er cis,

dobbeltbindingene i R^3 er trans;

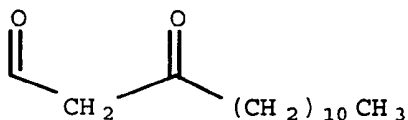
R^4 er valgt fra gruppen bestående av lineær eller forgrenet C4 til C20 alkyl og



hvor U er lineær eller forgrenet C2 til C5 alkyl, V er lineær eller forgrenet C5 til C12 alkyl og W er hydrogen eller lineær eller forgrenet C1 til C5 alkyl.

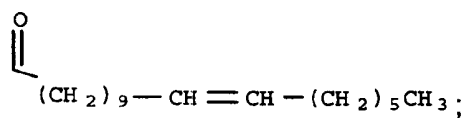
Ved en annen utførelsesform er

R¹

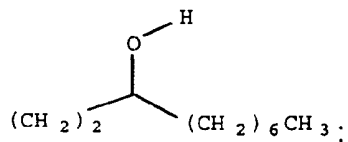


R² er (CH₂)₉CH₃;

R³ er



R⁴ er

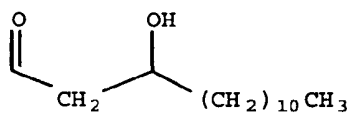


R⁵ er -CH₃; og

R⁶ er hydroksy.

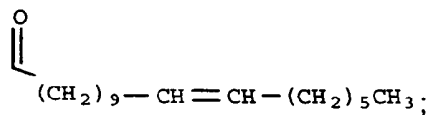
En annen foretrukket forbindelse er den hvori

R¹ er

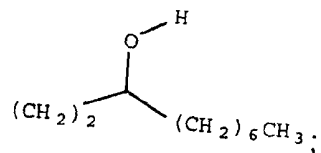


R² er (CH₂)₉CH₃;

R³ er



R⁴ er

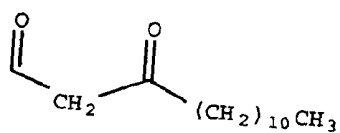


R⁵ er -CH₃;

R⁶ er hydroksy;

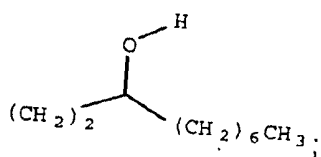
og en videre foretrukket forbindelse er den hvori

R¹ er



R² er (CH₂)₉CH₃, og R³ er (C=O)(CH₂)₁₆CH₃;

R⁴ er

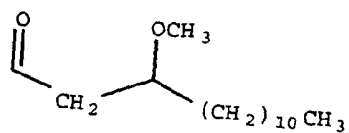


R⁵ er -CH₃; og

R⁶ er hydroksy.

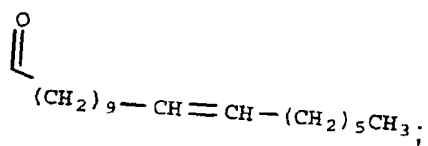
Dertil er en foretrukket forbindelse den hvori

R¹ er

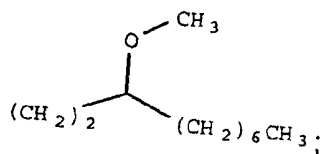


R² er (CH₂)₉CH₃;

R³ er



R⁴ er

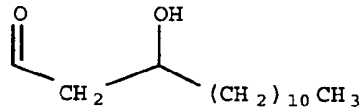


R⁵ er -CH₃; og

R⁶ er hydroksy;

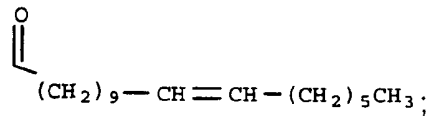
og også den hvori

R¹ er

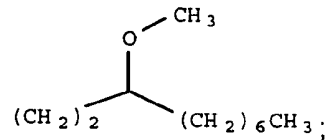


R² er (CH₂)₉CH₃;

R³ er



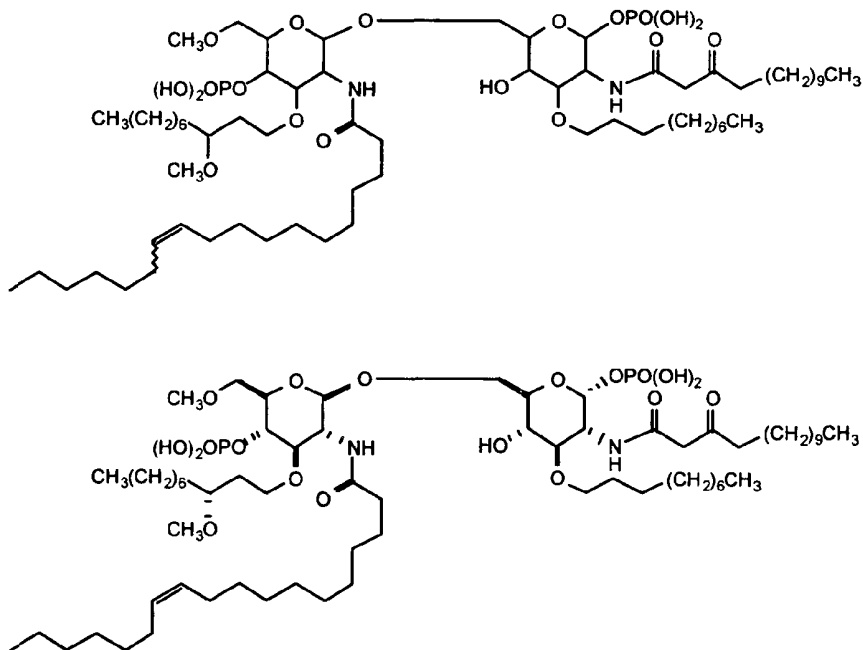
R⁴ er



R⁵ er -CH₃; og

R⁶ er hydroksy.

To ytterligere foretrukne forbindelser er forbindelsene med strukturene



og deres farmasøytisk akseptable salter.

Generelle syntese-metoder

Foreliggende oppfinnelse angår også fremgangsmåter for fremstilling av forbindelser med formel I. Beskrevet her er generelle synteseveier for fremstilling av forskjellige substituerte forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse. Syntese av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, forbindelse 1, er vist nedenfor.

Mesteparten av reagensene og utgangsmaterialene er velkjent for fagfolk på området. Visse reagenser og utgangsmaterialer for denne fremstillingen er beskrevet detaljert av Christ, et al., i U. S. søknad 07/935,050 som vil godkjennes som U. S. Pat. Nr. 5,530,113, og beskrivelsen der inntas her ved referanse.

En syntese av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er beskrevet nedenfor. Selv om dette eksempel beskriver fremstilling av forbindelse 1, vil anvendelse av alternative utgangsmaterialer gi andre analoger ifølge foreliggende oppfinnelse. Syntesen er således generell av natur.

For eksempel vil anvendelse av alternative alkyleringsmidler i syntesetrinn 22 gi analoger med strukturelt forskjellige substituenten ved R1.

Substitusjonsmønsteret ved R2 blir kontrollert ved anvendelse av det riktige alkyleringsmiddel i trinn 15.

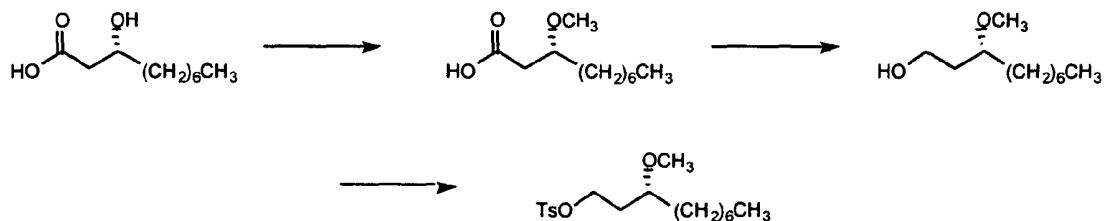
Videre vil substitusjon av egnede alternative forbindelser i trinn 25 i syntesen gi analoger som avviker med hensyn til R3.

Analoger uten den oksygenerte sidekjede ved R_A kan fremstilles ved anvendelse av mindre variasjoner i syntese-skjemaet vist nedenfor som er velkjent for fagfolk på området. For forbindelsen hvor R_A er metyl, kan for eksempel produktet fra syntese-trinn 8, tosylatet, ha den utgående gruppen erstattet av jod i Finklestein-reaksjonen. Jod-forbindelsen kan dehalogeneres ved behandling med sinkmetall, hvilket gir en metylgruppe i stilling R_A.

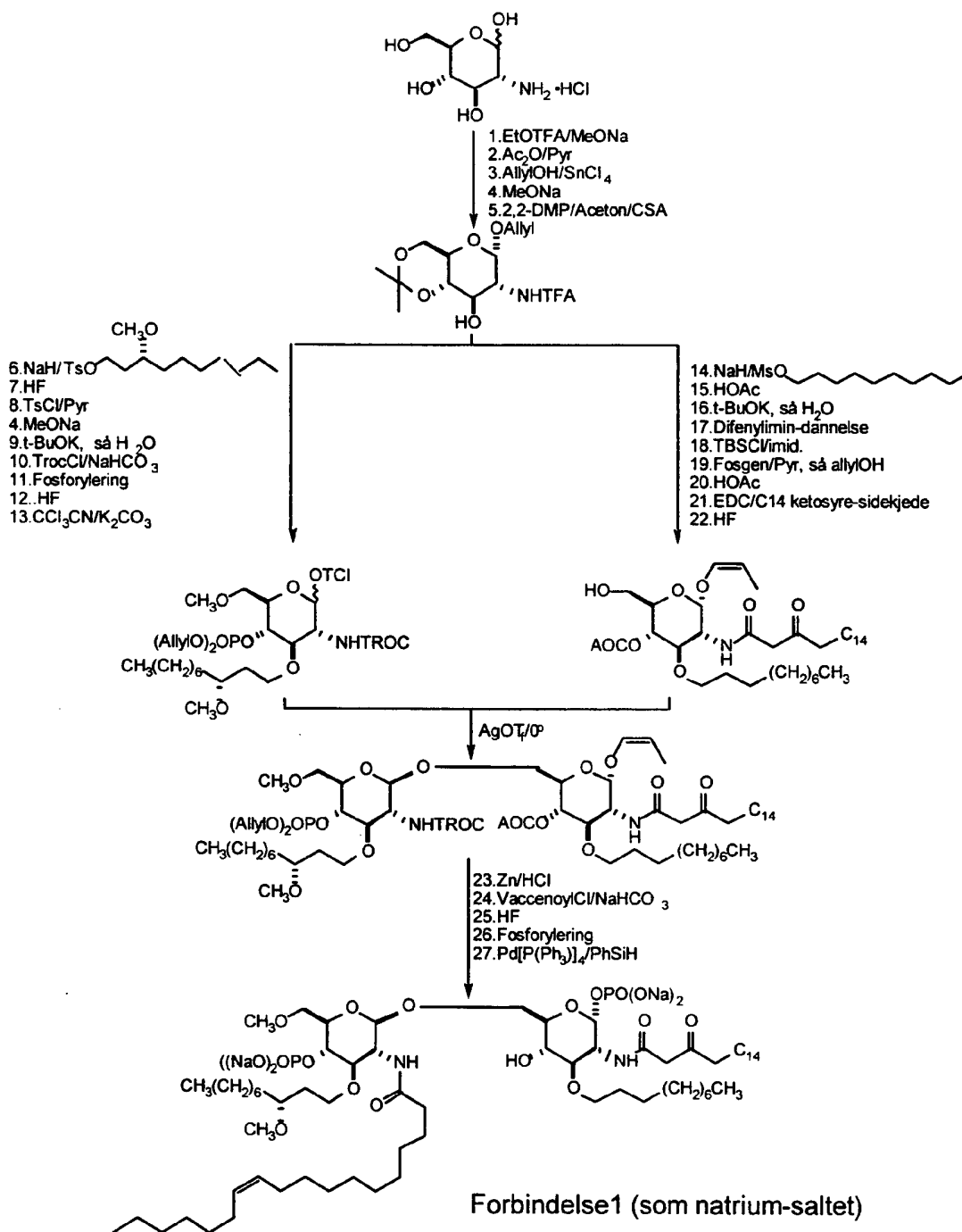
En representativ syntese av R4-sidekjeden er angitt nedenfor. Fremstilling av variasjoner av denne sidekjeden kan oppnås ved å erstatte utgangsmaterialet med andre egnede utgangsmaterialer. For eksempel kan lengden eller forgreningen av

denne sidekjeden fremstilles ved å starte med det passende utgangsmateriale.

Anvendelse av alternative tosylater i trinn 6 vil således gi variasjoner i R4.

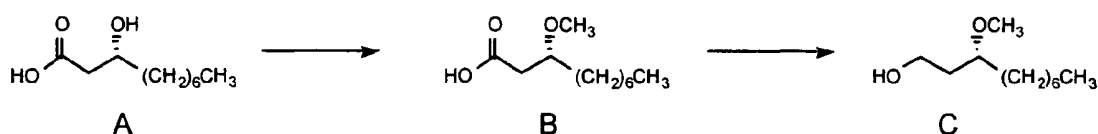


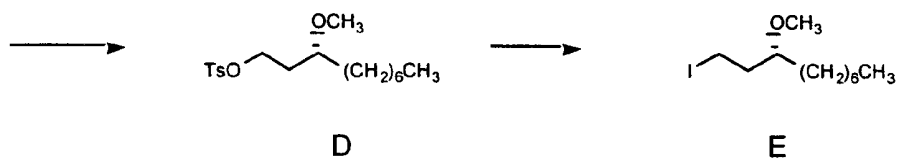
Syntesen beskrevet kort nedenfor gir således forskjellige veier for å oppnå forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse. (For detaljer angående syntesen, se de følgende eksperimentelle eksempler.)



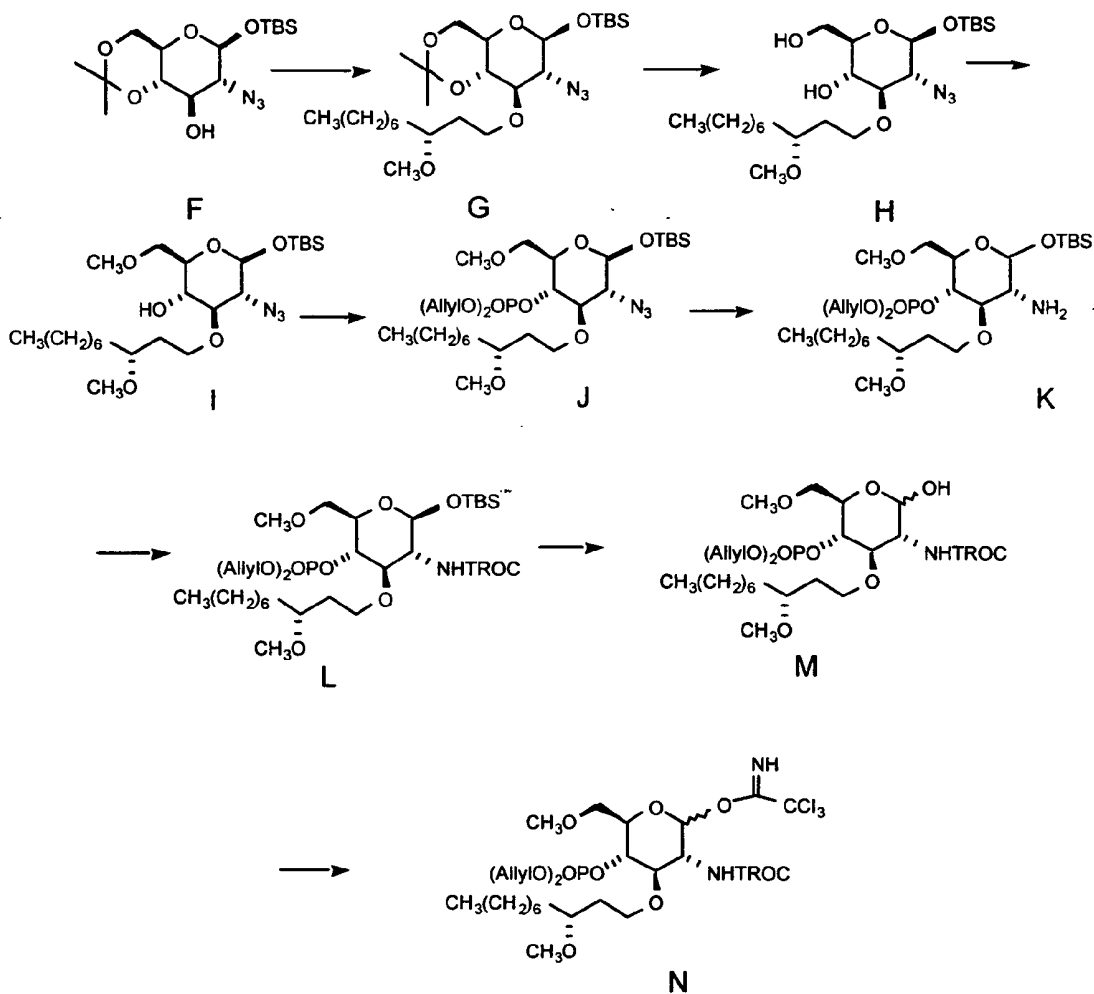
En representativ syntese av R4-sidekjeden er beskrevet nedenfor.

Fremstilling av variasjoner av denne sidekjeden kan oppnås ved å erstatte utgangsmaterialet med andre egnede utgangsmaterialer. For eksempel kan lengden eller forgreningen av denne sidekjeden fremstilles ved å starte med de passende utgangsmaterialene. (For detaljer angående denne syntese, se de følgende eksperimentelle eksempler.)

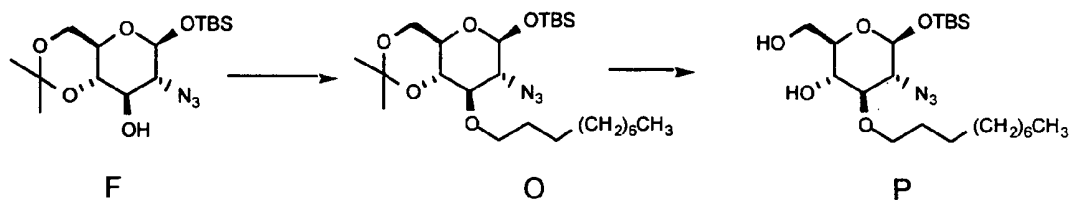


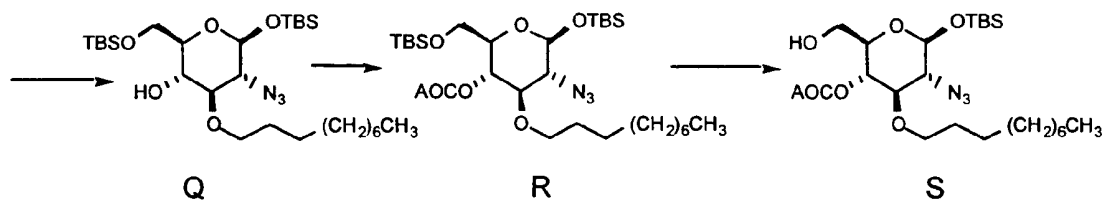


En representativ fremstilling av den "venstre" del er beskrevet nedenfor.

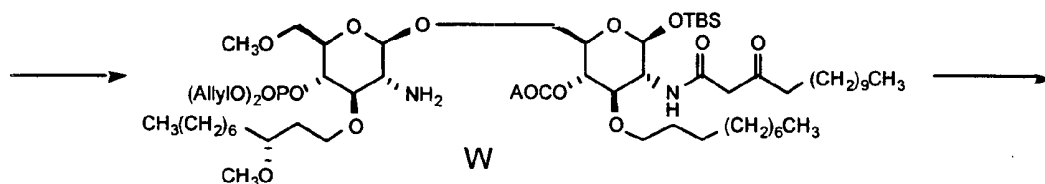
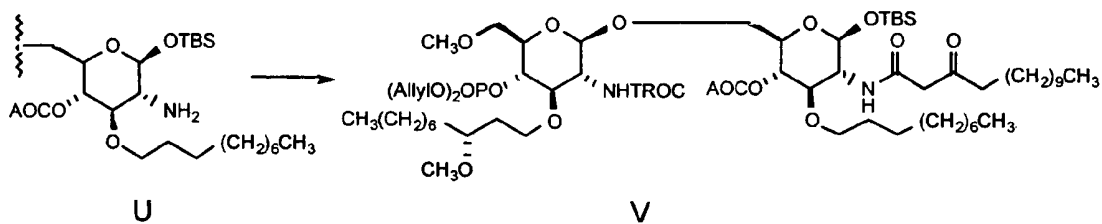
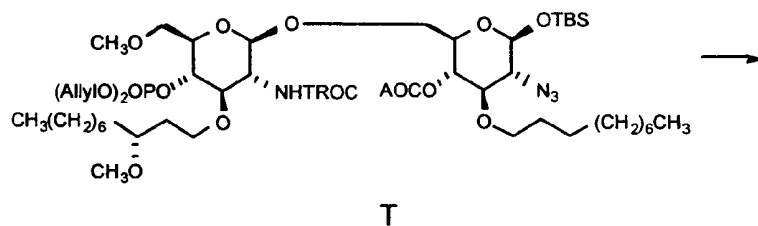
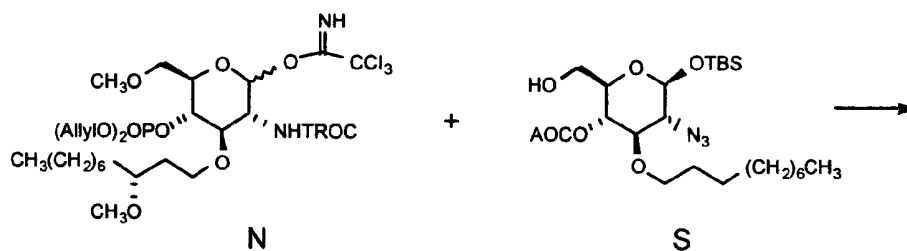


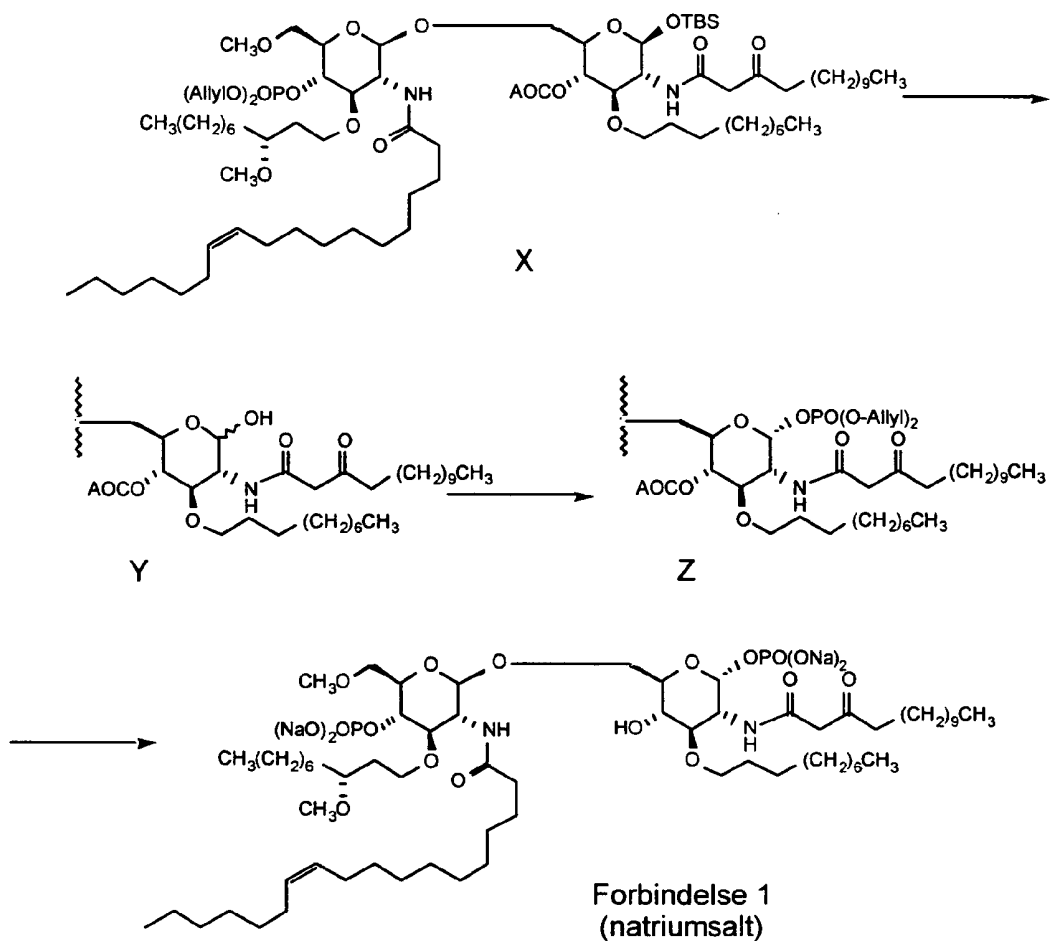
En representativ syntese av den "høyre" del av forbindelse 1 er vist nedenfor.





Disse to "halvdeler" av molekylet blir deretter koblet som angitt nedenfor og videre opparbeidet for å gi forbindelse 1.





PREPARATER

Lipid A-analoger blir administrert i doser som gir en tilstrekkelig hemning av LPS- aktivering av målceller, og generelt er disse dosene fortrinnsvis mellom 0,01 - 50 mg/pasient, mer foretrukket mellom 0,05 - 25 mg/pasient og mest foretrukket, mellom 1 - 12 mg/pasient. Mest foretrukket blir dosene administrert over tre dager som en kontinuerlig infusjon.

Betegnelsen parenteral som anvendt her omfatter subkutan, intravenøs, intramuskulær og intraarteriell injeksjon ved en rekke infusjons-teknikker. Intraarteriell og intravenøs injeksjon som anvendt her omfatter administrering gjennom katetere. Ved visse indikasjoner er administreringsmetoder som tillater rask tilgang til vevet eller organet som behandles foretrukket, så som intravenøse injeksjoner for behandling av endotoksemi.

Farmasøytiske preparater inneholdende den aktive bestanddel kan være i en hvilken som helst form egnet for den tilsiktede administreringsmetode.

Vandige suspensjoner ifølge foreliggende oppfinnelse inneholder de aktive materialer sammen med tilsetningsmidler egnet for fremstilling av vandige suspensjoner. Slike tilsetningsmidler omfatter et suspenderingsmiddel, så som natrium-karboksymetylcellulose, metylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, natrium- alginat, polyvinylpyrrolidon, tragakant-gummi og akasiegummi og dispergerings- eller fukte-midler så som et naturlig forekommende fosfatid (f.eks. lecitin), et kondensasjonsprodukt av et alkylenoksyd med en fettsyre (f.eks. polyoksyetylen-stearat), et kondensasjonsprodukt av etylenoksyd med en langkjedet alifatisk alkohol (f.eks., heptadeaetylenoksyacetanol), et kondensasjonsprodukt av etylenoksyd med en partiell ester avledet fra en fettsyre og et heksitol-anhydrid (f.eks. polyoksyetylen- sorbitan-monooleat). Den vandige suspensjon kan også inneholde ett eller flere konserveringsmidler så som etyl av n-propyl-p-hydroksybenzoat.

De farmasøytiske preparater ifølge foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis i form av et sterilt, injiserbart preparat, så som en steril injiserbar vandig eller oljeaktig suspensjon. Denne suspensjonen kan fremstilles i henhold til kjent teknikk ved anvendelse av de egnede dispergerings- eller fukte-midler og suspenderingsmidler som er angitt ovenfor. Det sterile, injiserbare preparatet kan også være en steril injiserbar løsning eller suspensjon i et ikke-toksis, parenteralt godtagbart fortynningsmiddel eller oppløsningsmiddel, så som en løsning i 1,3-butandiol eller fremstilt som et lyofilisert pulver. Blant godtagbare bærere og oppløsningsmidler som kan anvendes, er vann, Ringer's løsning og isotonisk natriumkloridløsning. I tillegg kan sterile fikserte oljer konvensjonelt anvendes som et oppløsningsmiddel eller suspenderings-medium. For dette formål kan en hvilken som helst fiksert olje anvendes, omfattende syntetiske mono- eller diglycerider. I tillegg kan fettsyrer så som oleinsyre likeledes anvendes ved fremstilling av injiserbare preparater.

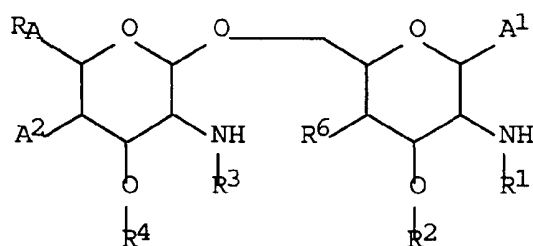
Preparater egnet for parenteral administrering omfatter vandige og ikke-vandige isotoniske sterile injeksjonsløsninger som kan inneholde anti-oksydasjonsmidler, buffere, bakteriostater og oppløselige stoffer som gjør preparatet isotonisk med blodet til mottageren; og vandige og ikke-vandige sterile suspensjoner som kan omfatte suspenderingsmidler og fortykningsmidler. Preparatene kan presenteres i enhets-dose eller multi-dose lukkede beholdere, for eksempel ampuller og medisinglass, og kan lagres i fryse-tørret (lyofilisert) tilstand som bare krever tilsetning av den sterile flytende bærer, for eksempel vann for injeksjoner, umiddelbart før bruk. Ekstemporeerte injeksjonsløsninger og suspensjoner kan fremstilles fra sterile pulvere av typen beskrevet ovenfor.

Det vil imidlertid forstås at den spesifikke dose for en spesiell pasient vil avhenge av en rekke faktorer, omfattende aktiviteten til den spesielle forbindelsen som anvendes, alder, kroppsvekt, den generelle helse og kjønn til individet som behandles; tiden og veien for administrering, utskillingsgraden, andre medikamenter som tidligere er administrert; og alvorlighetsgraden av den spesielle sykdom som behandles.

EKSEMPLER

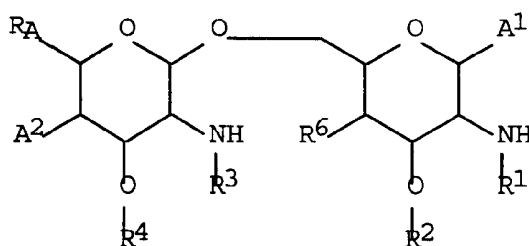
Eksempler på foreliggende oppfinnelse omfatter det følgende. Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse og fremstilling av dem forstås bedre ved eksemplene som illustrerer noen av fremgangsmåtene ved hvilke disse forbindelsene fremstilles eller anvendes. Disse eksempler skal ikke oppfattes som spesifikt begrensende for oppfinnelsen og variasjoner av foreliggende oppfinnelse, kjent nå eller utviklet senere, omfattes av omfanget av foreliggende oppfinnelse som angitt nedenfor.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er angitt ved forbindelse-nummer i henhold til tabellene nedenfor.



Formel 1

Forbindelse #	A ¹ /A ²	R ¹	R ²
1	OPO(OH) ₂	CO CH ₂ CO(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
2	OPO(OH) ₂	CO CH ₂ CO(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
3	OPO(OH) ₂	CO CH ₂ CO(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
4	OPO(OH) ₂	CO CH ₂ CHOH(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
5	OPO(OH) ₂	CO CH ₂ CO(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
6	OPO(OH) ₂	CO(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
7	OPO(OH) ₂	CO(CH ₂) ₁₂ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
8	OPO(OH) ₂	CO CH ₂ CH(O CH ₃)(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
9	OPO(OH) ₂	CO CH ₂ CH(O CH ₃)(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
10	OPO(OH) ₂	CO CH ₂ CH(OH)(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃
11	OPO(OH) ₂	COCH ₂ CO(CH ₂) ₁₀ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃



Formel 1

Forbindelse #	R ³	R ⁴	R _A	R ⁵
1	CO(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH(O CH ₃)(CH ₂) ₆ CH ₃	CH ₂ OCH ₃	OH
2	CO(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH(OH)(CH ₂) ₆ CH ₃	CH ₂ OCH ₃	OH
3	CO(CH ₂) ₁₆ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH(OH)(CH ₂) ₆ CH ₃	CH ₂ OCH ₃	OH
4	CO(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH(OH)(CH ₂) ₆ CH ₃	CH ₂ OCH ₃	OH
5	CO(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₉ CH ₃	CH ₂ OCH ₃	OH
6	CO(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH(OH)(CH ₂) ₆ CH ₃	CH ₂ OCH ₃	OH
7	CO(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH(OH)(CH ₂) ₆ CH ₃	CH ₂ OCH ₃	OH
8	CO(CH ₂) ₉ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH(O CH ₃)(CH ₂) ₆ CH ₃	CH ₂ OCH ₃	OH

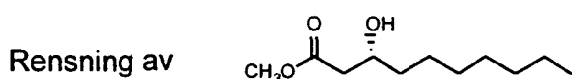
9	$\text{CO}(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	CH_2OCH_3	OH
10	$\text{CO}(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	CH_2OCH_3	OH
11	$\text{CO}(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	CH_3	OH

KJEMISKE EKSEMPLER

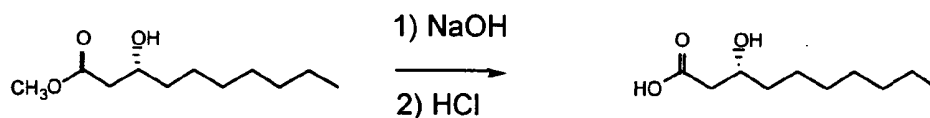
Hvis ikke annet er angitt ble alle omsetninger utført under en inert atmosfære. Mellomprodukter og sluttprodukter ga spektral-analyse (for eksempel kjernemagnetisk resonans-spektroskopi og/eller masse-spektroskopi) konsistent med de indikerte strukturer. Reaksjonene ble overvåket ved silikagel-tynnsskikt-kromatografi. Preparativ kromatografi ble, hvis ikke annet er angitt, utført på silikagel.

Fremstilling av Forbindelse 1 ved Metode 1

Alle sensitive reaksjoner ble kjørt under nitrogen og i tørt utstyr, og vannfritt natriumsulfat ble anvendt som tørremiddel hvis ikke annet er angitt. Alle produkter ga tilfredsstillende kjernemagnetiske resonans-spektra.

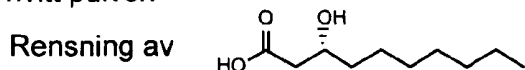


Materialet (5 kg) ble kromatografert på silika og eluert med en gradient av heksan og EtOAc (100 % til 33% heksan). De rene fraksjoner ble samlet og destillert (97 - 100 °C ved 0,15 mm Hg). Utbytte av rensset materiale 4,513 g.

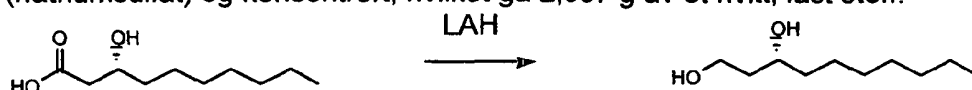


Til en iskald løsning av esteren (4500 g, 22,2 mol) i 12,6 l THF ble satt natriumhydroksyd (27 mol) i 10,8 l vann. Blandingen ble omrørt kort og 2,5 l kons. saltsyre ble tilsatt. Lagene ble separert, og det vandige laget ble ekstrahert påny med EtOAc. De samlede organiske lag ble vasket med saltvann, tørret over

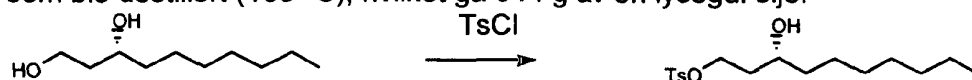
natriumsulfat og konsentrert. Produktet krystalliserte langsomt, hvilket ga 2983 g hvitt pulver.



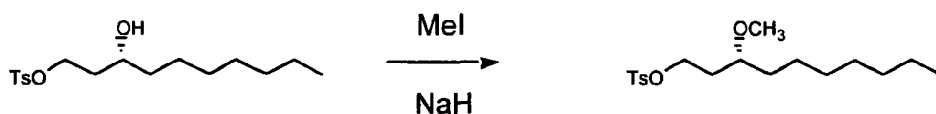
Til en oppløsning av syren (15,8 mol) i 33 l acetonitril ble satt dicykloheksylamin (16,7 mol). Løsningen ble oppvarmet til 60 °C og fikk avkjøles natten over. Krystallene ble oppsamlet og vasket to ganger med oppløsningsmiddel og omkrystallisert fra acetonitril. Til en suspensjon av på forhånd metanol-vasket Amberlite IR-120 Plus (12 kg) i EtOAc (24 l) og vann (24 l) ble satt saltet ovenfor. Blandingen ble omrørt i flere timer, og det organiske laget ble fraskilt. Det vandige laget ble ekstrahert påny med EtOAc (12 l), og de samlede organiske lag ble tørret (natriumsulfat) og konsentrert, hvilket ga 2,997 g av et hvitt, fast stoff.



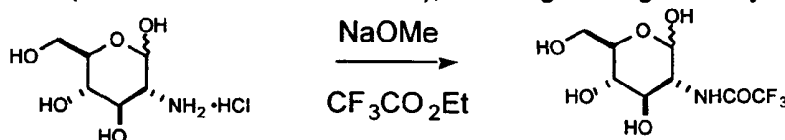
Til en varm (~ 67 °C) 1 M løsning av litiumaluminumhydrid (8 l) i THF ble langsomt satt en oppløsning av syren (1 kg) i 4 l THF. Løsningen fikk avkjøles natten over. Løsningen ble langsomt satt til 1 M vandig HCl (5 l). Blandingen ble ekstrahert med toluen (12 l). Det organiske laget ble vasket med en natriumbikarbonat-løsning, tørret (natriumsulfat), og oppløsningsmidlet ble fjernet under vakuum, hvilket ga en sirup som ble destillert (103 °C), hvilket ga 914 g av en lysegul olje.



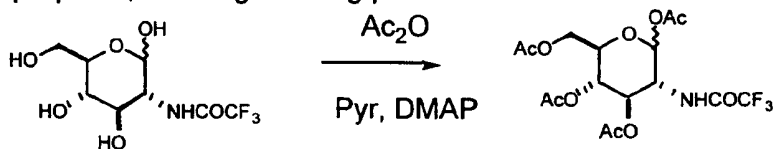
Til en 0°C løsning av diolen (913,8 g) i pyridin (3 l) ble satt 3 l trietylamin, fulgt av en oppløsning av tosylklorid (1 kg) i pyridin (1,5 l) og trietylamin (1,5 l). Blandingen fikk oppvarmes natten over og ble hellet i en kald løsning av 6 M vandig HCl (16 l) og metylenklorid (8 l). Det organiske laget ble separert og det vandige laget ble ekstrahert med ytterligere metylenklorid. De samlede organiske lag ble tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert to ganger på silika og eluert med en gradient av heksan:EtOAc (9:1 til 1:6), hvilket ga 642 g tosyolat.



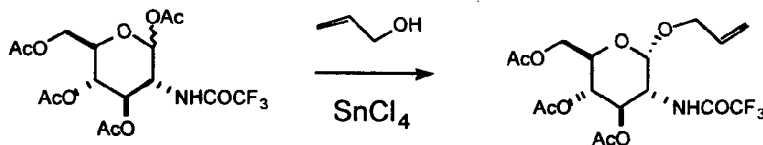
Til en suspensjon av 60 % natriumhydrid olje-dispersjon (8,68 mol) i 1,15 l DMF og 1,1 l THF ble langsomt satt tosylationen (1,139 kg) og metyljodid (7,7 kg) i 1,15 l DMF og 1,1 l THF. Blandingen ble omrørt natten over og deretter fortynnet med DMF (3 l) og langsomt satt til en mettet vandig løsning av ammoniumklorid. Blandingen ble ekstrahert med heksan (8 l) som ble tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet fjernet, hvilket ga en oransje/brun olje. Oljen ble kromatografert på silika og eluert med en gradient (heksan:EtOAc 100:0 til 6:1), hvilket ga 940 g av en lysegul olje.



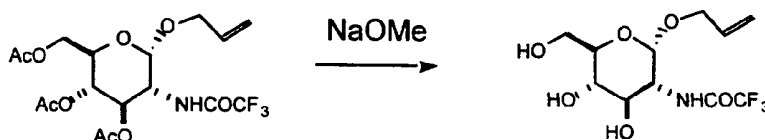
Til en suspensjon av aminosukkeret (1019 g) i 5 l MeOH ble satt en 25 % løsning av NaOMe i MeOH (1080 ml, 5 mol), fulgt av 610 ml etyl-trifluoracetat. Blandingen ble omrørt natten over og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk og residuet utgridd med isopropanol. Blandingen ble filtrert og residuet ble vasket med ytterligere isopropanol, hvilket ga 1369 g produkt.



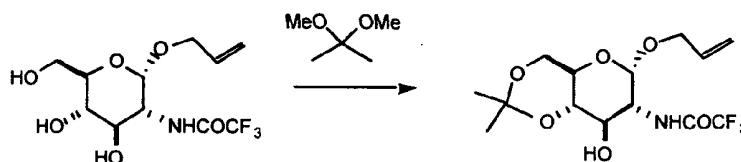
Til en suspensjon av hydroksy-sukkeret (1300 g) i pyridin (4 l) ble satt dimetylaminopyridin (79 g), fulgt av eddiksyreanhydrid (2713 ml). Blandingen ble omrørt natten over. Oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Toluen (5 x 500 ml) ble tilsatt, og også fjernet under redusert trykk, hvilket ga et fast stoff som ble kromatografert på silika. Eluering med heksan:EtOAc (1:1) ga 1479 g av et hvitt, fast stoff.



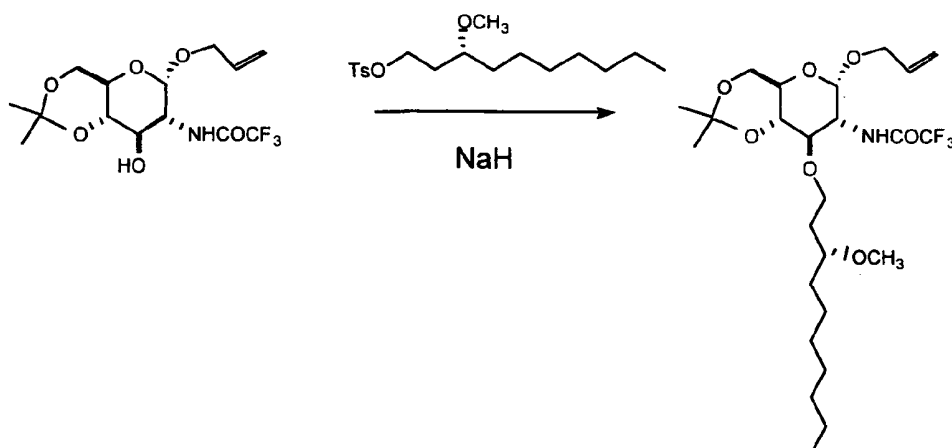
Til en oppløsning av det acetylte sukker (1479 g) i 8 l metylenklorid ble satt allyl-alkohol (764 ml), fulgt av langsom tilsetning av tinntriklorid (976 ml). Blandingen ble omrørt natten over og langsomt hellet på iskaldt vann (7,5 l). Det organiske laget ble fraskilt, og det vandige laget ble vasket med ytterligere metylenklorid. De samlede organiske lag ble vasket med vandig natriumbikarbonat, tørret og konsentrert under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika (7,5 kg) og eluert med en heksan:EtOAc gradient (4:1 til 1:1), hvilket ga 1327 g av en blekgul olje.



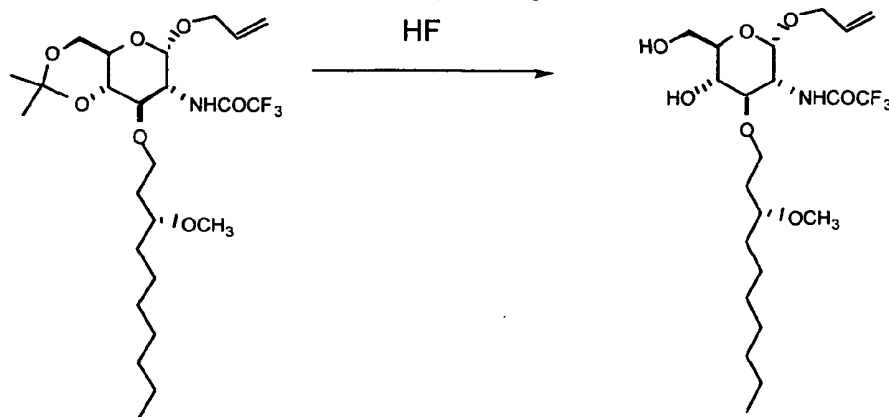
Til en iskald løsning av beskyttet sukker (1322 g) i 8,5 l metanol ble satt en 25 % løsning av NaOMe i metanol (437 ml) over én time. Til dette ble satt på forhånd vasket 1740 g Amberlite IR-120 Plus harpiks. Blandingen ble filtrert, konsentrert og residuet ble kromatografert på silika. Eluering med metanol ga 907 g produkt.



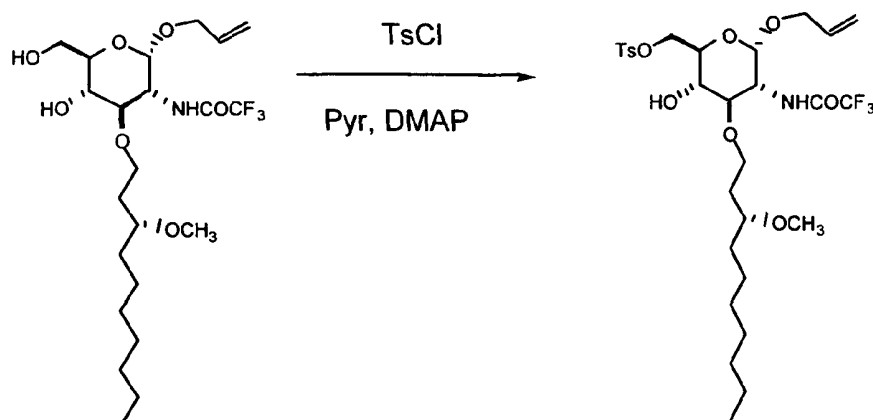
Triolen ble suspendert i aceton (7,5 l) og kamfersulfonsyre (85 g) ble tilsatt, og deretter ble 2,2-dimetoksypropan (965 ml) langsomt tilsatt. Blandingen ble omrørt natten over fulgt av tilsetning av trietylamin (51 ml). Oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk, hvilket ga et brunt, fast stoff som ble kromatografert på silika. Eluering med en heksan:EtOAc gradient (3:1 til 2:1) ga 842 g av en semi-hvit gummi.



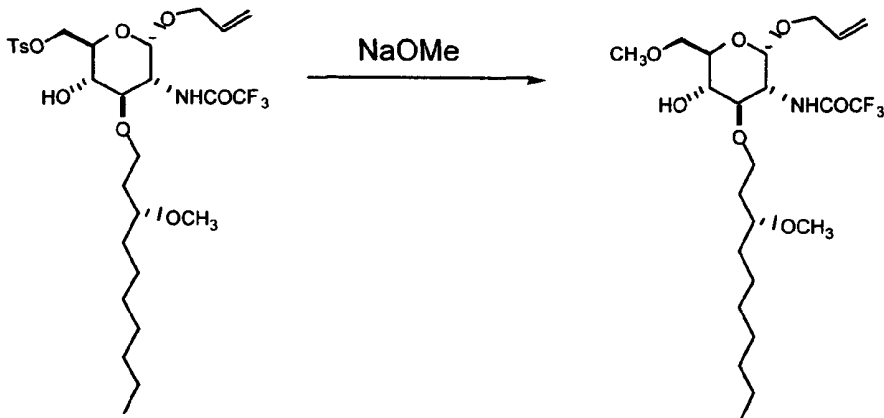
Til en suspensjon av 60 % natriumhydrid-oljedispersjon (82 g) i 2,2 l THF og 580 ml DMF ble satt tosylatet (351 g) og en oppløsning av den frie alkohol (400 g) i en blanding av 1360 ml THF og 360 ml DMF. Blandingen ble omrørt natten over. Blandingen ble avkjølt i is og metanol ble tilsatt, fulgt av vann (2 l). Blandingen ble ekstrahert tre ganger med EtOAc. De samlede organiske lag ble tørret og konsentrert. Den resulterende blanding ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med heksan:EtOAc (19:1 til 1:1) ga 711 g.



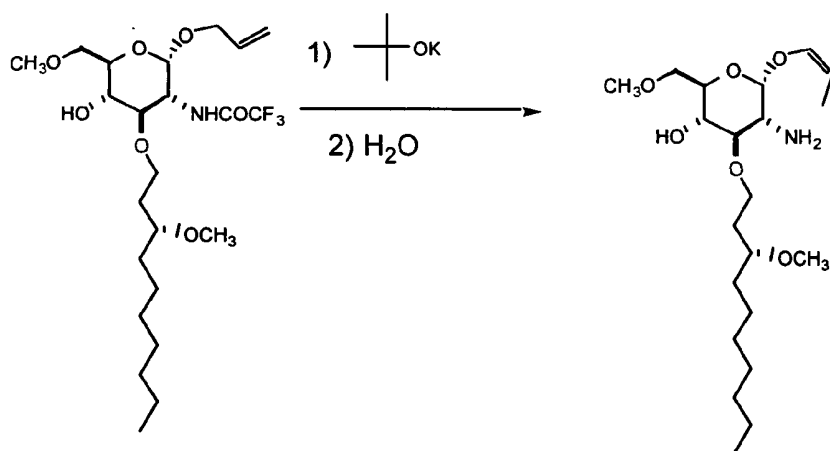
Til en blanding av 48% vandig fluorhydrogensyre i 1500 ml acetonitril i en Teflon-kolbe ble satt en oppløsning av utgangsmaterialet (613 g) i 750 ml acetonitril og 750 ml metylenklorid. Blandingen ble omrørt i én time og hellet i 8L vann. Blandingen ble ekstrahert med metylenklorid (4 x 2 l). De samlede organiske lag ble vasket med vandig mettet natriumbikarbonat-løsning, tørret og konsentrert under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med metylenklorid:metanol (39:1 til 9:1) ga 519 g produkt.



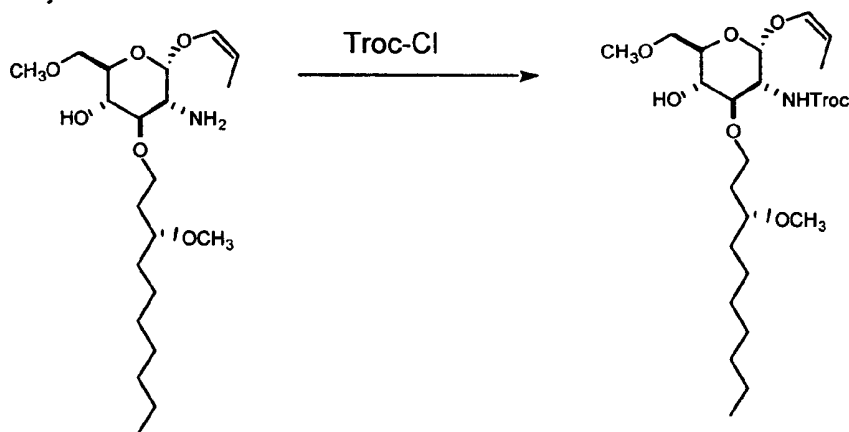
Til en oppløsning av diolen (577 g) i pyridin (5 l) ble satt tosyklorid (339 g) og N,N-dimetylaminopyridin (14,5 g). Blandingen ble omrørt ved RT i to dager og ble deretter hellet i 14 l kald vandig 1 M saltsyre. Blandingen ble ekstrahert (2 x 5 l) med metylenklorid. De samlede organiske lag ble tørret og konsentrert. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering (heksan:EtOAc, 6:1 til 1:1) ga 632 g av en gul sirup som langsomt krystalliserte ved henstand.



Til en 85°C løsning av 25 % natriummetoksyd i metanol (1825 ml) i DMF (1365 ml) ble satt tosylatet (714 g) i DMF (1365 ml) over 1,25 time. Blandingen ble omrørt 30 minutter og avkjølt til 4°C og ble hellet på en iskald blanding av vandig 1 M saltsyre og 4,6 kg is. Blandingen ble omrørt i 30 minutter og filtrert. Filtratet ble vasket med 2 l vann og de samlede vandige lag ble ekstrahert med 2 x 4 l EtOAc. De samlede organiske lag ble tørret og konsentrert. Residuet ble renset ved kromatografi på silika. Gradient-eluering (heksan:etylacetat 3:1 til 1:1) ga 549 g av et blekgult til hvitt fast stoff.

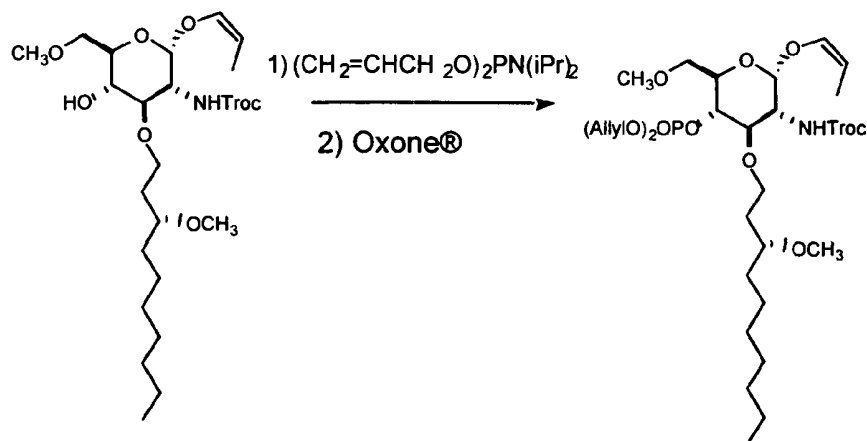


Denne omsetningen ble utført under argon. Til en oppløsning av kalium-t-butoksyd (139 g) i 440 ml DMSO ble satt en oppløsning av sukkeret (247 g) i 440 ml vannfri DMSO. Blandingen ble oppvarmet til 85°C i 1,5 time og deretter ble 250 ml vann tilsatt, og blandingen ble oppvarmet natten over ved 85°C og avkjølt i et isbad. Blandingen ble hellet i 3,5 l saltvann og blandingen ble ekstrahert med 3 x 750 ml metylenklorid. De samlede organiske lag ble tørret og konsentrert, hvilket ga 560 g av en brun olje.

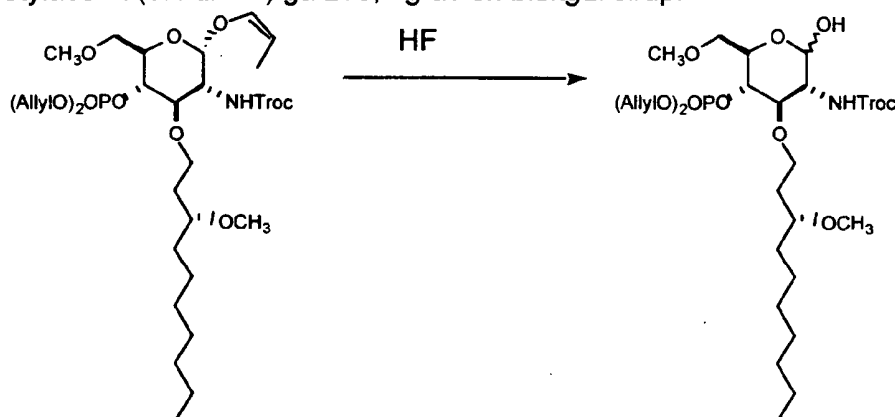


Til en blanding av det frie amin (199 g), 780 ml THF og 390 ml av mettet vandig natrium-bikarbonat ble satt Troc-Cl (157 g). Etter 1/2 time ble blandingen langsomt hellet i en oppløsning av 500 ml av 40% vandig metylamin og 3 l vann. Blandingen ble ekstrahert med 2 x 1750 ml metylenklorid. De samlede organiske lag ble tørret og konsentrert. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med

heksan: EtOAc (5:1 til 1:1) ga et kvantitativt utbytte av 287 g av et gult til grå-hvitt fast stoff.

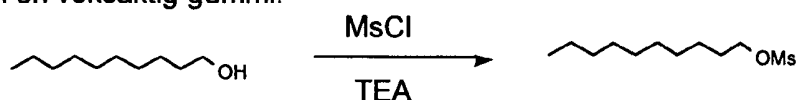


Til en oppløsning av hydroksy-sukkeret i 2 l metylenklorid ble satt tetrazol (155,6 g), fulgt av diallyldiisopropylfosforamiditt (182 ml). Etter 1/2 time ble blandingen hellet i en iskald blanding av Oxone® (kalium-peroksymonosulfat) (455,6 g), vann (1,25 l) og THF (2,5 l). Etter 15 minutter ble denne blandingen hellet i kald 10% vandig natriumtiosulfat. Etter 15 minutter ble blandingen ekstrahert med 2 l metylenklorid. Det organiske laget ble separert, det vandige laget ble igjen ekstrahert med metylenklorid og de samlede organiske lag ble tørret og oppløsningsmidlet fjernet under vakuum. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med heksan/etylacetat (6:1 til 2:1) ga 205,7 g av en blekgul sirup.

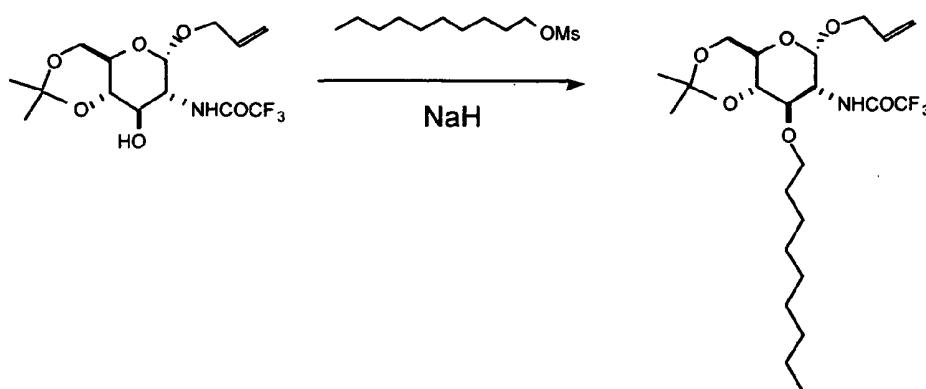


Til en oppløsning av 48% vandig fluorhydrogensyre, 400 ml, i acetonitril, 1,2 l i en Teflon-beholder ble satt en oppløsning av sukkeret, 138,8 g, i metylenklorid, 500 ml. Blandingen ble omrørt natten over, fortynnet med vann, 3 l, og ekstrahert med

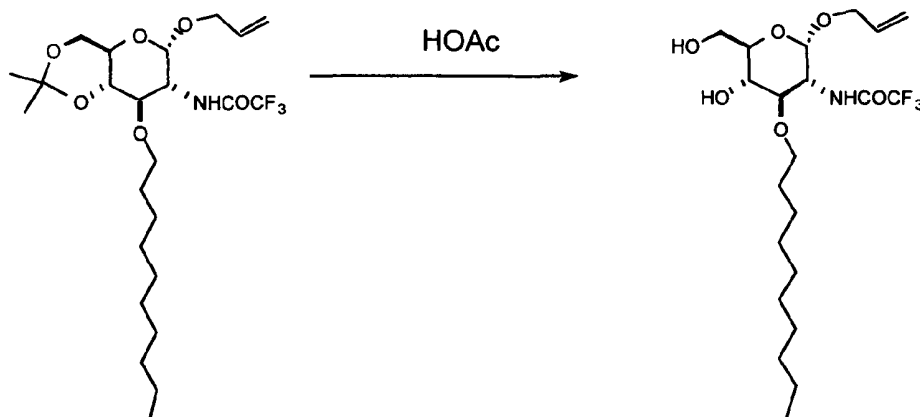
metylenklorid, 2,4 l. Det organiske laget ble vasket med en vandig natriumbikarbonat- løsnings, tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering (heksan:etylacetat 2:1 til 1:1), fulgt av eluering med en gradient av metylenklorid: metanol (19:1 til 9:1) ga 129,2 g som en voksaktig gummi.



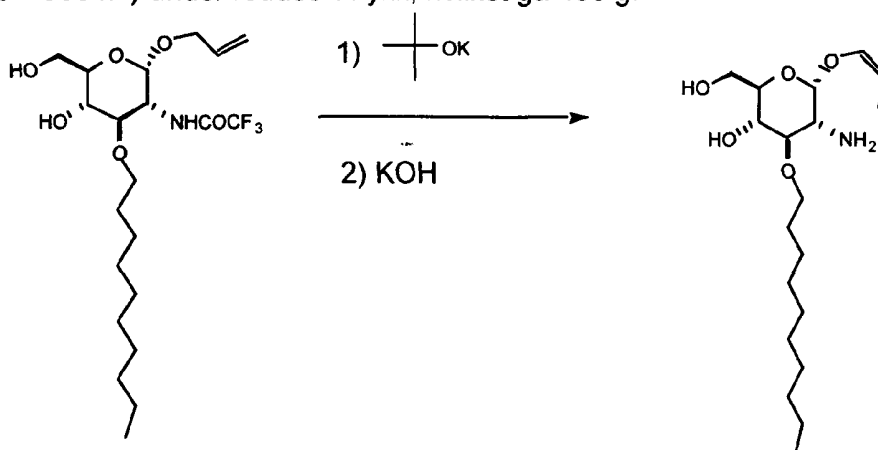
Til en iskald løsning av 450 g 1-dekanol i 685 ml trietylamin og 1125 ml metylenklorid ble satt 330 ml mesylklorid. Kjølebadet ble fjernet etter 1 1/2 time og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Til residuet ble satt 2,5 l 1 M vandig saltsyre. Denne blanding ble ekstrahert med 3 x 2 l metylenklorid. De organiske lag ble samlet, tørret og oppløsningsmidlet fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Eluering med 1:1 heksan : etylacetat ga 651 g produkt.



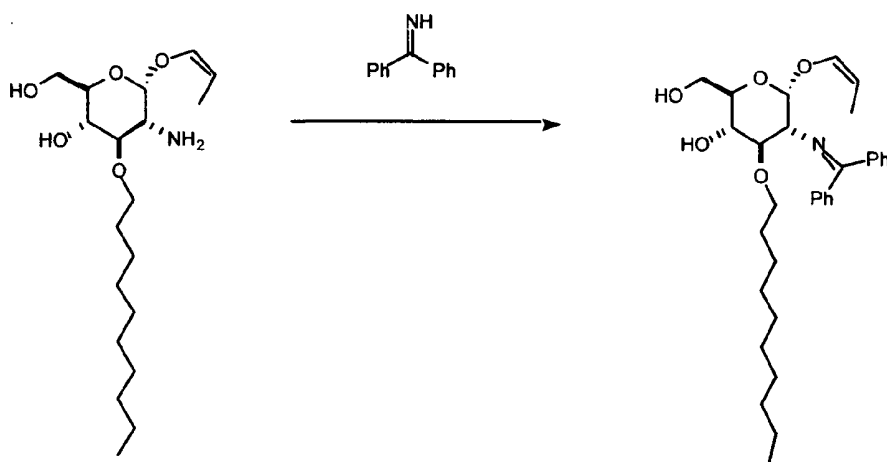
Til en suspensjon av 60 % natriumhydrid-mineralolje-dispersjon i 1 l THF og 470 ml DMF ble satt en oppløsning av alkoholen i 280 ml DMF og 1 l THF over 1 time. Mesylatet, 470 g, ble deretter tilsatt over 15 minutter. Etter 2 dager ble 400 ml metanol tilsatt, fulgt av 4 kg is og 4 l vann. Denne blandingen ble ekstrahert med 2 x 4 l etylacetat. De samlede organiske lag ble tørret, og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med heksan:EtOAc (39:1 til 2:1) ga 618 g.



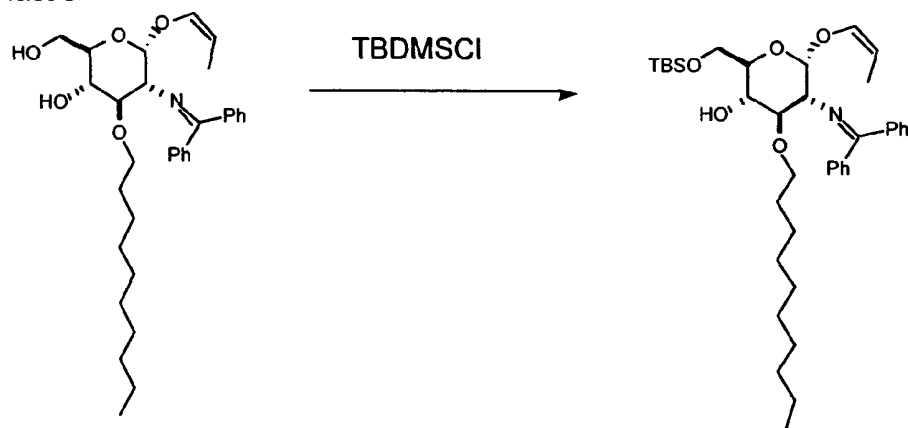
En oppløsning av sukkeret, 520 g, i 5,2 l iseddik og 1,3 l vann ble omrørt natten over. Den ble hellet i 7,5 l vann og filtrert. Filtratet ble tørret ved azeotrop-destillasjon med toluen (3 x 500 ml) under redusert trykk, hvilket ga 458 g.



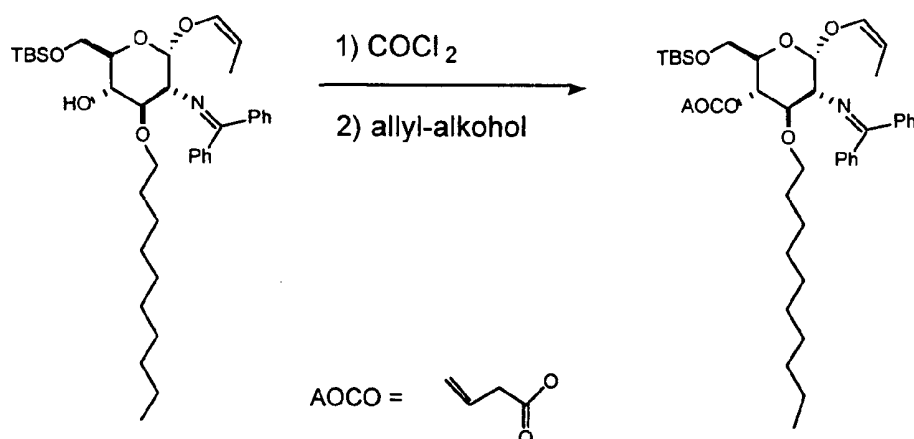
Denne reaksjonen ble kjørt under argon. Til en suspensjon av kalium-t-butoksyd, 295 g, i DMSO, 1 l, ble satt en oppløsning av 340 g av sukkeret i 1,5 l DMSO. Blandingen ble oppvarmet til 85 °C i 1 1/4 time og 1,4 l 3 M vandig kaliumhydroksyd ble tilsatt, og blandingen ble omrørt natten over ved 85 °C. Blandingen ble avkjølt til romtemperatur og hellet i en blanding av 3,5 l saltvann og 3,5 l vann. Blandingen ble ekstrahert tre ganger med metylenklorid, blandingen ble tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med metylenklorid : metanol (19:1 til 4:1) ga 740 g produkt.



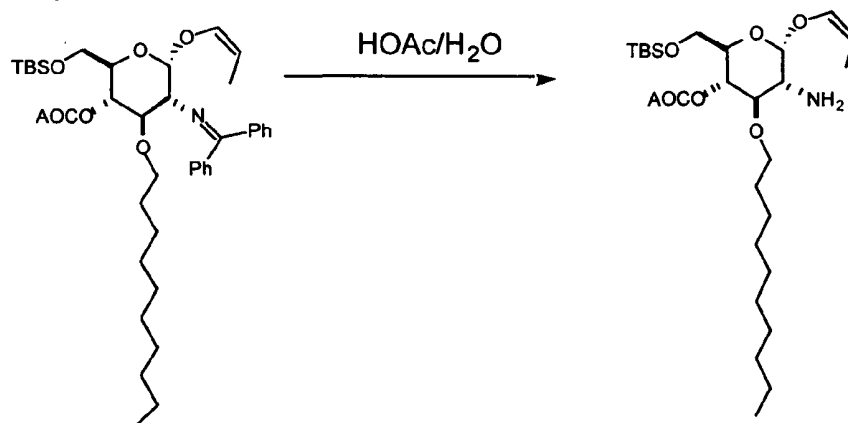
En oppløsning av aminosukkeret, 740 g, i benzofenon-imin, 338 g, ble oppvarmet ved 45 °C natten over. Blandingen ble kromatografert på silika og eluert med en gradient av heksan/etylacetat (39:1 til 1/1), hvilket ga 371 g av et blekgult, fast stoff.



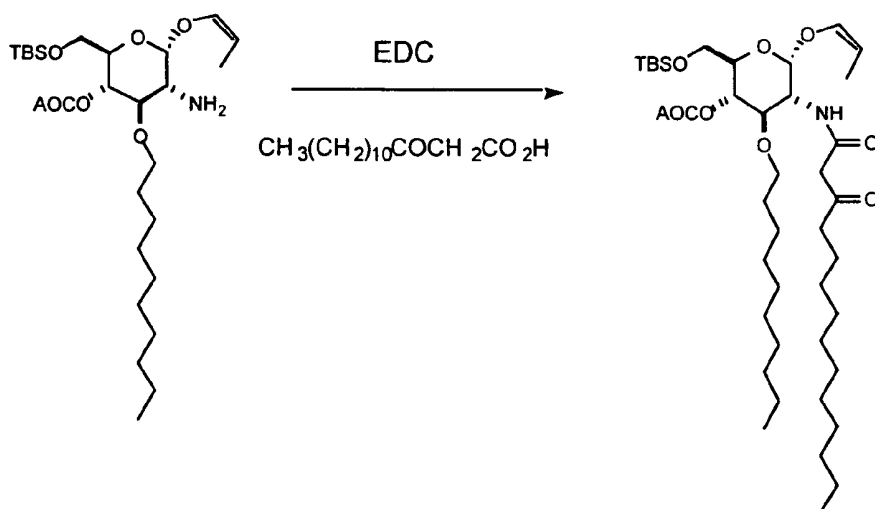
Til en oppløsning av diol-sukkeret, 366 g, i 1,3 l DMF ble satt imidazol, 118 g, fulgt av t-butyldimetylsilylchlorid, 117 g. Etter 5 minutter ble blandingen hellet i 1,4 l vandig, mettet, natriumbikarbonat. Blandingen ble ekstrahert med etylacetat tre ganger. De organiske lag ble samlet, oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk og residuet kromatografert på silika. Gradient-eluering med heksan/etylacetat (49:1 til 4:1) ga 446 g av en sirup.



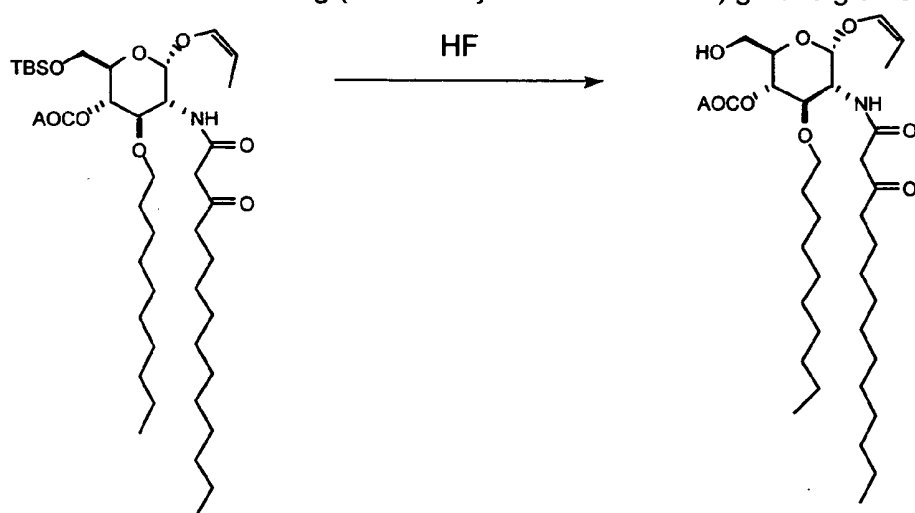
Til en oppløsning av alkoholen, 437 g, i toluen, 3 l, ble satt pyridin, 225 ml og løsningen ble avkjølt i et isbad. Fosgen, 531 ml av en 1,9 M løsning i toluen ble tilsatt, og løsningen ble omrørt i 10 minutter. Allylalkohol, 469 ml, ble tilsatt. Etter 40 minutter ble mettet vandig natriumbikarbonat-løsning, 2,3 l tilsatt, og blandingen ble ekstrahert med etylacetat. Det organiske laget ble separert, tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med heksan/etylacetat (49:1 til 4:1) ga 441 g av en gul sirup.



Til en oppløsning av sukkeret, 431 g, i THF, 200 ml, ble tilsatt iseddik, 330 ml og vann, 110 ml. Blandingen ble omrørt i tre timer, avkjølt i is og 6,6 l 1 M vandig natriumhydroksyd ble tilsatt. Blandingen ble ekstrahert med metylenklorid, 2 x 2 l. De samlede organiske lag ble tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med metylenklorid:metanol (19:1 til 4:1) ga aminet, 309 g som en sirup.

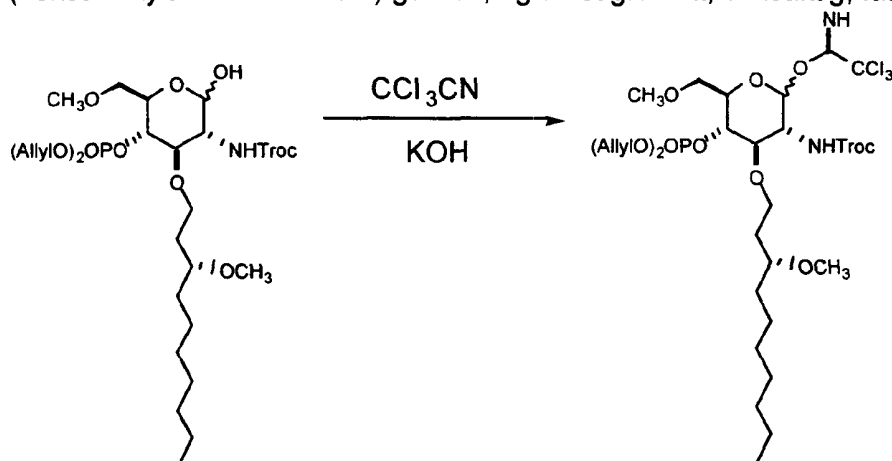


Til en iskald løsning av amino-sukkeret, 309 g, i 3 l metylenklorid ble satt 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimid-hydroklorid (EDC), 435 g, fulgt etter 10 minutter av karboksylsyren, 275 g. Etter 10 minutter ble blandingen ekstrahert med mettet vandig natriumbikarbonat. Det organiske laget ble separert, det vandige laget ble igjen ekstrahert med metylenklorid, de samlede organiske lag ble tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient- eluering (heksan:etylacetat 19:1 til 3:1) ga 338 g av en blekgul sirup.

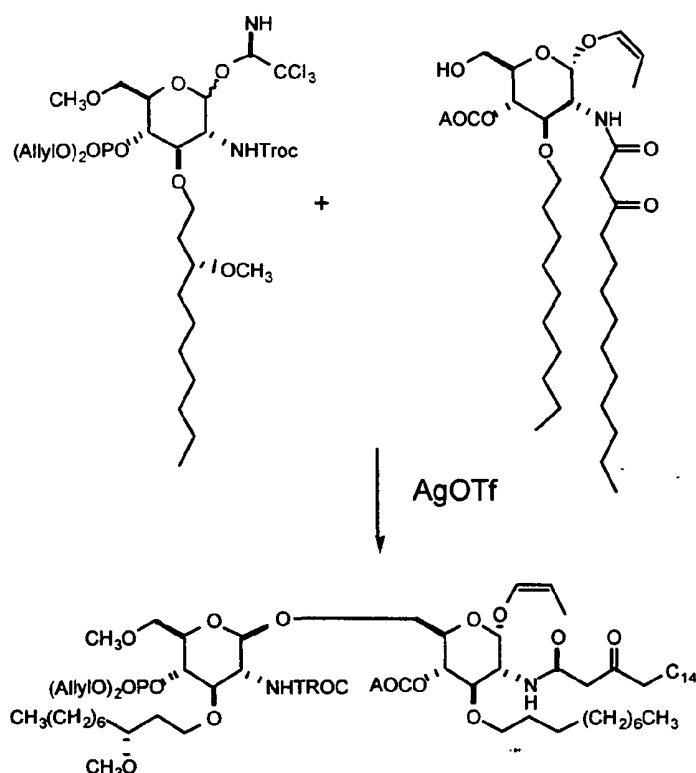


Til en oppløsning av 48% vandig fluorhydrogensyre, 11 ml, i acetonitril 293 ml, ble satt 4,6 g silikagel, fulgt av en oppløsning av sukkeret, 146,7 g, i metylenklorid, 147 ml. Etter en halv time ble blandingen fortynnet med vann, 975 ml og ekstrahert med metylenklorid. Det organiske laget ble separert og det vandige

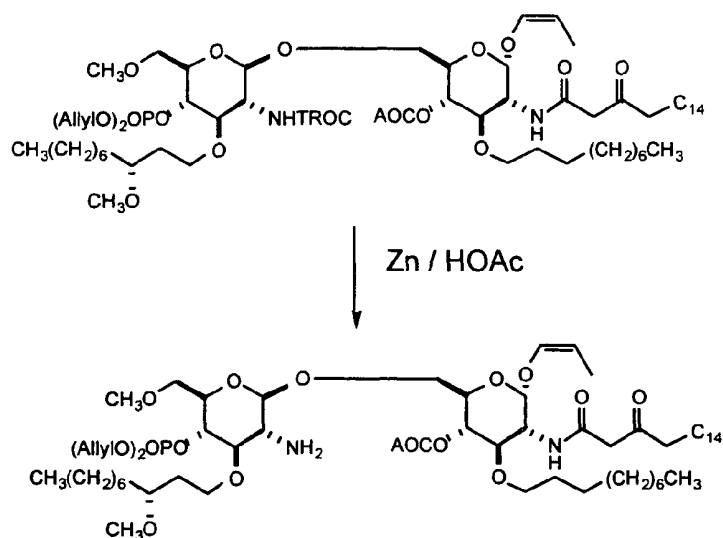
laget igjen ekstrahert med metylenklorid. De samlede organiske lag ble vasket med vandig natrium- bikarbonat-løsning, tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering (heksan:etylacetat 5:1 til 0:1) ga 110,4 g av et gråhvitt, voksaktig, fast stoff.



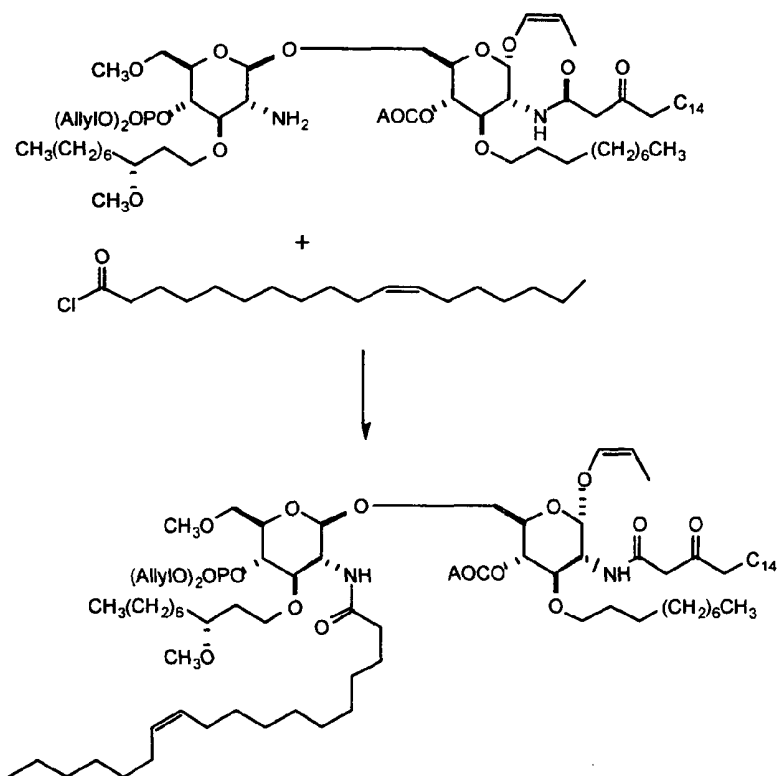
Til en oppløsning av sukkeret, 129 g, i 500 g trikloracetonitril ble satt kaliumkarbonat, 240 g. Blandingen ble omrørt i en halv time og filtrert gjennom diatoméjord. Filterkaken ble vasket med metylenklorid og filtratene samlet, og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering (heksan:etylacetat 1:1 til 0:1) ga 145,7 g av en gul gummi.



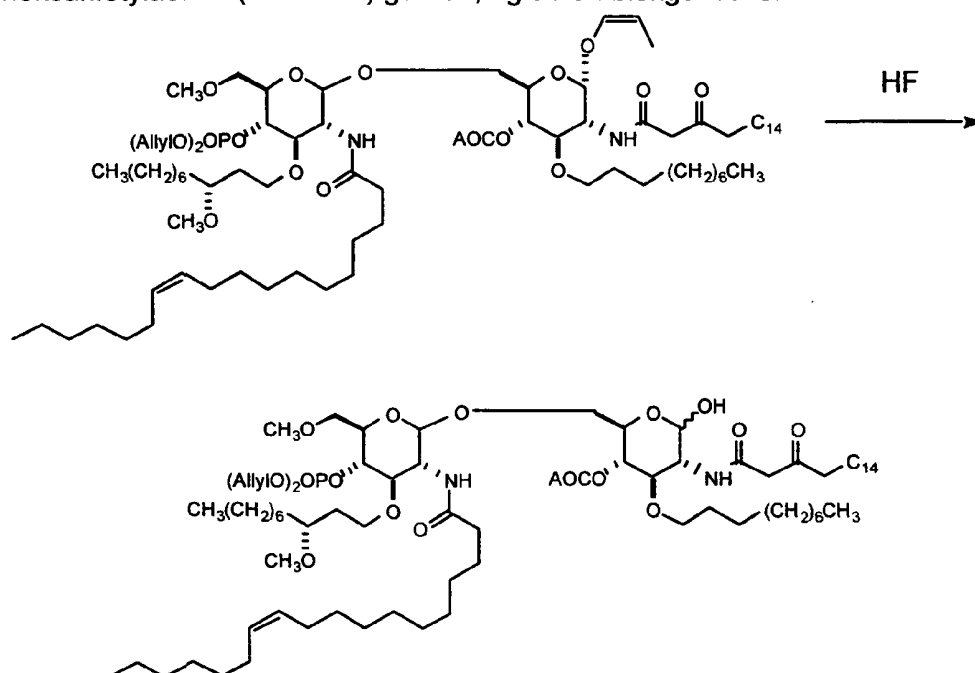
Det venstre sukkeret, 145,7 g og det høyre sukkeret, 109,2 g, ble azeotropisk tørret ved inndampning med toluen (3 x 200 ml). En oppløsning av de to sukkere i 750 ml metylenklorid ble satt til en iskald løsning av sølv-triflat, 62,7 g i 130 ml metylenklorid. Blandingen ble oppvarmet til romtemperatur og omrørt natten over. Blandingen ble hellet i en blanding av mettet, vandig natriumbikarbonat- og natrium-tiosulfat-løsning. Det organiske laget ble fraskilt, og det vandige laget ble vasket med metylenklorid. De samlede organiske lag ble tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert to ganger på silika. Gradient-eluering med heksan:etylacetat (5:1 til 1:1) ga 189,56 g av et klebrig skum.



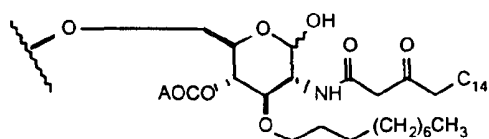
Til en oppløsning av disakkaridet, 188,7 g, i THF, 590 ml, ble satt sinkstøv, 457,6 g, fulgt av iseddik, 395 ml. Etter en halv time ble blandingen filtrert gjennom diatoméjord og filterkaken vasket med THF. De organiske lag ble samlet og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble tørret azeotropisk med destillert benzen fra residuet (4 x 250 ml), hvilket ga 223,1 g av en rosa gummi.



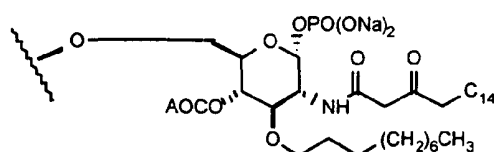
Til en oppløsning av sukkeret, 223,1 g, i 1,3 l THF ble satt en oppløsning av natriumbikarbonat, 37,5 g, i 250 ml vann. Cis-11-oktadecenoylchlorid, 67,4 g, ble tilsatt. Etter 10 minutter ble blandingen ekstrahert to ganger med etylacetat. De samlede organiske lag ble tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering med heksan:etylacetat (2:1 til 0:1) ga 160,2 g av en blekgul voks.



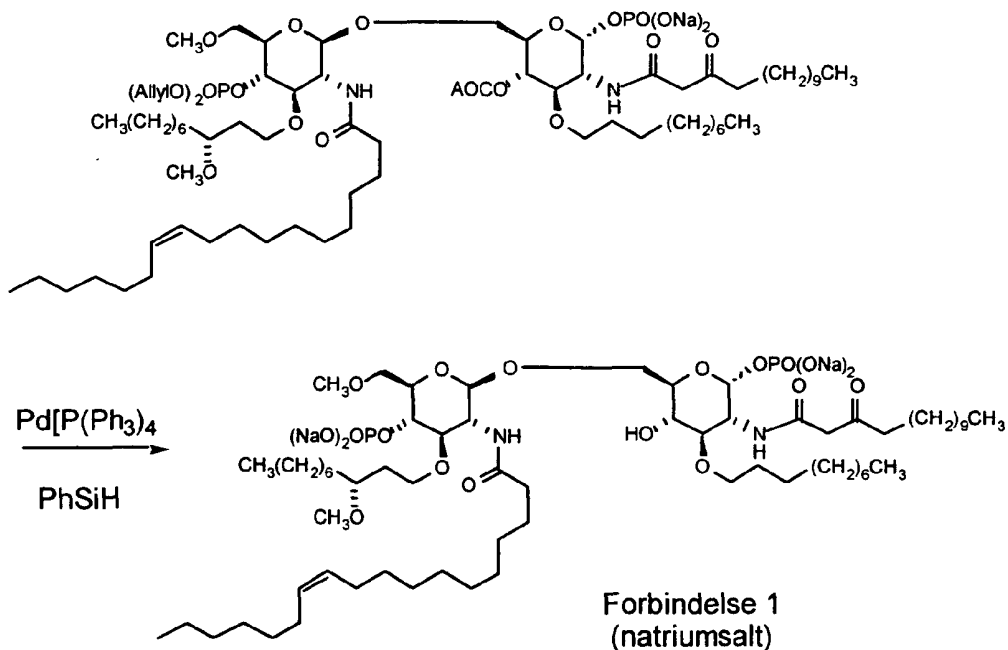
En oppløsning av sukkeret, 161,3 g, i metylenklorid, 215 ml, i en Teflon-flaske ble satt til en oppløsning av 48% fluorhydrogensyre, 150 ml, i acetonitril, 474 ml. Etter fire timer ble blandingen hellet i 500 ml vann. Blandingen ble ekstrahert to ganger med metylenklorid. De samlede organiske lag ble vasket med vandig mettet natrium- bikarbonat, tørret og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på silika. Gradient-eluering (metylenklorid: etylacetat:metanol 500:500:20 til 500:500:160) ga en gul voksaktig gummi.



Fosforylering



Sukkeret, 719 mg, ble oppløst i metylenklorid, og natriumsulfat (1,4 g) ble tilsatt. Diallyldiisopropylfosforamidit (189 ml) og tetrazol (162 mg) ble tilsatt, blandingen ble omrørt i 10 minutter og deretter avkjølt til -78°C . En oppløsning av m-klorperoksybenzoesyre (192 mg) i metylenklorid (4 ml) ble tilsatt dråpevis. Blandingen ble vasket med vandig natriumtiosulfat og med vandig natriumbikarbonat, tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert, hvilket ga 660 mg.



Til en oppløsning av tetrakis(trifenylfosfin)palladium (0) (166 mg) i 2 ml tetrahydrofuran: eddiksyre- (10:1) blanding ble satt en oppløsning av mellomprodukt Z (660 mg) i 3 ml av den samme oppløsningsmiddel-blanding. Etter 30 minutter ble ytterligere tetrakis(trifenylfosfin)palladium (0) tilsatt. Etter ytterligere 1 1/2 timer ble toluen tilsatt og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Blandingen ble renset ved kromatografi på diethylaminoethylcellulose. Den rensede blanding ble oppløst i 0,1 N vandig natriumhydroksyd, filtrert gjennom et 0,45 μ sterilt filter og renset ved HPLC på en YMC-Pack ODS-AP kolonne, hvilket ga 130 mg av forbindelse 1.

Analytiske data for forbindelse 1 fremstilt ved metodene beskrevet ovenfor er gitt nedenfor:

Forbindelse 1: ^1H NMR (CD_3OD) δ : 5,3 (1H, m), 4,6 (1, m), 4,0 (m, m), 3,9 (1H, d), 3,7 (1H, t), 3,6 (1H, t), 3,4 (3H, s), 3,3 (3H, t), 2,6 (2H, t), 2,3 (2H, m), 2,0 (2H, m), 1,7 - 1,2 (m, m), 0,9 (6H, t).

^{31}P NMR (CD_3OD) δ : 4,71, 3,98.

Fremstilling av Forbindelse 1 ifølge Skjema 2

Fremstilling av Forbindelse 1

Eksempel 1: Mellomprodukt B

Til en suspensjon av mellomprodukt A (15 g), fremstilt ved metoden ifølge Christ, et al., europeisk patent-søknad 92309057,5, i CH_2Cl_2 (150 ml) og 48% HBF_4 (29,2 g), avkjølt via is-bad, ble satt TMSCHN_2 (165 ml som en 2M løsning i heksan). Blandingen ble omrørt inntil reaksjonen var nesten fullstendig ved TLC og deretter ble metanol (20 ml) tilsatt, fulgt av eddiksyre (10 ml). Vandig natrium-bikarbonat ble

tilsatt og blandingen ble ekstrahert med metylenklorid. Blandingen ble tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Kromatografi av residuet ga B, 14,9 g.

Eksempel 2: Mellomprodukt C

Til en kald (0 °C) løsning av B (14,9 g) i metylenklorid (100 ml) ble langsomt satt diisobutylaluminiumhydrid (140 ml som en 1M løsning i heksaner) inntil reaksjonen var fullstendig som bestemt ved TLC. Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av vandig 1N saltsyre (100 ml) fulgt av kons. saltsyre (50 ml). Lagene fikk separeres, og det vandige laget ble igjen ekstrahert med CH₂Cl₂. De samlede organiske lag ble deretter vasket med saltvann, tørret over natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk. Etter rensning ved silika-kromatografi ble 12,06 g av mellomprodukt C oppnådd.

Eksempel 3: Mellomprodukt D

Til en oppløsning av C (10,64 g) i metylenklorid (40 ml) ble satt trietylamin (15,75 ml), p-toluensulfonylklorid (11,86 g) og dimetylamino-pyridin (690 mg). Den resulterende suspensjonen ble omrørt inntil reaksjonen var fullstendig, som bestemt ved TLC og deretter ble reaksjonen stanset via vann-opparbeidelse med metylenklorid- ekstraksjon. Etter rensning ved silika-kromatografi ble 18,7 g av D oppnådd.

Eksempel 4: Mellomprodukt E

Til en oppløsning av D (18,7 g) i 200 ml aceton ble satt natriumjodid (24,6 g). Blandingen ble oppvarmet ved tilbaketilbake i 1 1/2 timer, oppløsningsmidlet fjernet under redusert trykk og residuet fordelt mellom vann og heksan. Det organiske laget

ble separert, tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet fjernet. Kromatografi (silika) ga 15,4 g E som en farveløs væske.

Eksempel 5: Mellomprodukt F

Denne forbindelsen ble fremstilt ved metoden til Christ, et al., europeisk patent-søknad 92309057,5.

Eksempel 6: Mellomprodukt G

Til en oppløsning av 18,6 g av mellomprodukt F og 15,4 g av mellomprodukt E i heksan ble satt 23,9 g sølvoksyd og blandingen ble tilbakeløpsbehandlet natten over. Blandingens ble avkjølt, filtrert gjennom diatoméjord, oppløsningsmidlet ble fjernet og residuet kromatografert (silika), hvilket ga mellomprodukt G (21 g) som en farveløs sirup.

Eksempel 7: Mellomprodukt H

Til en kald (0 °C) løsning av mellomprodukt G (21 g) i metylenklorid ble satt dråpevis 3,5 ml 48% tetrafluorborsyre. Etter 5 minutter ble blandingen vasket med vandig natriumbikarbonat-løsning og med saltvann. Blandingens ble konsentrert under redusert trykk og kromatografert (silika), hvilket ga mellomprodukt H, 18,7 g, som en farveløs sirup.

Eksempel 8: Mellomprodukt I

Til en oppløsning av mellomprodukt H (17,6 g) i ren metyljodid (105 ml) ble satt sølvoksyd (83 g). Blandingens ble omrørt natten over og deretter fortynnet med heksan og filtrert gjennom diatoméjord. Blandingens ble konsentrert under redusert

trykk og residuet oppløst i metylenklorid (40 ml). Blandingen ble avkjølt til 0 °C og til den ble satt imidazol (2,44 g) og t-butyldimetylsilylchlorid (4,7 ml). Den ble omrørt natten over og 150 ml natriumbikarbonat-løsning ble tilsatt. Det organiske laget ble tørret (natriumsulfat) og kromatografert (silika), hvilket ga mellomprodukt I, 10,5 g, som en farveløs sirup.

Eksempel 9: Mellomprodukt J

Mellomprodukt I ble oppløst i 100 ml metylenklorid til hvilket ble satt diallyldiisopropylfosforamidit (7,4 ml), fulgt av tetrazol (6,37 g). Blandingen ble avkjølt og omrørt i 20 minutter. En suspensjon av meta-klorperoksybenzoesyre (24,2 mmol) i 50 ml metylenklorid ble tilsatt over 15 minutter mens temperaturen på reaksjonsblandingen ble holdt under -60 °C. Natriumbikarbonat-løsning ble tilsatt og det organiske laget separert, tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet fjernet under redusert trykk. Kromatografi (silika) ga 14 g av en farveløs sirup av mellomprodukt J.

Eksempel 10: Mellomprodukt K

Til en suspensjon av 39,5 g di(tiofenyl)tinn (fremstilt ved metoden til Christ, et al., Europeisk patentsøknad 92309057,5) i 235 ml metylenklorid ble satt tiofenol (12 ml). Til denne blandingen ble satt trietylamin dråpevis over 15 minutter. En porsjon (150 ml) av denne "tinn-reagens"-blanding ble satt dråpevis over 15 minutter til en oppløsning av mellomprodukt J (12,9 g) i 25 ml metylenklorid. Resten av "tinn-reagenset" ble tilsatt over 30 minutter for å føre reaksjonen til fullføring. Blandingen ble fortynnet med etylacetat og vasket med vandig 1 N natriumhydroksyd og med saltvann. Det organiske laget ble tørret (natriumsulfat), oppløsningsmidlet ble fjernet og residuet kromatografert, hvilket ga 11,1 g av en gul sirup, mellomprodukt K.

Eksempel 11: Mellomprodukt L

Til en kald løsning av mellomprodukt K (11,1 g) og pyridin (7,1 ml) i 80 ml metylenklorid ble satt trikloretylklorformiat (2,9 ml), og blandingen ble omrørt natten over. Vandig natriumbikarbonat-løsning ble tilsatt, det organiske laget ble separert, tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet fjernet under redusert trykk. Kromatografi ga mellomprodukt L, 12,96 g som et lysegult, fast stoff.

Eksempel 12: Mellomprodukt M

Mellomprodukt L, 12,96 g, ble oppløst i metylenklorid. Til denne blandingen ble satt en 6 M løsning av hydrogenfluorid i acetonitril, og blandingen ble omrørt i 4 timer. Vandig natriumbikarbonat-løsning ble tilsatt, det organiske laget ble separert, tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Kromatografi ga 10,9 g av en ravgul sirup, mellomprodukt M.

Eksempel 13: Mellomprodukt N

Til en oppløsning av mellomprodukt M (9,5 g) i 50 ml trikloracetonitril ble satt kaliumkarbonat (15 g) og blandingen ble omrørt i 10 minutter. Blandingens ble filtrert gjennom diatoméjord og oppløsningsmidlet fjernet under redusert trykk. Kromatografi ga 14,5 g av mellomprodukt N som ble anvendt med én gang i Eksempel 19.

Eksempel 14: Mellomprodukt O

Til en oppløsning av mellomprodukt F (160 g) i heksan (475 ml) og joddekan (474 ml) ble satt sølvoksyd (723 g). Blandingens ble oppvarmet ved 70 °C i mørke i 2 timer og filtrert gjennom diatoméjord. Løsningen ble konsentrert under redusert trykk

og residuet kromatografert, hvilket ga 221 g av mellomprodukt O som en farveløs olje.

Eksempel 15: Mellomprodukt P

Til en oppløsning av mellomprodukt O (30 g) i metylenklorid (90 ml) og acetonitril (90 ml) ble satt en oppløsning av 48% vandig hydrogenfluorid (9 ml) i acetonitril (81 ml). Blandingen ble omrørt i 30 minutter og 350 ml vandig natriumbikarbonat ble tilsatt. Blandingen ble ekstrahert med metylenklorid. Det organiske laget ble tørret (natriumsulfat), oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk og residuet kromatografert hvilket ga 30 g av mellomprodukt P som en gul olje.

Eksempel 16: Mellomprodukt Q

Til en kald (0 °C) løsning av mellomprodukt P (30 g) og imidazol (10,2 g) i metylenklorid (500 ml) ble satt t-butyldimetylsilylchlorid (10,85 g). Blandingen ble omrørt i 1 1/2 timer og deretter hellet i 400 ml mettet vandig ammoniumklorid. Det organiske laget ble separert, tørret (natriumsulfat), oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk og residuet kromatografert, hvilket ga 34,5 g av mellomprodukt Q som en farveløs sirup.

Eksempel 17: Mellomprodukt R

Til en kald (0 °C) løsning av mellomprodukt Q (32,2 g) og pyridin (184. ml) i toluen (213 ml) ble satt en 1,94 M løsning av fosgen i toluen. Etter 20 minutter ble allyl- alkohol (31 ml) tilsatt, og blandingen ble omrørt i 30 minutter. Vandig natriumbikarbonat ble tilsatt, det organiske laget ble fraskilt, tørret (natriumsulfat) og

oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Kromatografi ga 36,9 g av mellomprodukt R som en farveløs sirup.

Eksempel 18: Mellomprodukt S

Til en oppløsning av 2,4 ml 48% vandig hydrogenfluorid i 48 ml acetonitril ble satt en oppløsning av mellomprodukt R (20 g) i metylenklorid (24 ml) og blandingen ble omrørt natten over. Vandig natriumbikarbonat-løsning ble tilsatt, det organiske laget ble fraskilt og tørret (natriumsulfat), og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Kromatografi ga 11 g av mellomprodukt S som en farveløs sirup.

Eksempel 19: Mellomprodukt T

Mellomprodukt S (8,97 g) og mellomprodukt N (14,5 g) ble oppløst i toluen (20 ml) og blandingen ble tørret ved azeotrop fjernelse av oppløsningsmidlet. Denne prosedyren ble gjentatt tre ganger. Den tørrede blandingen ble oppløst i 50 ml metylenklorid som ble langsomt satt til en oppløsning av sølvtriflat (5,8 g) i 50 ml metylenklorid. Blandingen ble omrørt i 10 minutter og 250 ml vandig natriumbikarbonat-løsning og 250 ml 10 % vandig natriumtiosulfat ble tilsatt. Det organiske laget ble separert, tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Kromatografi ga 13 g av mellomprodukt T som en blekgul sirup.

Eksempel 20: Mellomprodukt U

Til en oppløsning av mellomprodukt T i metylenklorid (10 ml) ble langsomt satt tinn(II)tris-benzentiolat-trietylamin-kompleks (12 ml av en 0,5 M løsning i metylenklorid). Etter 10 minutter ble en ytterligere ekvivalent tinn-reagens tilsatt.

Etter ytterligere 15 minutter ble en ytterligere ekvivalent tilsatt. Etter 15 minutter ble etylacetat (250 ml) tilsatt, og blandingen ble ekstrahert med 1 N vandig natriumhydroksyd-løsning (250 ml). Blandingen ble tørret (natriumsulfat) og konsentrert under redusert trykk. Toluen ble tilsatt og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk, hvilket ga en olje som ble anvendt ved neste omdannelse uten ytterligere rensning.

Eksempel 21: Mellomprodukt V

Til en avkjølt (0 °C) løsning av mellomprodukt U (2 mmol) i metylenklorid (5 ml) ble satt 3-ketotetradekansyre (997 mg) , fremstilt ved metoden til Christ, et al., europeisk patentsøknad 92309057,5, fulgt av 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimid-hydroklorid (1,5 g), og blandingen ble omrørt i omtrent 30 minutter. Blandingen ble fortynnet med metylenklorid (150 ml), vasket med 1 N vandig natriumhydroksyd, tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Kromatografi på silika fulgt av kromatografi på basisk alumina ga 1,64 g av mellomprodukt V.

Eksempel 22: Mellomprodukt W

En oppløsning av mellomprodukt V (1,45 g) i iseddik (5 ml) ble satt til en suspensjon av godt omrørt sink-kobber-par (14 g) i eddiksyre (10 ml). Blandingen ble omrørt i 15 minutter og ytterligere sink/kobber-par (10 g) ble tilsatt. Etter ytterligere 15 minutter ble blandingen filtrert gjennom diatoméjord som deretter ble vasket med etylacetat. De samlede vaskene ble fortynnet med toluen og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert på

en bilags-blanding av basisk alumina og silika, hvilket ga mellomprodukt W som ble anvendt uten ytterligere rensning.

Eksempel 23: Mellomprodukt X

En oppløsning av mellomprodukt W (1,02 mmol) og cis-vaccenin-syre (575 mg) ble oppløst i toluen (5 ml) tre ganger og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Det tørrede residuet ble oppløst i metylenklorid (3 ml), og 1-(3-dimetylamino-propyl)-3-etylkarbodiimid-hydroklorid (780 mg) ble tilsatt og blandingen ble omrørt i 3 timer. Blandingene ble fortynnet med metylenklorid og kromatografert direkte, hvilket ga 734 mg av mellomprodukt X. Videre kromatografi av de urene fraksjoner ga ytterligere 58 mg materiale.

Eksempel 24: Mellomprodukt Y

Til en oppløsning av mellomprodukt X (785 mg) i metylenklorid (10 ml) ble satt en oppløsning av 48% vandig hydrogenfluorid i acetonitril (15 ml). Blandingene ble omrørt i 90 minutter, fortynnet med metylenklorid (50 ml), vasket med vann og med vandig natriumbikarbonat-løsning. Blandingene ble tørret (natriumsulfat) og kromatografert, hvilket ga mellomprodukt Y, 719 mg.

Eksempel 25 : Mellomprodukt Z

Mellomprodukt Y (719 mg) ble oppløst i metylenklorid, og natriumsulfat (1,4 g) ble tilsatt. Diallyldiisopropylfosforamidit (189 ml) og tetrazol (162 mg) ble tilsatt, blandingene ble omrørt i 10 minutter og deretter avkjølt til -78 °C. En oppløsning av m-klorperoksybenzoesyre (192 mg) i metylenklorid (4 ml) ble tilsatt dråpevis. Blandingene ble vasket med vandig natriumtiosulfat og med vandig natriumbikarbonat,

tørret (natriumsulfat) og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Residuet ble kromatografert, hvilket ga 660 mg av mellomprodukt Z.

Eksempel 26: Forbindelse 1

Til en oppløsning av tetrakis(trifenylfosfin)palladium (0) (166 mg) i 2 ml av en tetrahydrofuran: eddiksyre- (10:1) blanding ble satt en oppløsning av mellomprodukt Z (660 mg) i 3 ml av den samme oppløsningsmiddelblanding. Etter 30 minutter ble ytterligere tetrakis(trifenylfosfin)palladium (0) tilsatt. Etter ytterligere 1 1/2 timer ble toluen tilsatt, og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Blandingen ble rensed ved kromatografi på dietylaminocetylcellulose. Den rensede blanding ble oppløst i 0,1 N vandig natriumhydroksyd, filtrert gjennom et 0,45 µ sterilt filter og rensed ved HPLC på en YMC-Pack ODS-AP kolonne, hvilket ga 130 mg av forbindelse 1.

Analytiske data for noen av forbindelsene og mellomproduktene fremstilt ved metodene beskrevet ovenfor er gitt nedenfor:

Forbindelse 1: ^1H NMR (CD_3OD) δ : 5,3 (1H, m), 4,6 (1, m), 4,0 (m, m), 3,9 (1H, d), 3,7 (1H, t), 3,6 (1H, t), 3,4 (3H, s), 3,3 (3H, t), 2,6 (2H, t), 2,3 (2H, m), 2,0 (2H, m), 1,7 - 1,2 (m, m), 0,9 (6H, t).

^{31}P NMR (CD_3OD) δ : 4,71, 3,98.

Forbindelse 1: $(\text{M} + \text{Na})^+ = 1333$

Forbindelse 2: $(\text{M} + 3 \text{Na})^+ = 1363$

Forbindelse 3: $(\text{M} + 3 \text{Na})^+ = 1365$

Forbindelse 5 : $(\text{M} + \text{Na})^+ = 1303$

Forbindelse 6: $(\text{M} + \text{Na})^+ = 1359$

Forbindelse 7: $(M + Na)^+ = 1305$

Forbindelse 8: $(M + 3 Na)^+ = 1393$

Forbindelse 10: $(M + Na)^+ = 1425$

Mellomprodukt G: 1H NMR ($CDCl_3$) δ : d, (1H), 3,9-3,7 (m, multippel), 3,65 (t, 1H), 3,37 (s,3H), 3,2 (m,2H), 1,75 (q, 2H), 1,52 (s,3H), 1,4 (s,3H), 1,3 (bred m,multippel), 0,95 (s,9H), 0,9 (t,3H) og 0,2 (d,6H)

Mellomprodukt H: 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 4,58 (d,1H), 4,09 (m,2H), 3,9 (dd,1H), 3,75 (dd,1H), 3,7 (m,1H), 3,5 (t,1H), 3,37 (s,3H), 3,23 (t,1H), 3,05 (t,1H), 1,8 (m,2H), 1,68 (m,1H), 1,5 (m,1H), 1,3 (bred m,multippel), 0,95 (s,9H), 0,9 (t,3H), 0,2 (d,6H)

Mellomprodukt I: 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 4,52 (d,1H), 4,05 (m,2H), 3,75 (m,1H), 3,67 (t,1H), 3,5 (t,1H), 3,45 (s,3H), 3,35 (s,3H), 3,25 (t,1H), 3,05 (t,1H), 1,8 (m,2H), 1,65 (m,1H), 1,5 (m,1H), 1,3 (bred s,m), 0,95 (s,9H), 0,9 (t,3H), 0,2 (s,6H)

Mellomprodukt J: 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 5,95 (m,2H), 5,35 (d,1H), 5,22 (d,1H), 4,6 (q,2H), 4,5 (d,1H), 4,32 (q,1H), 3,9-3,75 (m,3H), 3,7 (dd,1H), 3,65 (dd,1H), 3,45 (m,1H), 3,38 (s,3H), 3,33 (s,3H), 3,27 (t,1H), 3,2 (t,1H), 1,9-1,75 (m,3H), 1,5 (m,1H), 1,3 (bred m,multippel), 0,95 (s,9H), 0,9 (t,3H), 0,2 (s,6H)

Mellomprodukt L: 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 5,95 (d,1H), 5,4 (d,2H), 5,25 Z(d,2H), 4,95 (d,1H), 4,7 (q,2H), 4,55 (q,2H), 4,32 (q,1H), 3,9-3,75 (m,3H), 3,7 (dd,1H), 3,65 (dd,1H), 3,55 (m,1H), 3,4 (m,1H), 3,4 (s,3H), 3,3 (s,3H), 3,25 (m,1H), 1,75 (m,multippel), 1,5-1,4 (m,2H), 1,3 (bred s,multippel), 0,95-0,9 (bred s,12H), 0,2 (d,6H)

Mellomprodukt M: 1H NMR multippel: 5,95 (m,2H), 5,75 (d,1H), 5,4 (d,1H), 5,25 (d,2H), 4,75-4,65 (dd,2H), 4,6 (q,1H), 4,3 (q,1H), 4,1 (m,2H), 3,9 (m,2H), 3,65 (m,1H), 3,4 (s,3H), 3,25 (s,3H), 1,75 (bred m,2H), 1,55-1,4 (m,2H), 1,3 (bred s,multippel), 0,9 (t,3H)

Mellomprodukt O: 1H NMR ($CDCl_3$) δ : 4,5 (d,1H), 3,8 (dd,1H), 3,78 (m,2H), 3,6 (m,multippel), 3,2 (m,2H), 1,5 (s,3H), 1,4 (s,3H), 1,3 (bred s, multippel), 0,95 (s,9H), 0,9 (t,3H), 0,18 (d,6H)

Mellomprodukt P: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 4,5 (d, 1H), 3,75 (dd, 2H), 3,6 (q, 2H), 3,5 (t, 1H), 3,3 (m, 1H), 3,2 (t, 1H), 3,0 (t, 1H), 1,6 (m, 2H), 1,25 (bred s, multippel), 0,95 (s, 9H), 0,9 (t, 3H), 0,18 (d, 6H)

Mellomprodukt Q: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 4,5 (d, 1H), 3,82 (t, 2H), 3,7 (m, 2H), 3,6 (t, 1H), 3,3 (m, 1H), 3,2 (t, 1H), 3,05 (q, 2H), 1,6 (m, 2H), 1,3 (bred s, multippel), 0,95 (s, 9H), 0,88 (s, 9H), 0,85 (t, 3H), 0,2 (d, 6H), 0,1 (d, 6H)

Mellomprodukt R: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 5,9 (m, 1H), 5,4-5,25 (dd, 2H), 4,75 (t, 1H), 4,6 (d, 2H), 4,45 (d, 1H), 3,75 (q, 1H), 3,7 (d, 2H), 3,53 (q, 1H), 3,38 (m, 1H), 3,25 (t, 1H), 3,15 (t, 1H), 1,5 (t, 2H), 1,25 (s, multippel), 0,95 (s, 9H), 0,85 (m, 12H), 0,2 (s, 6H), 0,07 (s, 6H)

Mellomprodukt S: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 5,9 (m, 1H), 5,4-5,25 (dd, 2H), 4,75 (t, 1H), 4,6 (d, 2H), 4,52 (d, 1H), 3,7 (m, multippel), 3,65-3,6 (dd, 2H), 3,55 (q, 1H), 3,4 (m, 1H), 3,28 (t, 1H), 3,2 (t, 1H), 1,5 (t, 2H), 1,3 (s, multippel), 0,9 (s, 9H), 0,85 (t, 3H), 0,2 (s, 6H)

Mellomprodukt T: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 5,9 (m, 3H), 5,6 (d, 1H), 5,4-5,2 (m, 6H), 4,8 (d, 1H), 4,7-4,6 (m, 2H), 4,55 (q, 1H), 4,5 (d, 1H), 4,3 (q, 1H), 3,8-3,7 (m, multippel), 3,6 (dd, 1H), 3,5 (m, multippel), 3,35 (s, 3H), 3,2 (s, 3H), 3,15 (t, 1H), 1,7 (m, 2H), 1,5 (m, 2H), 1,3 (s, multippel), 0,95 (t, 6H), 0,2 (t, 6H)

Mellomprodukt V: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7,3 (d, 1H), 5,95 (m, 3H), 5,6 (d, 1H), 5,4-5,2 (m, 6H), 4,95 (d, 1H), 4,8 (d, 1H), 4,7-4,5 (m, multippel), 4,3 (q, 1H), 3,9-3,65 (m, multippel), 3,6 (m, multippel), 3,45 (t, 1H), 3,4 (t, 3H), 3,35 (s, 2H), 3,28 (3H), 2,5 (t, 2H), 1,8 (m, 2H), 1,6 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,3 (bred s, multippel), 0,95-0,8 (m, 18H), 0,15 (d, 6H)

Mellomprodukt X: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7,3 (d, 1H), 5,95 (m, 4H), 5,4-5,2 (m, 8H), 4,95 (d, 1H), 4,8 (d, 1H), 4,7 (t, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,55 (q, 1H), 4,3 (q, 1H), 4,1 (t, 1H), 3,9 (q, 1H), 3,8 (t, 1H), 3,7-3,5 (m, multippel), 3,45 (t, 1H), 3,35 (s, 3H), 3,3 (s, 2H), 3,28 (s, 3H), 2,5 (t, 2H), 2,2 (t, 1H), 2 (d, 1H), 1,7 (q, 2H), 1,6 (m, 2H), 1,3 (s, multippel), 0,95-0,8 (m, 21), 0,15 (d, 6H)

Mellomprodukt Y: ^1H NMR (CDCl_3) δ : 6,65 (d, 1H), 6,55 (d, 1H), 5,905 (m, 5H), 5,7 (m, 1H), 5,4-5,2 (m, 12H), 4,8 (m, 2H), 4,6 (d, 1H), 4,5 (m, 10H), 4,3 (q, 1H), 4,1 (m, 1H),

3,85-3,45 (m,multipel), 3,4 (s,3H), 3,35 (s,3H), 3,25 (s,3H), 3,2 (t,1H), 2,5 (dd,2H), 2,2 (t,2H), 2 (m,multipel), 1,7-1,2 (m,multipel), 0,9 (t,12H).

BIOLOGISKE EKSEMPLER

Både bakterielle LPS og bakterielle lipid A utløser produksjon av tumor-nekrose-faktor (TNF), IL-1 β , IL-6 og IL-8, så vel som andre cytokiner og cellulære mediatorer i menneske-fullblod og i menneske-makrofag-celle-linjer. Dannelse av patofysiologiske mengder av disse cytokiner er funnet å spille en betydelig rolle ved initiering av systemisk inflammatorisk respons-syndrom og septisk sjokk. Liposakkarid-analogene beskrevet her hemmer slik LPS- og/eller lipid A-mediert fremkalling av cytokiner som demonstrert ved de følgende forsøk.

Eksempel A: *In vitro* hemning av LPS-fremkalt produksjon av cytokiner

Menneske-fullblod ble preparert og undersøkt som beskrevet (Rose et al. (1995) *Infection and Immunity*, 63 833-839). HL-60-celler ble dyrket i RPMI medium supplert med 10% føtalt kalveserum og antibiotika og bevirket til å differensiere i makrofager ved behandling med 0,1 μ M 1,25-dihydroxycholecalciferol (Vitamin D3; Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA.) og undersøkt for LPS-mediert dannelse av IL-8. Bakteriell LPS (dvs. fra *E. coli* 0111:B4; Sigma Chemicals, St. Louis, MO) ved 10 ng/ml eller lipid A (Daiichi Chemicals, Tokyo, Japan) ble tilsatt som 10-ganger konsentrerte løsninger i Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ fri Hank's balanserte salt-løsning (CMF-HBSS; Gibco). I eksperimenter som innbefattet analoger ifølge foreliggende oppfinnelse, ble analogen tilsatt umiddelbart før tilsetning av LPS eller lipid A i CMF-HBSS (f.eks., mellom 0 og 100 μ M som en 10x konsentrert aliquot). Etter inkubering i tre timer ble plasma fremstilt fra fullblod, eller kultur-supernatant ble fjernet og undersøkt på tilstedeværelse av det angitte cytokin ved anvendelse av et ELISA forsøkssett fra Genzym (Cambridge, MA) etter

instruksjonene fra produsenten, men et hvilket som helst annet standard ELISA-sett kan anvendes. Forsøkene ble utført in triplo minst to ganger.

Lipid A-analoger hemmet LPS-fremkalt produksjon av TNF i menneske-fullblod på en konsentrasjonsavhengig måte. Av de undersøkte analogene ble Forbindelse 1 funnet å være en av de mest effektive forbindelser. Resultatene av denne undersøkelsen er som vist i Figur 1. Forbindelse 1 hemmer LPS-fremkalt produksjon av TNF, idet den har en IC₅₀ på omtrent 1,5 nM. Andre analoger funnet å hemme LPS-fremkalt TNF-produksjon omfatter forbindelse 2, forbindelse 3, forbindelse 4, forbindelse 5, forbindelse 6, forbindelse 7, forbindelse 8, forbindelse 9 og forbindelse 10. Disse forbindelser har IC₅₀ på mellom 1,5 nM og 159 nM.

Forbindelse 1 hemmet også LPS-mediert fremkalling av IL-8 i HL-60- (humane makrofag-lignende) celler. Hemning av IL-8-dannelse var fullstendig ved konsentrasjoner på 1 nM og større av Forbindelse 1 når enten LPS eller lipid A ble anvendt som agonist.

Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse hemmet tilsvarende LPS-fremkalt produksjon av andre cytokiner i menneske-fullblod, selv om noen av disse cytokinene ble dannet flere timer etter tilsetning av LPS. For eksempel trenger IL-1 β og IL-6 fire timer eller mer for at maksimale nivåer skal nås, mens IL-8 når maksimale nivåer ti timer eller mer etter LPS-tilsetning. Ved anvendelse av metodene beskrevet ovenfor, ble forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse tilsatt i en konsentrasjon mellom 0 og 10 μ M og LPS ble tilsatt i 10 ng/ml. Hemning av produksjon av TNF, IL-1 β , IL-6 og IL-8 ble målt som en funksjon av tid etter tilsetning av LPS. Denne hemning av cytokin-dannelse ble også funnet å være konsentrasjonsavhengig, men i alle tilfeller var undertrykkelse av all cytokin-syntese >90 % med forbindelse 1-konsentrasjoner på 10 nM og mer i opptil 24 timer etter tilsetning av LPS.

Eksempel B: Vedvaring av forbindelser i menneske-fullblod

Selv om noen av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse ikke raskt fjernes fra sirkulasjonen, reduseres deres aktivitet, med en halveringstid på 1-3 timer.

For å opprettholde den antagonistiske effekten, kan denne raske deaktiveringen kreve kontinuerlig administrering. Undersøkelse av denne deaktiveringen har ført til utvikling av et forsøk for å måle *in vitro* deaktivering av medikamenter i menneskefullblod. Dette gjøres ved preinkubering av lipid A-antagonister med blod i forskjellige tidsperioder, fulgt av tilsetning av LPS "utfordrer" som beskrevet ovenfor, inkubering i tre timer og måling av frigjorte cytokiner. En skjematisk oppstilling av dette forsøk er vist i Figur 2.

Ved anvendelse av dette forsøk kan det demonstreres at B531, som beskrevet av Christ, et al., U. S. søknad 07/935,050, "deaktiveres" (taper aktivitet med økende preinkuberingstid). Som vist i Figur 3, deaktiveres også forbindelse 1, men dens overlegne aktivitet og reduserte deaktiveringsgrad gjør den like aktiv etter 6 timer som B531 var like etter tilsetningen. Disse dataene er gjennomsnitt av 7 separate forsøk utført in triplo.

Eksempel C: Hemning av TNF- eller IL-6-produksjon i *in vitro* dyremodellsystemer

LPS-fremkalt TNF- eller IL-6-produksjon ble hemmet av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse i fullblod eller makrofager isolert fra marsvin, rotter og mus. Hartley-White marsvin- (Elm Hill Breeders, Chelmsford, MA) og C57BL/6 mus- (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) makrofager ble isolert fra buken til forbehandlede dyr. Forbehandling ble utført ved intraperitoneal injeksjon av 2 mg av *Bacillus calmette guerin* (BCG; RIBI Immunochemical Research, Inc., Hamilton, MT) i en konsentrasjon på 10 mg/ml i fysiologisk saltvann for mus og 2 mg BCG i en konsentrasjon på 2 mg/7 ml i mineralolje for marsvin. Tre dager etter injeksjon ble peritoneale makrofager isolert fra buken til dyrene ved standard teknikker. Cellene fikk klebes til dyrkningsplater i 2 til 3 timer og ble deretter dyrket med RPMI 1640 medium inneholdende 10% føtalt kalveserum og LPS (endeling konsentrasjon på 10 ng/ml) ble tilsatt som beskrevet ovenfor. For å undersøke hemningen ble forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse (i en konsentrasjon på mellom 0 og 100 µM) satt til dyrkningsmediet like før LPS-tilsetningen. Etter en tre timers

inkuberingsperiode ble TNF-nivåer og/eller IL-6-nivåer hos marsvin, mus og rotte undersøkt ved ELISA eller ved det cytolytiske bioforsøk beskrevet i *Lymphokines* 2:235, 1981 for TNF frigjort fra marsvin-makrofager. I peritoneale makrofager fra mus ga Forbindelse 1 effektiv hemning (IC_{50} = hhv. 16 nM for IL-6 og 20 nM for TNF); i marsvin-makrofager var IC_{50} for TNF-frigjøring 0,3 nM og i peritoneale makrofager fra rotter var IC_{50} for frigjøring av TNF 11 nM.

Eksempel D: In vivo forsøk

BCG-forbehandlede mus (Vogel, S. et al. J. Immunology 1980, 124, 2004-2009) ble anvendt som et *in vivo* forsøkssystem for overvåkning av de hemmende virkningene av lipid A-analoger på (1) LPS-fremkalt TNF-produksjon og (2) LPS-fremkalt dødelighet som følger.

Fem uker gamle C57BL/6 hannmus (*supra*) ble forhåndsbehandlet ved intravenøs halevene-injeksjon med 2 mg BCG. Ti dager etter injeksjon ble *E. coli* LPS (*supra*) i pyrogen-fri 5% glukose-løsning (Otsuka Pharmaceuticals Inc., Tokyo, Japan) administrert intravenøst gjennom halevenen til de BCG-primede musene. LPS ble administrert med 1-3 µg/mus både for TNF-produksjons- og dødelighetsundersøkelsene. Test-forbindelse ble administrert som en komponent i den injiserte LPS-løsningen i en konsentrasjon på mellom 3 og 300 µg/mus. Plasma ble tatt én time etter LPS-injeksjon og TNF ble målt ved ELISA-forsøket beskrevet ovenfor. Dødelighet etter septisk sjokk ble nedtegnet 36 timer etter LPS-injeksjon.

Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse undertrykket effektivt produksjon av TNF etter administrering av LPS. Forbindelse 10 og Forbindelse 1 hemmet effektivt TNF-produksjon *in vivo* hos mus (ED_{50} = hhv. 5 og 10,6 µg/mus). Forbindelse 2, forbindelse 3, forbindelse 4, forbindelse 5, forbindelse 6, forbindelse 7, forbindelse 8 og forbindelse 9 hemmet også TNF-produksjon med ED_{50} mellom 10 og 200 µg/mus, idet forbindelsene 5, 6 og 7 ga ED_{50} -verdier >100.

I parallelle forsøkt utført med marsvin, var disse analogene også effektive inhibitorer av LPS-fremkalt TNF-produksjon *in vivo* (optimale ED₅₀ mellom 2,3 og 6,1 µg/marsvin for forbindelse 1, forbindelse 7 og forbindelse 10.

TERAPI

Lipid A-analogene beskrevet her gir nyttige terapeutiske midler for behandling eller forhindring av alle LPS-medierte inflammasjoner eller lidelser. Slike lidelser omfatter, uten begrensning: endotoksemi (eller sepsis syndrom) resulterende fra en gram-negativ bakteremi (med medfølgende symptomer som feber, generell inflammasjon, disseminert intravaskulær koagulering, hypotensjon, akutt nyresvikt, akutt respiratory distress syndrom (ARDS), hepatocellulær destruksjon og/eller hjerte-svikt); og LPS-mediert forverring av latente eller aktive virale infeksjoner (f.eks., infeksjon med HIV-1, cytomegaloviruser, herpes simplex og influenza-virus).

Lipid A-analogen blir typisk administrert i en farmasøytisk godtagbar formulering, f.eks. oppløst i fysiologisk saltvann (som kan omfatte 5% glukose). Når lipid A-analogen gis for behandling av en viral infeksjon, kan den administreres sammen med passende viricide midler. Lipid A-analogen kan lagres som et frysetørret preparat.

Lipid A-analoger blir administrert i doser som gir tilstrekkelig hemning av LPS-aktivering av målceller, og generelt er disse dosene fortrinnsvis mellom 0,01 - 50 mg/pasient/dag, mer foretrukket mellom 0,05 - 25 mg/pasient/ dag og mest foretrukket, mellom 1 og 12 mg/pasient/dag.

Medikamentet bør injiseres eller infuseres så snart som mulig når SIRS kan diagnostiseres ved anvendelse av kliniske prediktorer så som APACHE-resultat (Knaus, et al., 1991 Chest 100: 1619-36 og Knaus, et al., 1993 JAMA: 1233-41) eller andre kliniske prediktorer. I tillegg bør injeksjon eller infusjon starte så snart som mulig etter utsettelse for endotoksin eller diagnose av systemisk gramnegativ bakteriell infeksjon, spesielt hvis en raskere eller tidligere diagnostisk indikator på systematisk gram-negativ infeksjon blir tilgjengelig.

Profylaktiske indikasjoner for anvendelse av disse medikamentene kan omfatte anvendelse av dem når utsettelse for endotoksin kan forventes. Dette kan forekomme når:

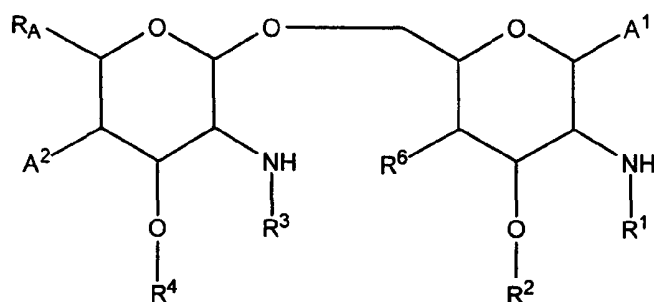
- 1) det er en øket sannsynlighet for økning av systemisk (blod-båret) endotoksin fra systemisk eller lokal gram-negativ bakteriell infeksjon (så som under operasjon);
- 2) det er en øket sannsynlighet for at blod-nivåene av endotoksin kan øke. Ved normal fysiologisk tilstand, vandrer endotoksin i minimal grad gjennom tarm-endotelet inn i innvolls-sirkulasjonen. Slikt translokert endotoksin blir deretter vanligvis renses av leveren (og muligens andre celler og organer). Økning i blod-endotoksin-nivå kan forekomme når endotoksin-rensningsgraden av leveren (eller andre endotoksin-nedbrytende celler eller organer) nedsettes. Økning av tarm-translokering kan forekomme etter tarm-ischemi, hypoksi, traume eller annen skade på integriteten til tarm-grensen (eller ved medikament- eller alkohol-forgiftning). Blod-nivåene av endotoksin øker når leverfunksjonen er skadet ved sykdom (cirrose), skade (ved operasjon eller traume) eller ved midlertidig fjernelse (som under levertransplantering);
- 3) det er en akutt eller kronisk utsettelse for eksternt endotoksin som resulterer i inflammatorisk respons, idet denne utsettelsen kan være forårsaket ved inhalering eller opptak av endotoksin på annen måte. Et eksempel på SIRS-fremkallende endotoksin-opptak er maisstøv-feber (Schwartz, et al., 1994 Am J Physiol. 267: L609-17), som påvirker arbeidere i korn-industrien, for eksempel i midtvesten i Amerika. Slike arbeidere kan behandles profylaktisk, f.eks. daglig, ved inhalering av et aerosol-fremstilt preparat av medikamentet før de begynner arbeidet i f.eks. marker eller korn-elevatorene.

For de fleste andre profylaktiske og terapeutiske anvendelser vil IV-infusjon eller bolus-injeksjon anvendes. Injeksjon er mest foretrukket, men infusjon kan være berettiget i noen tilfeller etter farmakokinetiske krav.

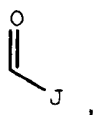
Behandlingen bør startes så snart som mulig etter diagnose av SIRS og bør fortsettes i minst tre dager, eller når vurdering av dødsrisiko er redusert til et akseptabelt nivå.

Patentkrav

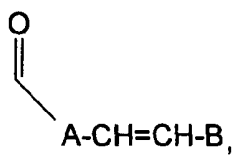
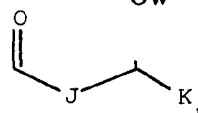
1. Forbindelse, karakteriseret ved formelen:



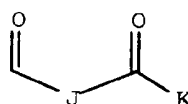
hvor R¹ er valgt fra gruppen bestående af



,
OW



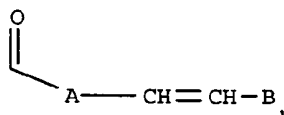
og



hvor hver J og K uafhængig er lineær eller forgrenet C1 til C15 alkyl;

R² er lineær eller forgrenet C5 til C15 alkyl;

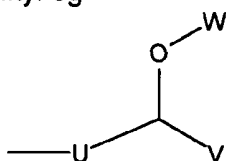
R³ er valgt fra gruppen bestående af lineær eller forgrenet C5 til C18 acyl,



hvor hver A, B og D uafhængig er lineær eller forgrenet C1 til C15 alkyl;

R⁴ er valgt fra gruppen bestående af

lineær eller forgrenet C4 til C20 alkyl og



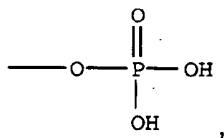
hvor hver U og V uafhængig er lineær eller forgrenet C2 til C15 alkyl og W er

hydrogen eller lineær eller forgrenet C1 til C5 alkyl;

R_A er R⁵ eller R⁵-O-CH₂-, idet R⁵ er lineær eller forgrenet C1 til C5 alkyl;

R⁶ er hydroksy;

A¹ og A² er



eller et farmasøytisk godtagbart salt derav.

2. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at R² er C8 til C15 lineær eller forgrenet alkyl.

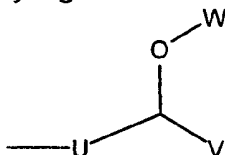
3. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at R² er C9 til C12 lineær eller forgrenet alkyl.

4. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at R² er C10 lineær eller forgrenet alkyl.

5. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at dobbeltbindingene er cis.

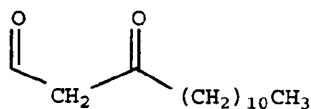
6. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at dobbeltbindingene er trans.

7. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at R^4 er valgt fra gruppen bestående af lineær eller forgrenet C4 til C20 alkyl og



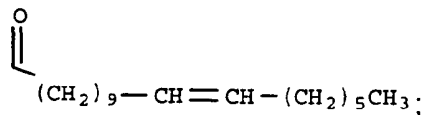
hvor U er lineær eller forgrenet C2 til C5 alkyl, V er lineær eller forgrenet C5 til C12 alkyl og W er hydrogen eller lineær eller forgrenet C1 til C5 alkyl.

8. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at R^1 er

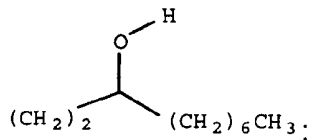


R^2 er $(CH_2)_9CH_3$;

R^3 er



R^4 er

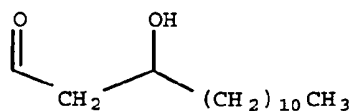


R^5 er $-CH_3$; og

R^6 er hydroksy.

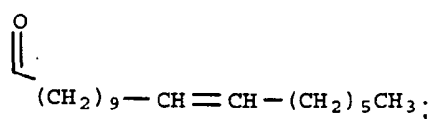
9. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at

R¹ er

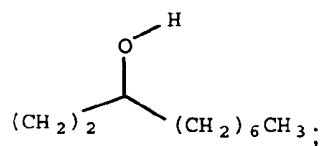


R² er (CH₂)₉CH₃;

R³ er



R⁴ er

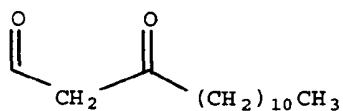


R⁵ er -CH₃;

R⁶ er hydroksy.

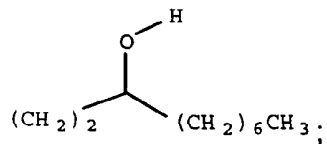
10. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at

R¹ er



R² er (CH₂)₉CH₃, og R³ er (C=O)(CH₂)₁₆CH₃;

R⁴ er

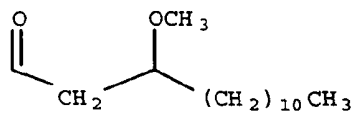


R⁵ er -CH₃; og

R⁶ er hydroksy.

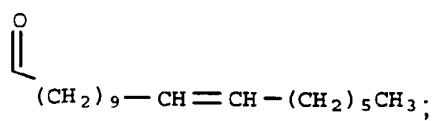
11. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at

R¹ er

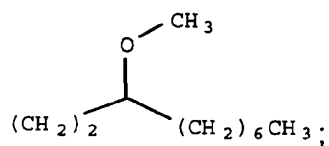


R² er (CH₂)₉CH₃;

R³ er



R⁴ er

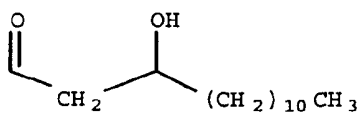


R⁵ er -CH₃; og

R⁶ er hydroksy.

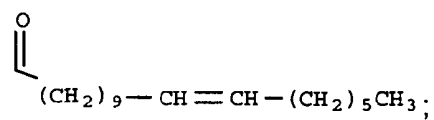
12. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at

R¹ er

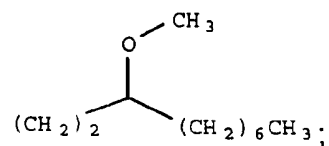


R² er (CH₂)₉CH₃;

R³ er



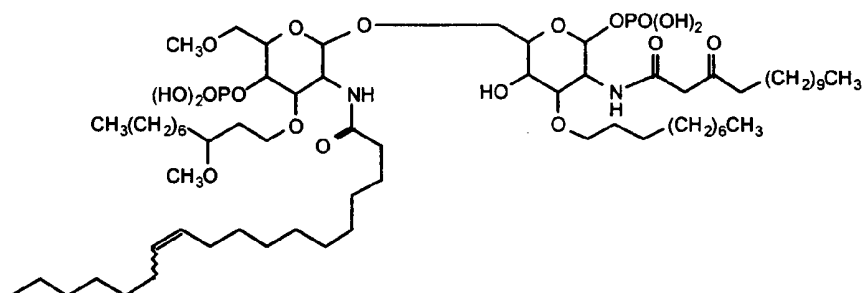
R⁴ er



R⁵ er -CH₃; og

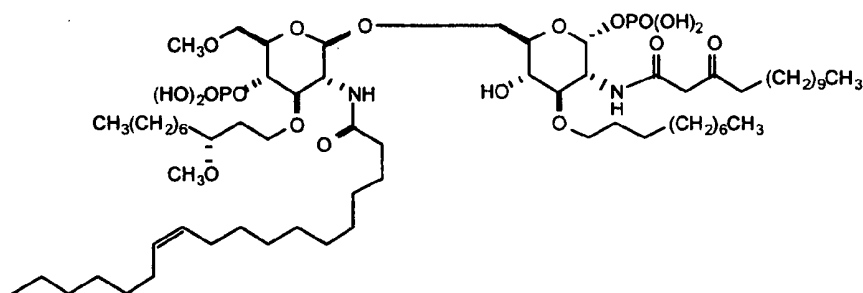
R⁶ er hydroksy.

13. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den har følgende struktur



eller et farmasøytisk godtagbart salt derav.

14. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den har følgende struktur

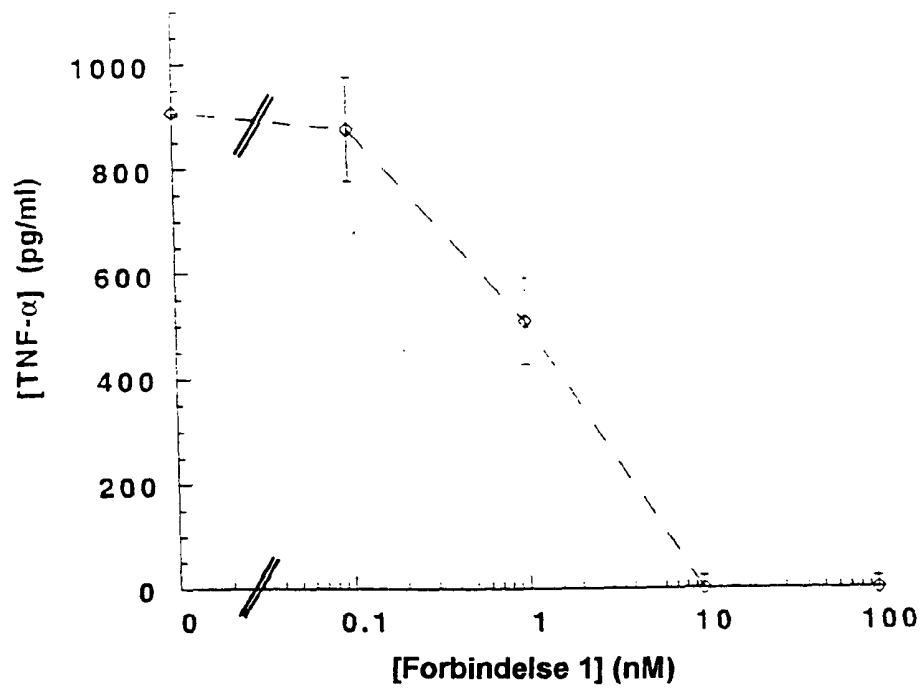


eller et farmasøytisk godtagbart salt derav.

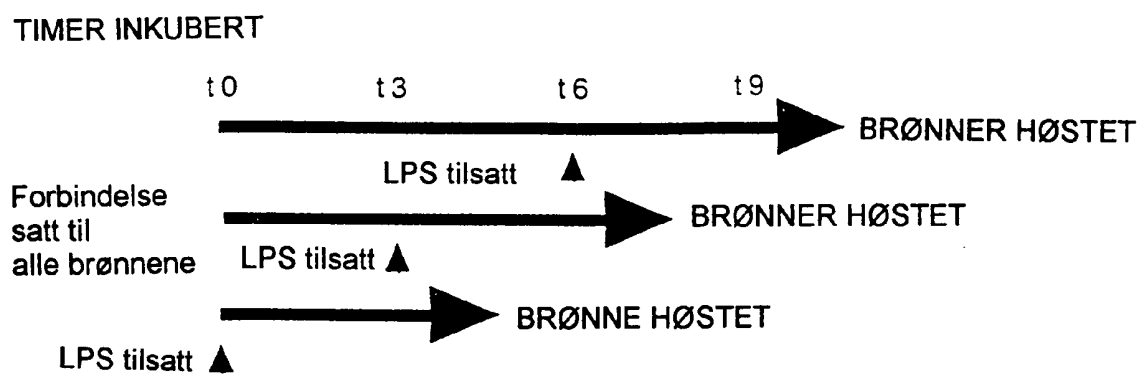
15. Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1 for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av sepsis ved bolusinjeksjon.

Figur 1

Forbindelse 1 hemmer LPS-fremkaldt TNF i
menneske-fuldblod



Figur 2



Figur 3

Forbindelse 1 opprettholder sin aktivitet bedre enn B531 i humant fullblod

