

NORGE



STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

Utlegningsskrift nr. 124836

Int. Cl. C 07 d 57/38 kl. 12p-7/10

Patentsøknad nr. 1300/70 Inngitt 8.4.1970
Løpedag -
Søknaden alment tilgjengelig fra 10.10.1970
Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 12.6.1972
Prioritet begjært fra: 9.4.-, 26.5.-, 30.5.1969
Japan, nr. 27787/69, 41130/69,
41131/69, 42623/69

Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,
21. 3-chome, Doshomachi, Higashi-ku, Osaka, Japan.

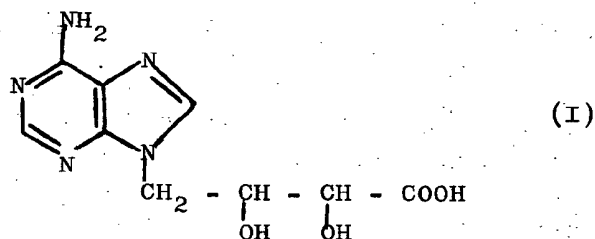
Oppfinnere:

Ichiro Chibata, 13-2, 4-chome Fujishirodai, Suita-shi, Osaka-fu,
Kentaro Okumura, 3-3, 3-chome, Minami-machi, Shinohara, Nada-ku,
Hygo-ken,
Keiji Koderu, 1-102, No. 10, 1-chome, Shimomae, Toda-shi, Saitama-ken,
Shigeyuki Takeyama, Yamato-machi, Kita-adachi-gun, Saitama-ken,
Ichizo Inoue, 645, Hata-cho, Ikeda-shi, Osaka-fu,
Yoshihisa Yamada, 4150-5, Nimyc-cho, Nara-shi, Nara-ken,
Takeshi Adachi, 1070, Kashima-cho, Higashi-yodogawa-ku, Osaka-shi,
Osaka-fu og
Kazuo Matsumoto, 490-6, Tsunoe-cho, Takatsuki-shi, Osaka-fu,
alle: Japan.

Fullmektig: Bryns Patentkontor A/S

Analogifremgangsmåte for fremstilling av nye terapeutisk virksomme
adeninpreparater.

Foreliggende oppfinnelse angår en analogifremgangsmåte for
fremstilling av et nytt derivat av adenin med formelen



samt farmasøytisk akseptable salter av denne forbindelse.

Man har nå isolert et nytt hypocholesterolemisk stoff (i det etterfølgende betegnet "lentinacin") fra en spiselig sopp "Shiitake" (*Lentinus edodes* Singer), som rene krystaller og har funnet at forbindelsens kjemiske struktur er 4-(9-adenyl)-2(R),3(R)-dihydroksysmørsyre (D-erythro-konfigurasjon) ved spektrometri, nedbrytningsstudier og total syntese.

Man fant at lentinacin besto av karbon, hydrogen, oksygen og nitrogen. Man fant at molekylvekten for lentinacin var 253 ved hjelp av masse-spektrometri (hovedtopp ved m/e 253, og mindre toppe ved m/e 236, 218, 208, 178, 174, 148 og 135).

En elementæranalyse av lentinacin resulterte i følgende:

42,78 % karbon, 4,34 % hydrogen og 27,51 % nitrogen.

Man kunne følgelig bestemme lentinacinets empiriske formel som $C_9H_{11}O_4N_5$, noe som krever 42,69 % karbon, 4,39 % hydrogen og 27,67 % nitrogen. Lentinacin var negativt overfor alle fargereaksjoner av den type som opptrer i forbindelse med sukker, steroid og alkaloid. Lentinacin har minst én karboksylisk gruppe, fordi den danner en ester, og lar seg absorbere på en svak anionisk utbytningsharpiks. Ultraviolet absorpsjonsspektrum av lentinacin er helt spesifikt for 9-substituerte adenin-forbindelser (kfr. J.A.C.S. 84, 2148 (1962)).

U.v. maksimum for lentinacin (fri syre)

261,5 mμ (i H_2O)

259,5 mμ (i N-HCl)

262 mμ (i N-NaOH).

Massespektrometri av metylesteren av lentinacin viser en topp ved et massetall på 135, noe som tilsvarer adenin. N.M.R.-spektrumet av natriumsaltet av lentinacin hadde følgende signaler: (100 MH_2 i D_2O) δ (ppm) 8,04 (S, 1H), 8,03 (S, 1H), 4,40-4,10 (m, 4H) som er spesifikke for en forskyvning av protoner ved 2- og 8-stillingene i et 9-substituert adeninskjelett. Ved en syrenedbrytning av lentinacin fikk man fremstilt glycin og 4-amino-2,3-dihydroksysmørsyre. Dannelsen av glycin ved nedbrytning er meget kjent som et karakteristisk trekk ved adeninforbindelser, og er f.eks. angitt i *Biochimica et Biophysica Acta* 58, 585 (1962). Den steriske konfigurasjon av 4-amino-2,3-dihydroksysmørsyren oppnådd fra lentinacin ble bekreftet ved en syntese gjennom 4-amino-4-desoksy-2,3-O-isopropyriden-D-erytroninsyre, som en D-erythro-type (nemlig, 2(R), 3(R)-konfigurasjon).

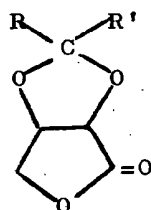
Den kjemiske struktur for lentinacin ble følgelig bekref-
tet som 4-(9-adenyl)-2(R), 3(R)-dehydroksy-smørsyre. Omkrystalli-
sert lentinacin fra varmt vann, smelter ved 261 - 263°C under de-
komponering. Hemihydratet av natriumsaltet er fargeløse små blader
som dekomponerer ved 266 - 268°C ($\alpha_D^{20} = +45,5^\circ$ (C = 1, i H₂O)).

Den steriske konfigurasjon av lentinacin ble ytterligere
bekreftet som D-erytro-typen ved en total syntese. De fysiske og
kjemiske egenskaper for syntetisert lentinacin falt fullstendig
sammen med de tilsvarende egenskaper for naturlig lentinacin. Videre
kunne man påvise at syntetisk lentinacin hadde en bemerkelsesverdig
hypocholesterolemisk effekt av samme type som man fant i naturlig
lentinacin.

Lentinacin ble isolert ved å ekstrahere pulverisert
Lentinus edodes Singer med en vandig oppløsning inneholdende ca. 70 %
av en vanlig lavere alkanol, såsom metanol, etanol, etc., hvorefter
man fjerner uløselige stoffer fra ekstrakten, adsorberer, hvis det
er nødvendig, hypocholesterolemisk del på en kationutbytningsharpiks,
såsom (Dowex 50W, Amberlite IR-120 (H⁺-form)), for derved å fjerne
ikke-kationiske stoffer som ikke lar seg adsorbere på nevnte harpiks,
hvorefter man eluerer den adsorberte hypocholesterolemiske del med
en vandig ammoniakoppløsning, adsorberer de sure ingredienser i
eluatet på en svak anionisk utbytningsharpiks, f.eks. (Amberlite IR-
45 (Cl⁻-form)), eluerer den effektive del ut fra nevnte harpiks med
en flyktig syre, såsom eddiksyre, og fraksjonerer eluatet kromato-
grafisk på en kationutbytningsharpiks såsom Amberlite CG-120, hvor-
ved man kan oppsamle den hypocholesterolemiske fraksjon som viser
et absorpsjonsmaksimum på ca. 262 mμ, hvorefter man kan innvinne
krystallinsk lentinacin fra denne fraksjon etter avsalting på en
ioneutbytningsharpiks.

En foretrukken ekstraksjonsmåte er angitt i eksempel 1.

Ifølge en utførelse av foreliggende oppfinnelse, kan for-
bindelsen (I) fremstilles syntetisk ved å omsette et acetal eller
ketal av 2,3-dihydroksy-erytronolakton med formelen:

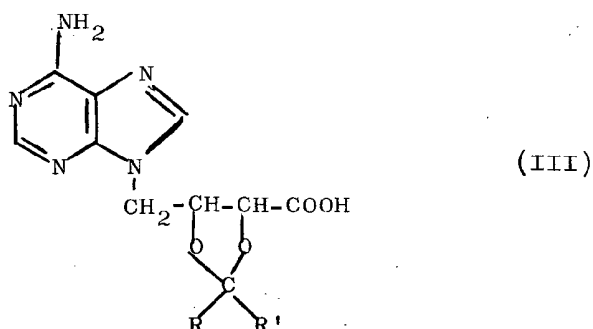


(II)

124836

4

hvor $\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{R}' \end{array}$ er den gjenværende del av nevnte acetal eller ketal, med et metallsalt av adenin i dens 9-stilling, hvorved man får det tilsvarende derivat, nemlig 4-(9-adenyl)-2,3-dihydroksy-smørsyre med formelen



hvor $\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{R}' \end{array}$ har samme betydning som angitt ovenfor, hvorefter forbindelsen (III) hydrolyseres til forbindelsen med formel (I).

Som metallsaltet av adenin, er det foretrukket å anvende alkalimetallsalter såsom natriumsalt, litiumsalt, kaliumsalt, etc., som kan fremstilles på vanlig måte, f.eks. ved å omsette adenin med natriumhydrid, metallisk natrium, natriumhydroksyd, natriumamid, litiumamid, kaliumkarbonat, kaliumhydroksyd etc., i et egnet oppløsningsmiddel ved romtemperatur eller under svak oppvarming. Foretrukne eksempler på den residuale del av ovennevnte acetal eller ketal, er etyliden, isopropyliden og benzylidenradikaler.

Kondensasjonsreaksjonen mellom metallsaltet av adeninen og laktonet (II) bør fortrinnsvis utføres under oppvarming, hvorved man får fremstilt det tilsvarende metallsalt av forbindelsen med formel (III). Dette metallsalt kan lett omdannes til den tilsvarende frie syre på vanlig måte, f.eks. ved en nøytralisasjon eller en behandling med en ioneutbytningsharpiks. Som oppløsningsmiddel for dannelsen av ovennevnte metallsalt og den etterfølgende kondensasjon, kan man anvende dimetylformamid, dimetylsulfoksyd, dimetylacetamid, eller blandinger av disse med pyridin eller lignende.

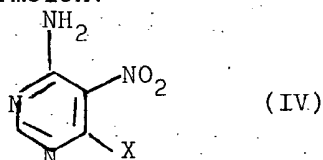
Den intermediære forbindelse (III) eller dets metallsalt kan så hydrolyseres for å eliminere den beskyttende $\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{R}' \end{array}$ -gruppe for 2,3-dihydroksygruppene, etter en separasjon fra R' -reaksjonsblandingen eller uten en separasjon. Nevnte hydrolyse kan utføres

124836

på vanlig måte, f. eks. ved syrehydrolyse, ved f. eks. at man tilsetter en fortynnet mineralsyre, såsom saltsyre, svovelsyre etc., ved romtemperatur eller ved en forhøyet temperatur.

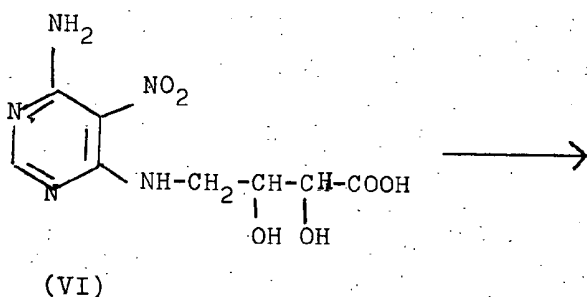
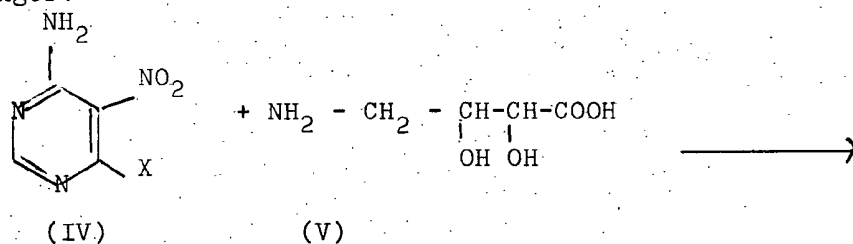
Den resulterende 4-(9-adenyl)-2,3-dihydroksy-smørsyre kan isoleres fra reaksjonsblandingen på vanlig måte, f. eks. ved å absorbere det uorganiske salt og det gjenværende uomsatte adenin på ioneutbytningsharpiks.

Ifølge en annen utførelse av foreliggende oppfinnelse kan forbindelsen (I) fremstilles ved å omsette 4-halo-5-nitro-6-aminopyrimidin med formelen:



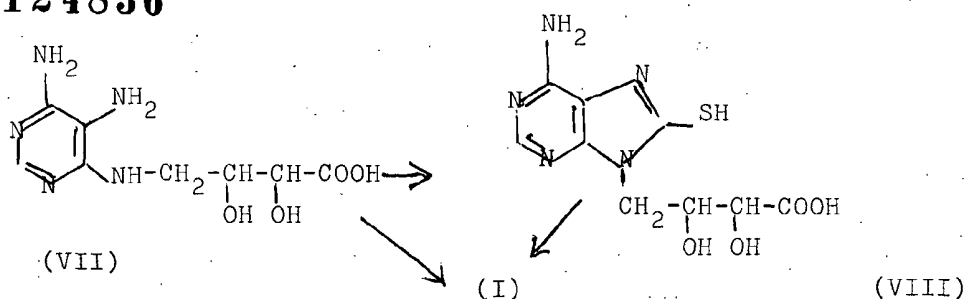
hvor X er et halogenatom såsom klor, brom eller fluor, med 4-amino-2,3-dihydroksy-smørsyre (V), hvorved man får 4-[(6-amino-5-nitro-4-pyrimidyl)-aminol]-2,3-dihydroksy-smørsyre (VI), hvorefter dette reduseres for å omdanne nitrogengruppen til en aminogruppe, hvorefter den resulterende 4-[(5,6-diamino-4-pyrimidyl)-aminol]-2,3-dihydroksy-smørsyre (VII) underkastes en cycliseringsreaksjon.

De ovennevnte reaksjoner kan illustreres ved følgende ligninger:



124836

6



hvor X har samme betydning som angitt ovenfor.

Den første kondensasjonsreaksjon mellom forbindelsene (IV) og (V) utføres fortrinnsvis i et egnet oppløsningsmiddel, såsom vann, tetrahydrofuran, aceton, dioksan eller blandinger av disse i nærvær av en base, såsom natriumbikarbonat, natriumkarbonat eller kaliumkarbonat. Det er foretrukket å utføre reaksjonen ved romtemperatur eller ved en svakt forhøyet temperatur.

Den fremstilte forbindelse (VI) kan så reduseres til forbindelse (VII) på vanlig måte, for å omdanne nitrogruppen til en aminogruppe. Den mest egnede fremgangsmåte for dette formål er en katalytisk reduksjon ved å anvende palladium-karbon, Raney-nikkel eller lignende i et oppløsningsmiddel, såsom vann, metanol eller etanol. Alle disse fremgangsmåter kan anvendes på forbindelse (VI) enten den er i form av en fri syre eller i form av et salt, såsom natriumsaltet eller kaliumsaltet. Reaksjonen kan utføres ved romtemperatur, enten ved atmosfærisk trykk eller ved forhøyet trykk. Alternativt kan reduksjonen av forbindelse (VI) utføres kjemisk, f. eks. utføres ved å anvende et svovelholdig reduksjonsmiddel, f. eks. tiosulfatsalter.

Den således fremstilte 4-[(5,6-diamino-4-pyrimidyl)-amino]-2,3-dihydroksey-smørsyre (VII) kan så anvendes som utgangsförbindelse for den avsluttende cykliseringsreaksjon med eller uten isolering fra reaksjonsblandingen. Denne cyklisering kan utføres på to måter, nemlig: 1) ved en omsetning med et tiokarbonatderivat, såsom karbon-disulfid, tiourinstoff eller ditiokarbonat, hvorved man får fremstilt 4-(8-merkapto-9-adenyl)-2,3-dihydroksey-smørsyre (VIII) fulgt av en vanlig avsvovlingsreaksjon.

eller

2) ved en omsetning med et derivat av maursyre, såsom vanlig maursyre, formamid, eller en blanding av disse, formamidin, ortoformat, tioformamid etc.

Den første type cyklisering 1) utføres fortrinnsvis i et egnet oppløsningsmiddel, f.eks. dimetylformamid, pyridin, dimetylacetamid etc. og under oppvarmning. Den etterfølgende avsvovlingsreaksjon utføres f.eks. ved å oppvarme mellomproduktet (VIII) med Raney-nikkel i et oppløsningsmiddel såsom vann i et par timer.

Den sistnevnte cykliseringsmetode 2) kan utføres bare ved å oppvarme forbindelsen med maursyre eller noen av de ovenfor nevnte derivater av denne syre, med eller uten anvendelse av et oppløsningsmiddel.

I visse tilfelle får man fremstilt en mindre mengde av den 6-substituerte amino-purin-isomere, men denne kan lett utskilles fra hovedforbindelsen (I) ved kromatografiske metoder, eller ved å anvende forskjellen mellom deres løseligheter i vanlige oppløsningsmidler.

De ovennevnte reaksjoner kan anvendes på de respektive optiske isomere av forbindelsene (II) og (V) uten racemisering. Hvis således 2,3-O-beskyttet-D-erytronolakton og 4-amino-D-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre anvendes som utgangsforbindelsene (II) og (V) henholdsvis, så får man syntetisk fremstilt fullstendig det samme stoff som naturlig lentinacin. Hvis man anvender 2,3-O-beskyttet DL-erytronolakton og 4-amino-DL-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre som utgangsforbindelsene, (II) og (V), så oppnår man en racemisk blanding inneholdende 50 % av samme stoff som naturlig lentinacin.

Den således fremstilte forbindelse (I) kan ytterligere omdannes til stabile og farmasøytisk akseptable salter, såsom natrium, kalium, kalsium, magnesium, aluminium, hvorav alle beholder sin hypocholesterolemiske aktivitet i like høy grad som den frie syre (I).

Kaliumsalt: $C_9H_{10}O_4N_5K \cdot 1/2H_2O$, fargeløse plater,
Sm.p. $261-265^{\circ}C$ (dekomp.), lett løselig i vann, praktisk talt uløselig i etanol eller andre organiske oppløsningsmidler.

Kalsiumsalt: $(C_9H_{10}O_4N_5)_2Ca \cdot H_2O$, fargeløse prizmer,
Sm.p. over $288^{\circ}C$, svakt løselige i vann, praktisk talt uløselige i organiske oppløsningsmidler.

Magnesium-

salt: $(C_9H_{10}O_4N_5)_2Mg \cdot H_2O$, krystallinsk pulver,

124836

Sm.p. over 300°C, svakt løselig i vann, praktisk talt uløselig i organiske oppløsningsmidler.

Den hypocholesterolemiske aktivitet for lentinacin ble fastslått ved farmakologiske eksperimenter å være ca. 20 ganger sterkere enn for Clofibrate (kjemisk navn: etyl-2-paraklorfenoksy-2-metyl-propionat) som hittil har vært kjent som et av de mest effektive hypocholesterolemiske midler. Det følgende er et eksempel på de respektive forbindelsers hypocholesterolemiske og hypotriglyceridemiske aktiviteter.

Eksperiment.

Lentinacin ble i form av natriumsaltet tilført en vanlig diet (innført fra Japan CLEA Company), og hunrotter av Sprague-Dawley-rasen med en vekt på 140 - 160 g, ble holdt på denne diet i 7 døgn (hver testgruppe inneholdt 8 rotter).

Etter den eksperimentelle periode ble det totale innhold av kolesterol og triglycerid i rottens serum bestemt ved Zak-metoden og Van-Handel og Zilversmit-metodene, henholdsvis.

Prosent nedgang i totalinnhold av kolesterol og totale triglycerider i serumet ble beregnet ved følgende formel:

$$\text{Senkning \%} = \left(1 - \frac{\text{Midlere innhold av totalt kolesterol eller totale triglycerider i forsøksgruppen}}{\text{Midlere innhold av total kolesterol eller totale triglycerider i kontrollgruppen}} \right) \times 100$$

De oppnådde resultater er angitt i tabell 1.

Tabell 1

<u>Tilførsel</u>		Prosent senkning med hensyn til totalt serumkolesterol (%)	Prosent senkning i totalt serum triglycerid (%)
Forbindelser i diet(%)			
Lentinacin (Na-salt hemihydrat)	0,01	26	49
"	0,005	20	30
"	0,002	15	21
"	0,001	8	19
Clofibrat	0,2	28	62
"	0,1	21	34
"	0,05	15	31

Videre har det vist seg at den akutte og kroniske toksisitet av lentinacin er ekstremt lav. Det viste seg f.eks. at alle fem mus som oralt eller intravenøst ble administrert 1000 mg/kg lentinacin overlevet i over 14 døgn. 10 rotter som ble administrert lentinacin oralt i mengder på 500 mg/kg pr. døgn overlevet alle i over 1 måned, og syv av 10 rotter som ble oralt administrert lentinacin i mengder på 1000 mg/kg pr. døgn overlevet i over en måned.

Lentinacin og dens farmasøytisk akseptable salter er spesielt fordelaktig for behandling eller for å hindre de hypercholesterolemiske tilstander som følger arteriosklerose, for høyt blodtrykk, hjerteinfarkt, angina pectoris, cerebromalacia eller lignende. De kan brukes i form av orale eller parenterale preparater sammen med et farmakologisk akseptabelt bærestoff. Den foretrukne daglige dose er fra ca. 100 til 300 mg (beregnet i form av den frie syre) for voksne pasienter. Man har ikke kunnet finne noen ugunstige bivirkninger på dette dosenivå.

Eksempel 1.

(1) 1 kg tørkede sopphatter, *Lentinus edodes* Sing. ble pulverisert, hvoretter 5 l 80 % vandig etanol ble tilsatt pulveret. Blandingen ble rørt kraftig ved romtemperatur i 4 timer. Den ble deretter filtrert, og filtratet ført gjennom en kolonne fylt med 0,4 l Amberlite IR-120 (H^+ -form). Etter at kolonnen var vasket inntil oppløsningen ble nøytralt, ble den eluert med 4 % vandig ammoniakkoppløsning, og eluatet konsentrert. Residuet ble oppløst i vann og oppløsningen ført gjennom en kolonne fylt med 0,4 l Amberlite IR-45 (Cl^- -form). Etter å ha vasket kolonnen med 2 l vann, ble den eluert med 2 l 1N-eddiksyre, og eluatet ble konsentrert til 50 ml. Dette konsentrat ble kromatografert på en kolonne (3,6 x 150 cm) Amberlite CG-120 ved 50°C. (Oppløsningsmiddel: Natriumcitratbufferoppløsninger ved pH 3,25 og pH 4,25, strømningshastighet 480 ml/time) og man oppsamlet fraksjonene mellom 6.300 og 7.280 ml. Disse fraksjoner ble adsorbert på Amberlite IR-120 og eluert med vandig ammoniakk. 70 % etanol ble tilsatt det konsentrerte eluat, hvorved man fikk utkrystallisert 0,495 g av hemihydratet av natriumsaltet av lentinacin, nemlig natrium-4-(9-adenyl)-D-erythro-2,3-dihydroksy-smørsyre, hemihydrat, som fargeløse klare plater som dekomponerte ved 266 - 268°C etter gjentatt omkrystallisasjon fra 70 % vandig etanol og tørking over P_2O_5 under redusert trykk ved ca. 45°C).

$$[\alpha]_D^{20} = +45,5^\circ \quad (c = 1, \text{ i } H_2O).$$

124836

Natriumsaltet er løselig i vann, svakt løselig i etanol, uløselig i kloroform, petroleter eller andre vanlige organiske oppløsningsmidler.

(II) Fra ovennevnte natriumsalt ble følgende krystaller fremstilt på vanlig måte.

Den frie syre av lentinacin, smeltepunkt $261-263^{\circ}\text{C}$ (etter omkrystallisasjon fra varmt vann, svakt løselig i vann),
 Metylester av lentinacin, sm.p. $218 - 221^{\circ}\text{C}$, fargeløse nåler (etter omkrystallisasjon fra metanol).

Hydrokloridet av metylesteren av lentinacin:

Smeltepunkt $193 - 196^{\circ}\text{C}$,
 fargeløse nåler (etter omkrystallisasjon fra etanol-aceton).

Eksempel 2.

540 mg adenin ble oppløst i 60 ml dimetylformamid, og 210 mg oljeaktig (62,5 %) natriumhydrid ble tilsatt oppløsningen, og det hele rørt i 2 timer ved 70°C . 700 mg 2,3-O-isopropyliden-D-erytronolakton ble tilsatt blandingen porsjonsvis, og det hele rørt ved $140 \pm 5^{\circ}\text{C}$ i 15 timer. Deretter ble dimetylformamid fjernet fra blandingen ved fordampning under redusert trykk, hvorpå 10 ml 10 % saltsyre ble tilsatt residuet, og hele blandingen ble oppvarmet til $60 - 80^{\circ}\text{C}$ i løpet av 30 minutter. Etter konsentrasjon av blandingen under redusert trykk, ble 20 ml vann tilsatt og det hele nøytralisert med 5 % vandig ammoniakk. Oppløsningen ble så ført gjennom en kolonne av 50 ml Amberlite IR-120 (H^{+} -form), og kolonnen ble eluert med 5 % vandig ammoniakk. Oppløsningsmidlet ble fjernet fra eluatet ved fordampning under redusert trykk, og en mindre mengde vann ble tilsatt residuet, og det gjenværende uløselige adenin ble frafiltrert. En mindre mengde natriumbikarbonat ble tilsatt filtratet, hvorefter en mindre mengde etanol ble tilsatt for å utkrystallisere urent natrium 4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksy-butytrat. Etter tørking under oppvarmning og under redusert trykk, fikk man 470 mg av et svakt gulbrunt krystallinsk stoff som dekomponerte ved $225 - 229^{\circ}\text{C}$. Krystallene ble renset til fargeløse prizmer som dekomponerte ved $266 - 268^{\circ}\text{C}$ etter gjentatte omkrystallisasjoner fra 80 %'s vandig etanol.

124836

Eksempel 3.

En blanding av 8,1 g adenin, 2,54 g oljeaktig (62,5 %) natriumhydrid og 250 ml dimetylformamid ble oppvarmet ved 80 - 85°C i 1,5 time. 7,9 g 2,3-O-isopropyriden-D-erytronolakton ble tilsatt, og blandingen oppvarmet under røring ved 140°C $\pm$ 3°C i 12 timer. Etter fordampning av oppløsningsmidlet, ble residuet oppløst i 40 ml vann, og de gjenværende uløselige stoffer frafiltrert. Filtratet ble behandlet med Amberlite IR-120 (H⁺-form) som beskrevet i eksempel 2, og eluatet konsentrert for derved å få utkrystallisert 4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-isopropyriden-dioksy-smørsyre, som dekomponerer ved 170 - 175°C.

Krystallene ble oppløst i en fortynnet, vandig oppløsning av natriumbikarbonat, og denne oppløsning ble så avfarget, så nøytralisert med 3 % maursyre, hvorved man fikk utfelt 2,0 g av rensede fargeløse prizmer av syren, som dekomponerte ved 222 - 224°C.

IR. nujol, 3400, 3320, 3180, 1680, 1620, 1230, 1210,
maks. 1170, 1070 cm⁻¹,

U.V. maks., 263 m μ (i vann),

N.M.R., (D₂O, NaOD),

τ = 1,89 (s, 1H), 1,95 (s, 1H), 5,70 (q, 2H), 5,15 (m, 2H),
8,40 (s, 2H), 5,15 (m, 2H), 8,40 (s, 3H), 8,65 (s, 3H).

100 mg av krystallene ble oppvarmet med 1 ml 10 % saltsyre ved 60 - 70°C i 30 minutter. Blandingens pH ble justert til 3,5 med 10 % natriumhydroksyd, og de resulterende krystaller ble oppsamlet ved filtrering. Krystallene ble oppløst i en vandig oppløsning av natriumbikarbonat og tilstrekkelige mengder etanol ble tilsatt for å utkrystallisere natrium-4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksy-butyrat, 1/2-hydrat.

Sm.p. (dekomp.) 263 - 265°C. Utbytte: 89 mg.

Eksempel 4.

2,2 g adenin ble suspendert i 65 ml dimetylformamid, hvorefter 375 mg natriumhydrid ble tilsatt til suspensjonen. Etter røring ved 60°C i 45 minutter, ble 2,16 g 2,3-O-etyliden-D-erytronolakton tilsatt suspensjonen. Reaksjonsblandingen ble så kokt under tilbaketrekning i 8 timer i en atmosfære av nitrogen. Den ble så filtrert og dimetylformamidet fordampet fra filtratet under redusert trykk. En mindre mengde vann ble tilsatt residuet, og blandingen hentsatt over natten i et kjøleskap. Den ble så filtrert, og filtratet ført gjennom en kolonne Dowex 50W. Kolonnen ble eluert med vandig ammoniak, og oppløsningsmidlet fordampet fra eluatet under redusert

trykk, hvorved man fikk urent 4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-etyliden-dioksy-smørsyre. Produktet ble oppløst i 15 ml vann, og 1/3 av oppløsningen ble renset ved tynnsjikt-skromatografi på silisiumdioksyd-gel (oppløsningsmiddel: Eddiksyre:butanol:vann=1:4:5) hvorved man fikk fargeløse prizmer som dekomponerte ved 241 - 243°C, utbytte 200 mg.

Krystallene ble oppvarmet med 5 ml 20 % svovelsyre på et vannbad, nøytralisert med vandig ammoniakk og konsentrert under redusert trykk. Konsentratet ble hensatt i et isbad, hvorved man fikk utfelt krystaller av 4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre.

Sm.p. 252 - 254°C (dekomp.)

Ytterligere krystallisasjon fra vann gir en renset prøve med et dekomponeringspunkt på 261 - 263°C.

Den gjenværende del av den vandige oppløsning av den urene 4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-etylidendioksy-smørsyre ble tilsatt 20 ml 20 %'s svovelsyre, og blandingen ble kokt i 2 timer. Den ble så nøytralisert med vandig ammoniakk og ført gjennom en kolonne av Dowex 50W. Kolonnen ble eluert med vandige ammoniakk og eluatet konsentrert under redusert trykk. Residuet ble tilsatt en vandig oppløsning av natriumbikarbonat inntil uklarheten forsvant. Blandingen ble så avfarget, filtrert, hvoretter filtratet ble konsentrert. En passende mengde etanol ble tilsatt i varm tilstand. Etter avkjøling ble de resulterende krystaller lufttørket til 650 mg natrium-4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksy-butytrat, 2, 5 H₂O som fargeløse tynne flak. Etter tørking under redusert trykk ved ca. 45°C kunne krystallene identifiseres med hemihydratet av lentinacinnatriumsalt.

Eksempel 5.

393 g oljeaktig (64 %) natriumhydrid og 1,48 g adenin ble suspendert i 45 ml dimetylformamid, og suspensjonen ble rørt ved 45 - 60°C i en time. 2,06 g 2,3-O-benzyliden-D-erytronolakton ble tilsatt blandingen i en atmosfære med nitrogen ved 140 - 150°C i 12 timer. Dimetylformamid ble fjernet ved fordampning, og residuet oppløst i 10 ml vann. Oppløsningen ble hensatt over natten i en isboks og så filtrert. Filtratet ble konsentrert til tørrhet under redusert trykk, og residuets pH ble justert til 4 med 0,5-normal maursyre. Bunnfallet ble frafiltrert, og filtrert lyofilisert, hvorved man fikk 3,0 g uren 4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-benzyliden-smørsyre. Råproduktet ble renset til krystaller som dekomponerte ved 191-193°C ved cellulosepulver-kromatografi fulgt av omkrystallisasjon fra vandig etanol. 2 g av ovennevnte råprodukt ble oppvarmet med 10 ml

5 % saltsyre til 50°C i en time, og blandingen ekstrahert med etylacetat for å fjerne benzaldehyd. Deretter ble blandingen ført gjennom en kolonne av Amberlite IR-120, og kolonnen eluert med vandig ammoniakk. Eluatet ble konsentrert under redusert trykk, og residuet justert til pH 4 med maursyre. Blandingen ble hensatt over natten, hvorved man fikk 0,8 g 4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksey-smørsyre som urene krystaller. Krystallene ble rensert som angitt i eksempel 4, hvorved man fikk 480 mg krystaller av natriumsaltet/hemihydratet, som dekomponerte ved 244 - 246°C. Etter en ytterligere rensning, slik som beskrevet i eksempel 1, fikk man krystaller med et dekomponeringspunkt på 266 - 268°C.

Eksempel 6.

(I) En blanding av 2,88 g 4-klor-5-nitro-6-amino-pyrimidin, 1,49 g 4-amino-D-erytro-2,3-dihydroksey-smørsyre, 3,6 g natriumbikarbonat, 80 ml vann og 40 ml tetrahydrofuran ble rystet i 11 timer ved romtemperatur. Deretter ble blandingen tilsatt 100 ml vann, og det hele ekstrahert med kloroform for å fjerne gjenværende 4-klor-5-nitro-6-amino-pyrimidin. Det vandige lag ble justert til pH 3,5-4,0 med 10 % saltsyre, og de utfelte krystaller oppsamlet ved filtrering. Krystallene ble tørket, hvorved man fikk 2,58 g 4- α -(6-amino-5-nitro-4-pyrimidyl)-amino-7-D-erytro-2,3-dihydroksey-smørsyre som et svakt gulaktig pulver som dekomponerte ved 215 - 218°C. Ytterligere krystallisasjon fra vann, ga blekt gule prizmer som dekomponerte ved 220 - 223°C.

I.R. nujol , 3420, 3250, 3130, 2300, 1680 (sh),
maks. 1600, 1520, 1235, 1146, 1080 cm⁻¹,

U.V. maks. nøytral og alkalisk tilstand, 346 m μ ,
sur tilstand, 342, 296, 242 m μ ,

Relativ rotasjon: $[\alpha]_D^{23} = + 67^\circ$ (C = 1, 1N - HCl),

$[\alpha]_D^{23} = + 32^\circ$ (C = 1, 1N - NaOH).

Analyse, beregnet for C₈H₁₁O₆N₅ :

C 35,17, H 4,06, N 25,64.

Funnet: C 34,84, H 4,18, N, 26,02.

(II-1) En blanding av 500 mg 4- α -(6-amino-5-nitro-4-pyridyl)-amino-7-D-erytro-2,3-dihydroksey-smørsyre, 200 ml vann og 200 mg 10 % pafadium-karbon rystes i 45 minutter under et hydrogentrykk på ca. 2 kg/cm². Katalysatoren ble så frafiltrert, hvorefter filtratet ble konsentrert til tørrhet under redusert trykk på et vannbad hvis temperatur

124836

ble holdt på ca. 60°C eller noe under dette. Man fikk på denne måten fremstilt 4- -- (5,6-diamino-4-pyrimidyl)-amino-7-D-erytro-2,3-dihydroksey-smørsyre, kvantitativt som svakt brune nåler. Da krystallene ble omkrystallisert fra vann, ble smeltepunktet hevet til 230 - 235°C med dekomponering.

I.R. nujol, 3300, 2320, 2000 - 1800, 1675,
maks. 1600, 1560, 1500, 1130, 1040, 940 cm^{-1} ,

U.V. maks., 281,5 m μ (pH 6,42), 280 m μ (pH 12,25), 289 m μ
(pH 1,31).

Analyse beregnet for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$:

C 39,50, H 5,39, N 28,80.

Funnet:

C 39,17, H 5,56, N, 28,53.

De blekt brune nålene ble oppløst i en blanding av 30 ml dimetylformamid og 7 ml karbondisulfid, og blandingen holdt på 80°C i 5 timer. Den ble deretter konsentrert under redusert trykk og residuet helt over i eter, hvorved man fikk fremstilt 410 mg 4-(8-merkapto-9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksey-smørsyre som et brunt pulver. Dette pulver ble oppløst i 25 ml vann og avfarget. Oppløsningen ble justert til pH 7,0 med vandig natriumhydroksyd, hvorefter 2 ml W-7.Raney-nikkel ble tilsatt. Blandingen ble kokt under tilbakeløp i 2 timer, avkjølt, filtrert, hvorefter filtratet ble konsentrert under redusert trykk, hvorved man fikk 135 mg svakt gulaktige hvite krystaller. Disse ble omkrystallisert fra vann, og de resulterende krystaller tørket under redusert trykk ved ca. 45°C, hvorved man fikk fargeløse plater av natrium-4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksybutyrat.1/2 hydrat, som dekomponerte ved 255 - 258°C. Ytterligere krystallisasjon fra 70 % vandig etanol gir en renset prøve som dekomponerer ved 266 - 268°C. I.R. og U.V.-spektra for disse krystallene er identiske med de tilsvarende resultater for produktet fra eksempel 1.(II-2) 273 mg 4- -- (6-amino-5-nitro-4-pyridyl)-amino-7-D-erytro-2,3-dihydroksey-smørsyre ble oppløst i en blanding av 20 ml 1 % saltsyre og 20 ml metanol. 270 mg 10 % palladium-karbon ble tilsatt oppløsningen og blandingen rystet i 2 timer under begynnende hydrogentrykk på ca. 2,5 kg/cm². Katalysatoren ble frafiltrert, og filtratet konsentrert under redusert trykk under oppvarming til en temperatur som ikke oversteg 60°C. 4 ml maursyre ble tilsatt den resulterende 4- -- (5,6-diamino-4-pyrimidyl)-amino-7-D-erytro-2,3-

dihydroksy-smørsyre, og blandingen oppvarmes til ca. 60°C , inntil man fikk en oppløsning. Denne ble konsentrert under redusert trykk, og 4 ml formamid ble tilsatt. Blandingen ble oppvarmet til 120°C i en time og ved 160°C i 30 minutter. Etter avkjølingen ble blandingen helt over i 30 ml vann og filtrert. Filtratet ble ført gjennom en kolonne av Amberlite IR-120 (H^+ -form), og kolonnen eluert med 5 % vandig ammoniakk. Ammoniakkoppløsningen ble konsentrert, og residuet omkrystallisert fra vann, hvorved man oppnådde 70 mg av et gulaktig fast stoff som dekomponerte ved $270 - 280^{\circ}\text{C}$. Dette ble omkrystallisert fra vann, hvorved man fikk 31 mg av rensset 4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre som dekomponerte ved $261 - 263^{\circ}\text{C}$, og som var identisk med naturlig lentinacin.

15 mg av produktet ble oppløst i 1 ml vandig oppløsning inneholdende 7,5 mg natriumbikarbonat, og oppløsningen ble konsentrert til tørrhet under redusert trykk. Residuet ble omkrystallisert fra 80 % vandig etanol, og de resulterende krystaller ble tørket under redusert trykk ved ca. 45°C , hvorved man fikk fine plater av natrium-4-(9-adenyl)-D-erytro-2,3-dihydroksy-butytrat-hemihydrat, som dekomponerte ved $241 - 243^{\circ}\text{C}$ kvantitativt. Ytterligere krystallisasjon fra 70 % etanol gir en rensset prøve med et dekomponeringspunkt på $266 - 268^{\circ}\text{C}$, og som er identisk med produktet fra eksempel 1, som f.eks. kunne påvises ved å sammenligne I.R.- og U.V.-spektra og ved tynnsjikt-kromatografi.

Eksempel 7.

(I) 2,0 g 6-amino-5-nitro-4-klor-pyrimidin ble oppløst i 50 ml aceton, og oppløsningen dråpevis tilsatt 15 ml av en vandig oppløsning inneholdende 1,6 g 4-amino-DL-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre, 0,66 g kaliumhydroksyd og 1,0 g kaliumkarbonat. Blandingen ble rørt ved $40 - 45^{\circ}\text{C}$ i 3 timer. Deretter ble aceton fjernet fra blandingen ved fordampning, og blandingen ble så filtrert. Filtratet ble surgjort med maursyre, og de resulterende krystaller oppsamlet ved filtrering, hvorved man fikk 1,86 g 4- -- (6-amino-5-nitro-4-pyrimidyl)-amino-7-DL-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre, som dekomponerte ved $195 - 197^{\circ}\text{C}$.

I.R. nujol, 3400, 3280, 3100, 1650, 1610,
maks. 1520, 1460, 1380, 1230 cm^{-1} ,

U.V. maks., 346 m μ i H_2O ,
342 m μ i H^+ ,
346 m μ i OH^- .

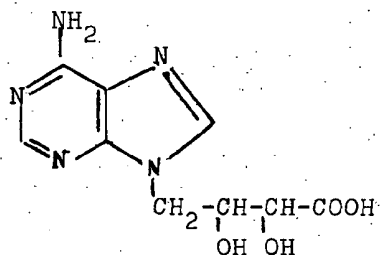
124836

(II) 1,8 g 4-[(6-amino-5-nitro-4-pyrimidyl)-aminol]-DL-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre ble oppløst i 20 ml vandig oppløsning inneholdende 0,37 g kaliumhydroksyd. 1 ml Raney-nikkel ble tilsatt oppløsningen, og denne ble så rystet under et begynnende hydrogentrykk på ca. 4,2 kg/cm². Deretter ble nikkelkatalysatoren fjernet ved filtrering, og filtratet nøytralisert med maursyre. Filtratet ble konsentrert til tørrhet under redusert trykk, og det gjenværende viskøse stoff ble oppløst i vann. Oppløsningen ble ført gjennom en kolonne Dowex 50W (H⁺-form), og kolonnen ble så eluert med vandig ammoniakk. Eluatet ble konsentrert til tørrhet under redusert trykk, hvorved man fikk 700 mg 4-[(5,6-diamino-4-pyrimidyl)-aminol]-DL-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre som et amorft pulver. 15 ml formamid ble tilsatt pulveret og blandingen kokt under tilbakeløp i en nitrogenatmosfære i 30 minutter. Deretter ble formamid fjernet fra blandingen ved fordampning under redusert trykk, og tilstrekkelig etanol ble tilsatt for å frembringe en utkrystallisasjon. Krystallene ble rensset ved tynnsjikt-kromatografi på silisiumdioksydgel (oppløsningsmiddel, eddiksyre, n-butanol:vann = 1:4:5) og en etterfølgende Dowex 50W (H⁺-form)-kromatografi, hvorved man oppnådde 200 mg 4-(9-adenyl)-DL-erytro-2,3-dihydroksy-smørsyre som krystaller. Disse ble ytterligere rensset ved omkrystallisasjon fra vandig etanol, hvorved man fikk rene krystaller som dekomponerte ved 252 - 254°C.

I.R. nujol, 3250, 3180, 3100, 1680,
maks. 1610, 1510, 1460, 1415,
1380, 1220 cm⁻¹.

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktiv 4-(9-adenyl)-2,3-dihydroksy-smørsyre med formelen:

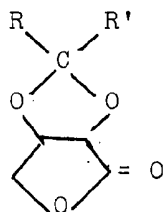


og farmasøytisk akseptable salter derav, k a r a k t e r i s e r t

124836

v e d a t

1) et acetal eller ketal av 2,3-dihydroksy-erytronolakton med formelen:



hvor $\begin{matrix} R \\ R' \end{matrix} > C <$ er en gjenværende del av nevnte acetal eller ketal, omsettes med et metallsalt av adenin i dens 9-stilling for dannelselse av det tilsvarende acetal eller ketal av 4-(9-adenyl)-2,3-dihydroksy-smørsyre, som deretter hydrolyseres, eller

- 2) 4-halogen-5-nitro-6-amino-pyridin omsettes med 4-amino-2,3-dihydroksy-smørsyre for dannelselse av 4-[(6-amino-5-nitro-4-pyrimidyl)-aminol]-2,3-dihydroksy-smørsyre, som reduseres til 4-[(5,6-diamino-4-pyrimidyl)-aminol]-2,3-dihydroksy-smørsyre, hvorefter denne syre omsettes med et tiokarbonat-derivat for dannelselse av 4-(8-merkapt-9-adenyl)-2,3-dihydroksy-smørsyre, som avsvovles på i og for seg kjent måte, eller
- 3) 4-halogen-5-nitro-6-amino-pyrimidin omsettes med 4-amino-2,3-dihydroksy-smørsyre for dannelselse av 4-[(6-amino-5-nitro-4-pyrimidyl)-aminol]-2,3-dihydroksy-smørsyre, denne forbindelse reduseres til 4-[(5,6-diamino-4-pyrimidyl)-aminol]-2,3-dihydroksy-smørsyre, hvorefter denne syre omsettes med maursyre eller et derivat derav, og om ønsket, omdannelse av det erholdte produkt til et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Anførte publikasjoner: -