FI000093210B

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 93210

(45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 03 1995

(51) Kv.lk.5 - Int.cl.5

C 07D 211/46

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 885880

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 20.12.88

(24) Alkupäivä - Löpdag 20.12.88

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 22.06.89

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 30.11.94

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

21.12.87 US 136219 P 26.09.88 US 249144 P

(71) Hakija - Sökande

1. **Monsanto Company**, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Mo. 63167, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Dwek, Raymond Allen**, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, United Kingdom, (GB)
2. **Fleet, George William John**, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, United Kingdom, (GB)
3. **Rademacher, Thomas William**, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, United Kingdom, (GB)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Kolster Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä virusvastaisen yhdisteen valmistamiseksi**
**Förfarande för framställning av en virusmotverkande förening**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 947 (C 07D 211/46), WO 87/03903 (C 12N 5/00),
Chemical Abstracts vol. 106, (1987), 50030n, vol. 103, (1985), 123741v,
vol. 103, (1985), 215684g, vol. 104, (1986), 130190p

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee ryhmää viisi tai kuusi rengasatomia sisältäviä heterosyklisiä yhdisteitä, joissa on renkaassa typpiatomi ja 1-3 hydroksyylisubstituenttia ja jotka ovat tehokkaita ihmisen immuunikato-virusta inhiboivia aineita.

Uppfinningen avser en grupp av 5- och 6-komponentiga, heterocykliska föreningar, vilka har en kväveatom och 2-3 hydroxylsubstituenter i ringen och bildar effektiva, hämmande medel mot virus som förorsakar immunbrist hos människan.

Menetelmä virusvastuisen yhdisteen valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää virusvastaisen yhdisteen valmistamiseksi, joka on

(a) 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fukonolaktaami,

(b) 1,5-dideoksi-1,5-imino-(N-metyyli)-L-fusitoli, tai

(c) 1,5-dideoksi-1,5-imino-(N-ω-metyylikaproaatti)-L-fusitoli,

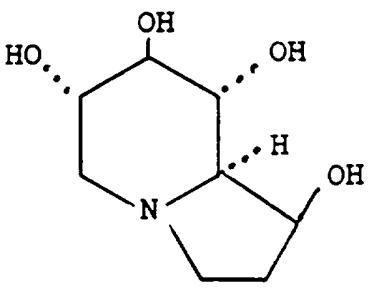
tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävän suolajohdannaisen valmistamiseksi. Yhdisteet ovat kuusi rengasatomia sisältäviä heterosyklisiä yhdisteitä, joilla on mahdollisesti käyttöä immuunikato-oireiston (AIDSin) hoidossa.

Immuunikato-oireisto, joka vain muutamia vuosia sitten oli lääketieteellinen erikoisuus, on nyt vakava sairaus. Tämän seurauksena tällä hetkellä ponnistellaan suuresti lääkkeiden ja rokotteiden kehittämiseksi AIDSia vastaan. AIDS-virusta, joka identifioitiin ensimmäisen kerran vuonna 1983, ovat kuvanneet muutamat tutkijat. Se on kolmas tunnettu T-lymfosyyttivirus (HTLV-III), ja sillä on kyky monistua immuunijärjestelmän soluissa ja johtaa siten $T4^+$T-solujen ($CD^+$-solujen) laajaan tuhoutumiseen. Katso esimerkiksi Gallo et al., Science 224 (1984) 500-503 ja Popovic et al., ibid. (1984) 497-500. Tämä retrovirus on tunnettu nimillä lymfadenopatiaan liittyvä virus (LAV) ja AIDSiin liittyvä virus (ARV) sekä aivan viime aikoina ihmisen immuunivajaus-virus (HIV). On kuvattu kahta eri AIDS-virusta, HIV-1 ja HIV-2. HIV-1 on virus, jonka alunperin identifioivat vuonna 1983 Montagnier et al. Pariisin Pasteur-instituutissa (Ann. Virol. Inst. Pasteur 135 E (1984) 119-134), kun taas HIV-2:n eristivät myöhemmin, vuonna 1986, Montagnier et al. (Nature 326 (1987) 662). Tässä yhteydessä HIV:llä tarkoitetaan näitä viruksia yleisessä mielessä.

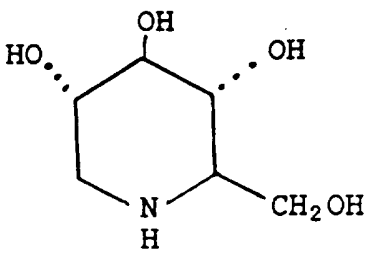
Vaikka AIDSin molekyylibiologiaa aletaan ymmärtää ja saada määritellyksi, on edelleen olemassa tarve saada paljon lisää tietoa tästä sairaudesta. Samalla on tutkittu lukuisia lähestymistapoja etsittäessä mahdollisia AIDSin vastaisia lääkkeitä ja rokotteita. AIDS-rokotteen kehittämistä estää se, ettei ymmärretä HIV:ltä suojaavan immuniteetin mekanismeja, viruksen geneettisen vaihtelun suuruus ja tehokkaiden HIV-infektioeläinmallien puute. Katso esimerkiksi Koff ja Hoth, Science 241 (1988) 426-432.

Ensimmäinen lääke, jonka FDA (U.S. Food and Drug Administration) on hyväksynyt AIDS:in hoitoon, on tsidovudiini, joka tunnetaan paremmin aiemmalla nimellä atsidotymidiini (AZT). Kemiallisesti tämä lääke on 3'-atsido-3'-deoksitymidiini. Tämä lääke valittiin alunperin mahdolliseksi aseeksi AIDSia vastaan, koska sen osoitettiin estävän viruksen monistumista in vitro. Tällaiset in vitro-testit ovat hyödyllisiä ja käytännöllisesti katsoen ainoa käytännöllinen menetelmä mahdollisten AIDSin vastaisten lääkkeiden seulomiseksi ja testaamiseksi alkuvaiheessa. AZT:n vakavana heikkoutena ovat kuitenkin sen toksiset sivuvaikutukset. Niinpä edelleen etsitään parempia AIDSin vastaisia lääkkeitä.

Viime aikoina on tutkittu tiettyjen glykosidaasi-inhibiittoreiden aktiivisuutta AIDS-virusta vastaan. Kolme tällaista mahdollisiksi AIDS-lääkkeiksi ehdotettua yhdistettä ovat kastanospermiini, deoksinojirimysiini (DNJ) ja dihydroksimetyylidihydroksipyrrolidiini (DMDP). Katso esimerkiksi Sunkara et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 148(1) (1987) 206-210; Tyms et al., Lancet, 31. lokakuuta 1987, 1025-1026.

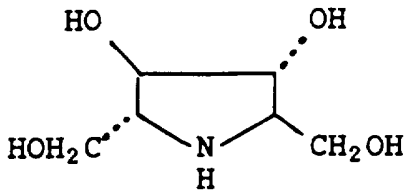



Kastanospermiini




Deoksinojirimysiini (DNJ)

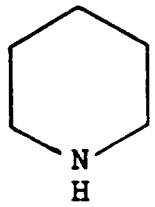
Dihydroksimetyyli-
dihydroksipyrrolidiini
(DMDP)




Kastanospermiinin, joka on australialaisen kastan apuun siemenistä eristetty alkaloidi, on osoitettu häiritsevän HIV-virionien normaalia glykosylaatiota ja muuttavan siten vaippaglykoproteiinia ja estävän HIV:n pääsyn kohdesoluihin. On kuitenkin havaittu vain vaatimaton virionien infektoivuuden väheneminen.

Kansainvälisessä PCT-hakemuksessa WO 87/03903, joka on julkaistu 2. heinäkuuta 1987, ilmoitetaan, että myös deoksinojirimysiinin (DNJ:n) N-metyylijohdannaisella on HIV:n vastainen vaikutus, joka näennäisesti perustuu sen glukosidaasi I:ä inhiboivaan aktiivisuuteen. Fleet et al. (FEBS Lett., painossa 1988) ovat kuitenkin myöhemmin osoittaneet, etteivät kaikki glukosidaasi I-inhibiittorit ole tehokkaita HIV:n estäjiä. Niinpä joku muu mekanismi saattaa saada aikaan HIV:tä inhiboivan vaikutuksen.

Tämän keksinnön mukaisesti on havaittu, että joukolla kuusi rengasatomia sisältäviä heterosyklisiä yhdisteitä, joilla on renkaassa typpiatomi ja 3 hydroksyylisubstituenttia, on ihmisen immuunikato-viruksen (HIV:n) vastainen vaikutus. Keksinnön mukaiselle menetelmälle näiden yhdisteiden valmistamiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään. Valmisteltavilla yhdisteillä on mahdollisesti käyttöä immuunikato-oireiston (AIDSin) hoidossa. Keksinnön yhteydessä käytettäviä vaikuttavia yhdisteitä voidaan kuvata rakenteellisesti piperidiinin johdannaisiksi.



Piperidiini

Vaihtoehtoisesti niitä voidaan kuvata kemiallisia yleisnimiä käyttäen sokerijohdannaisiksi, jolloin niitä pidetään pyranoosien jäljittelijöinä, joissa on renkaassa typpiatomi happiatomin tilalla.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen aktiivisten yhdisteiden teho on osoitettu positiivisella HIV:n replikaatiota inhiboivalla aktiivisuudella in vitro. Tämän koejärjestelmän mukaisestikäytettiin ihmisen T-soluja, jotka ovat herkkiä HIV-infektiolle, määritettäessä visuaalisesti tutkittavien yhdisteiden suhteellinen HIV:n infektoimien solujen replikaatiota inhiboiva vaikutus. Koska erilaisilla analogisilla yhdisteillä on saatu hyvin vaihtelevia tuloksia, kuten jäljempänä kuvataan, on ilmeistä, ettei jonkin tietyn yhdisteen teho HIV-inhibiittorina ole ennalta ennustettavissa. Tähän mennessä on ehdotettu erilaisia aiempien HIV-inhibiittoreiden vaikutusta koskevia teorioita. Muutamissa laboratorioissa tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että vaippaglykoproteiinin, gp120:n, ja CD4-antigeenin jonkin osan välinen vuorovaikutus liittyy HIV:n tunnistamiseen useimmissa sen infektoimissa soluissa ja HIV:n sitoutumiseen mainittuihin soluihin. Niin eräässä raportissa, jossa verrataan glykosidaasi-inhibiittori deoksinojirimysiinin (DNJ:n) positiivista vaikutusta HIV:n infektoivuuteen mannosidaasi I-inhibiittori deoksimannojirimysiinin (DMJ:n), joka on DNJ:n 2-epimeeri, vaikuttamattomuuteen, ehdotetaan, että gp120:n tai sen esiasteen häiriintynyt hiilihydraattirakenne, jonka aiheuttaa N-kytkeytyneen oligosakkaridin pilkkoutumisreitin salpaaminen, saa

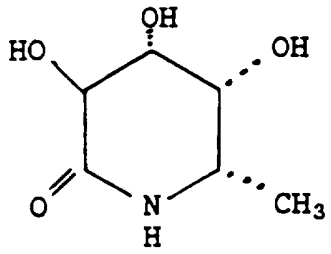
aikaan vaikutuksen (Gruters et al., Nature 330 (1987) 74-77).

Tutkittavan yhdisteen ennalta arvaamattoman HIV:n vastaisen vaikutuksen osoittavat muutamat tutkimukset, joissa on vertailtu rakenteellisesti analogisia sokerijohdannaisia. Esimerkkinä mainittakoon, että vaikka α-glukosidaasi I-inhibiittori kastanospermiinin tunnettu sytopaattista vaikutusta (CPE) estävä vaikutus on varmistettu, ei sen epimeerin, L-1,6-diepikastanospermiinin eikä kastanospermiinin stereoisomeerin, L-6-epikastanospermiinin, ole havaittu olevan inhiboivia. Katso Fleet et al., FEBS Lett., painossa 1988.

Samoin, vaikka 1,4-dideoksi-1,4-iminoarabinitolin molemmat enantiomeerit ovat tunnettuja glukosidaasi-inhibiittoreita (Fleet et al., Tetrahedron Lett. 26 (1985) 3127-3130; Fleet et al., Chemistry Lett. (1986) 1051-1054), on L-enantiomeerilla voimakas HIV:tä inhiboiva aktiivisuus, kun taas D-enantiomeerilla on hyvin vähän vaikutusta HIV:n replikaatioon. Kummankin enantiomeerin kohdalla N-metylaatio heikensi anti-HIV-aktiivisuutta sen vahvistumisen sijasta. Glukoosin atsofuranoosianalogilla ja N-bentsyylijohdannaisella ei kummallakaan havaittu olevan vaikutusta CPE:hen. Vastaavasti fagomiinilla, 2-deoksiglukoosinanalogilla, ei myöskään havaittu HIV:ta inhiboivaa vaikutusta, vaikka myös sillä tiedetään olevan α-glukosidaasia inhiboiva vaikutus. Katso Fleet et al., FEBS Lett., painossa 1988.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavien yhdisteiden kemiallisten rakenteiden hahmottamiseksi, on kätevää jakaa nämä yhdisteet muutamaan alaryhmään seuraavasti. Stereoisomeerian osoittamiseksi kiinteät ja katkoviivat osoittavat sidoksia, jotka suuntautuvat ylöspäin ja vastaavasti alaspäin paperin tasosta.

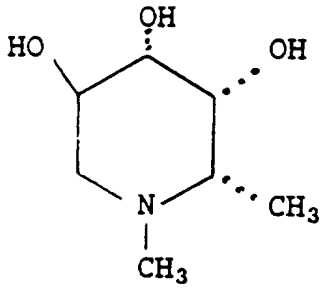
A. 1,5-deoksi-1,5-imino-L-fusitolijohdannaiset



1

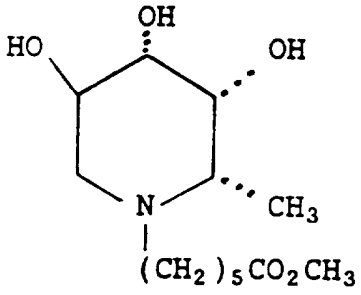
a) 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fukonolaktaami

B. N-substituoidut 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitolijohdannaiset



2

b) 1,5-dideoksi-1,5-imino-(N-metyyli)-L-fusitoli



3

c) 1,5-dideoksi-1,5-imino-(N-ω-metyylikaproaatti)-L-fusitoli.

Tämän keksinnön mukaisesti näitä yhdisteitä voidaan valmistaa seuraavissa esimerkeissä esitettyjä yleisiä orgaanisia syntetisointimenettelytapoja noudattaen.

Esimerkki 1

Yhdiste 1 valmistettiin monivaiheisella sarjalla kaupan olevasta diasetoni-D-aalloosista (1,2:5,6-di-O-isopropyylideeni-α-D-allofuranoosista) seuraavasti:

(a) 3-O-bentsyyli-1,2:5,6-di-O-isopropylideeni-α-D-furanoosi

Natriumhydridi (50 %:inen öljydispersio; 3,19 g, 66,3 mmol) pestiin tislatulla heksaanilla 82 x 15 ml) kuivan typen alla ja suspendoitiin kuivaan THF:ään (75 ml). Suspensioon lisättiin 1 tunnin aikana diasetonialloosi (15,93 g, 61,4 mmol) kuivassa THF:ssä (150 ml). Tämän lisäyksen päätyttyä lisättiin bentsyylibromidi (7,96 ml, 8,4 mmol). Tulokseksi saatua seosta sekoitettiin 3 tuntia, jolloin TLC (etyyliaetaatti-heksaaniseos, 1:1) osoitti, että seos ei sisältänyt lainkaan lähtöainetta (Rf = 0,2) ja sisälsi yhtä tuotetta (Rf = 0,8). Reaktioseokseen lisättiin metanolia (4 ml), se laimennettiin eetterillä (150 ml) ja suodatettiin silikakerroksen läpi, jonka päällä oli piimaata (Celite), ja suodatuskakku pestiin eetterillä (3 x 75 ml). Liuotin poistettiin, ja keltainen kiinteä raakatuote liuotettiin dikloorimetaanin (150 ml). Dikloorimetaaniliuos pestiin vedellä (2 x 150 ml), kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin kiinteätä ainetta. Puhdistus kiteyttämällä tuote uudelleen heksaanista tuotti tulokseksi otsikon mukaista bentsyylieetteriä (20,82 g, 95 %) valkeana kiinteänä aineena.
Sp. = 65 - 66 °C, $[\alpha]_D^{20}$ = +105,6° (c = 0,25, $CHCl_3$:ssa).

(b) 3-O-bentsyyli-1,2-O-isopropylideeni-α-D-allofuranoosi

Edellä valmistettu bentsyylieetteri (20,28 g, 57,94 mmol) liuotettiin 70 %:seen etikkahapon vesiliuokseen (500 ml). Sen annettiin reagoida 15 tuntia, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaani-seos, 1:1) osoitti, että seos ei sisältanyt lainkaan lähtoainetta (Rf = 0,8) ja sisälsi yhtä tuotetta (Rf = 0,2). Haihdutettaessa liuotin pois saatiin

raakatuote keltaisena siirappimaisena aineena. Puhdistus flash-kromatografiapylväässä (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 3:1) tuotti tulokseksi diolia (16,85 g, 94 %) valkeana kiteisenä aineena.

Sp. = 63 - 65 °C. $[\alpha]_D^{20}$ = +119,4° (c = 0,25, $CHCl_3$:ssa).

(c) 3-O-bentsyyli-1,2-O-isopropylideeni-6-O-p-tolueenisulfonyyli-α-D-allofuranoosi

Edellä valmistettu dioli (13,91 g, 44,8 mmol) liuotettiin kuivaan pyridiiniin (200 ml), ja liuokseen lisättiin tosyylikloridia (9,37 g, 49,3 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa kuivan typen alla 15 tuntia, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:1) osoitti, että seos siscilsi reagoimatonta lähtöainetta (Rf = 0,2) ja kahta tuotetta (Rf = 0,6 ja 0,7). Liuotin poistettiin alipaineessa, ja raakatuote liuotettiin dikloorimetaaniin (200 ml), pestiin 100 ml:n erillä M HCl:ä, kylläistä NaCl-liuosta ja kylläistä natriumvetykarbonaattia ja kuivattiin ($Na_2SO_4$). Liuotin poistettiin alipaineessa ja raakatuote puhdistettiin flash-kromatografiapylväässä (etyyliasetaattiheksaaniseos, 1:2), jolloin saatiin 3-O-bentsyyli-1,2-O-isopropylideeni-6-O-p-tolueenisulfonyyli-α-D-allofuranoosia (17,48 g, 84 %) värittömänä öljynä. $[\alpha]_D^{20}$ = +51,4° (c = 0,97, $CHCl_3$:ssa).

(d) 3-O-bentsyyli-6-deoksi-1,2-O-isopropylideeni-α-D-allofuranoosi

Edellä valmistettu monotosylaatti (13,6 g, 29,3 mmol) liuotettiin typen alla kuivaan THF:ään (150 ml). Liuokseen lisättiin 1 M "superhvdridin" THF-lkuosta (73,2 $cm^3$, 73,25 mmol), ja reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 1 tunti, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:1) osoitti, että seos ei sisältänyt lainkaan lähtöainetta (Rf = 0,6) ja sisälsi yhtä tuotetta (Rf = 0,5). Reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla (100 ml), pestiin vedellä (3 x 100 ml) ja kuivattiin ($Na_2SO_4$). Liuotin poistettiin alipaineessa, ja raakatuote puhdistet-

tiin flash-kromatografiapylväässä (etyyliasetaattiheksaaniseos, 3:5), jolloin saatiin 3-O-bentsyyli-6-deoksi-1,2-O-isopropylideeni-α-furanoosia (10,8 g, 94 %) värittömänä öljynä. $[\alpha]_D^{20}$ = +110,4° (c = 1,02, $CHCl_3$:ssa).

(e) 5-atsido-3-O-bentsyyli-5,6-dideoksi-1,2-O-isopropylideeni-ß-L-talofuranoosi

Edellä valmistettu alkoholi (9,45 g, 31,85 mmol) liuotettiin kuivaan pyridiiniin (150 ml), ja liuokseen lisättiin katalyyttinen määrä 4-dimetyyliaminopyridiiniä. Reaktioseos jäähdytettiin 0 °C:seen ja siihen lisättiin metyylikloridia (4,98 ml, 67,3 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin kuivan typen alla, ja sen annettiin lämmetä huoneen lämpötilaan 2 tunnin aikana. Pieni erä reaktioseosta uutettiin kylläisen NaCl-liuoksen ja dietyylieetterin kanssa ravistaen, orgaaninen kerros erotettiin, ja tämän kerroksen TLC-analyysi (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:1) osoitti, että seos ei sisältänyt lähtöainetta (Rf = 0,5) ja sisälsi yhtä tuotetta (Rf = 0,6). Reaktioseokseen lisättiin dietyylieetteriä (150 ml), ja seosta ravistettiin kylläisen NaCl-liuoksen (3 x 150 ml) kanssa. Orgaaninen kerros kuivattiin ($Na_2SO_4$) ja liuotin poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdistamatonta mesylaattia. Mesylaattiraakatuote liuotettiin välittömästi kuivaan DMF:ään (150 ml), ja liuokseen lisättiin natriumatsidia (6,25 g, 95,6 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 70 °C:ssa 3 tuntia, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:3) osoitti, että seos ei sisältänyt lainkaan lähtöainetta (Rf = 0,6) ja sisälsi yhtä tuotetta (Rf = 0,7). Liuotin poistettiin, raakatuote liuotettiin veteen (150 ml) Ja liuos uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 100 ml). Orgaaniset uuttoliuokset kuivattiin ($MgSO_4$), ja liuotin poistettiin alipaineessa. Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografiapylväässä (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:5), jolloin saatiin 5-atsido-3-O-bentsyyli-5,6-dideoksi-1,2-O-dideoksi-1,2-O-isopropylideeni-ß-L-talofuranoosia (8,61 g, 84 %).

(Todettu: C 60,47, H 6,84, N 13,05 %. $C_{16}H_{21}N_3$ edellyttää: C 60,18, H 6,58, N 13,16 %). $[\alpha]_D^{20}$ = +160,0° (c = 1,21, $CHCl_3$:ssa).

(f) 5-atsido-3-O-bentsyyli-5,6-dideoksi-L-talonolaktoni

Edellä valmistettu atsidi (2,39 g, 7,47 mmol) liuotettiin vesi-trifluorietikkahapposeokseen (50 ml, 2:3), ja seoksen annettiin reagoida 1 tunti, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:3) osoitti, että seos sisälsi vain yhtä tuotetta (Rf = 0,3) eikä lainkaan lähtöainetta (Rf = 0,7). Liuotin poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin puhdistamatonta laktolia öljyna. Tämä öljy liuotettiin dioksaani-vesiseokseen (50 ml, 2:1) ja liuos jäähdytettiin 0 °C:seen. Lisättiin bariumkarbonaattia (4,97 g, 22,4 mmol) ja bromia (1,94 ml, 22,4 mmol), ja reaktioseosta sekoitettiin pimeässä 6 tuntia, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:1) osoitti, että seos sisälsi yhtä tuotetta (Rf = 0,6) eikä lainkaan lähtöainetta (Rf = 0,4). Ylimääräinen bromi tuhottiin lisäämällä pisaroittain natriumtiosulfaattiliuosta, ja reaktioseos sentrifugoitiin ja dekantoitiin vapautuneen rikin poistamiseksi. Reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla (50 ml) ja faasit erotettiin. Vesifaasi pestiin etyyliasetaatilla (2 x 50 ml). Orgaaniset uuttoliuokset yhdistettiin ja kuivattiin ($MgSO_4$), ja liuotin poistettiin alipaineessa. Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografiapylväässä (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:3), jolloin saatiin 5-atsido-3-O-bentsyyli-5,6-dideoksi-L-talonolaktonia (1,86 g, 78 %) varittömänä öljyna, joka kiteytyi seisoessaan.

(Todettu: C 56,37, H 5,48, N 14,36 %. $C_{13}H_{15}O_4N_3$ edellyttää: C 56,41, H 5,42, N 14,60 %). $[\alpha]_D^{20}$ = +95,5° (c = 0,99, $CH_2Cl_2$:ssa).

(g) 5-atsido-3-O-bentsyyli-5-deoksi-L-fukonolaktoni

Edellä valmistettu laktoni (1,86 g, 67,1 mmol) liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (100 ml), liuos

jäähdytettiin -30 °C:seen ja sitä sekoitettiin typen alla. Liuokseen lisättiin pyridiiniä (1,53 ml, 134,2 mmol) ja trifluorimetaanisulfonihappoanhydridiä (1,84 ml, 73,8 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 2 tuntia, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:1) osoitti, että seos ei sisältänyt lähtöainetta (Rf = 0,6) ja sisälsi yhtä tuotetta (Rf = 0,8). Reaktioseos pestiin 50 ml:n erillä vettä, 3 %:sta HCl:ä, vettä, kylläistä natriumvetykarbonaattia ja vettä. Siihen lisättiin DMF:ä (100 ml) ja pääosa dikloorimetaanista poistettiin alipaineessa. Lisättiin natriumtrifluoriasetaattia (3,969 g, 201 mmol), ja reaktioseosta sekoitettiin kuivan typen alla 15 tuntia, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:3) osoitti, että seos ei sisältänyt lähtöainetta (Rf = 0,6) mutta sisälsi tuotteita (Rf = 0,4 ja 0,5). DMF poistettiin alipaineessa, tuote liuotettiin dikloorimetaaniin (100 ml), ja liuos pestiin vedellä (3 x 100 ml) ja kuivattiin ($MgSO_4$). Liuotin poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin vaaleankeltaista öljyä. Epäpuhdasta tuotetta kuumennettiin metanoli-vesiseoksessa (2:1, 100 ml) 50 °C:ssa 12 tuntia, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:3) osoitti sen sisältävän vain yhtä tuotetta (Rf = 0,4). Liuotin poistettiin alipaineessa, ja raakatuote puhdistettiin flash-kromatografiapylväässä (etyyliasetaattiheksaaniseos, 1:3), jolloin saatiin 5-atsido-3-O-bentsyyli-5-deoksi-L-fukonolaktonia (1,51 g, 81 %). $[\alpha]_D^{20}$ = +171,6° (c = 1,49, $CH_2Cl_2$:ssa).

(h) 3-O-bentsyyli-1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fukonolaktaami

Edellä valmistettu fukonolaktoni (1,51 g, 55 mmol) liuotettiin etyyliasetaattiin (50 ml), ja liuokseen lisättiin katalyyttinen määrä katalysaattoria, joka sisälsi palladiumia (5 %) hiilikantoaineella. Reaktioseosta sekoitettiin vedyn alla 2 tuntia, jolloin TLC (etyyliasetaatti-heksaaniseos, 1:3) osoitti seoksen sisältävän vain perusviivaa vastaavaa ainetta ja TLC (etanoli-dikloorimetaani-

seos, 1:9) osoitti, että seos sisälsi kahta tuotetta (Rf = 0,5 ja 0,3). Reaktioseos suodatettiin Celite-kerroksen läpi, joka pestiin etyyliasetaatilla (2 x 10 ml). Saadut kolme erää yhdistettiin, ja liuotin poistettiin alipaineessa. Reaktioseos liuotettiin etanoliin ja jätettiin seisomaan 12 tunniksi, jolloin TLC (etanoli-dikloorimetaaniseos, 1:19) osoitti, että seos sisälsi vain yhtä tuotetta (Rf = 0,5). Liuotin poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin raakatuote valkeana kiinteänä aineena. Puhdistus flash-kromatografiapylväässä (etanoli-dikloorimetaaniseos, 1:9) tuotti tulokseksi 3-O-bentsyyli-1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fukonolaktaamia valkeana kiinteänä aineena (1,11 g, 81 %).

Sp. = 191 - 192 °C. (Todettu: C 62,17, H 7,06, N 5,45 %. $C_{13}H_{17}O_4N$ edellyttää: C 62,15, H 6,77, N 5,58 %). $[\alpha]_D^{20}$ = -70,3° (c = 0,90 etanolissa).

(i) 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fukonolaktaami

Palladioitua hiiltä (15 mg) esipelkistettiin sekoittamalla sitä etanolissa (25 ml) vedyn alla 20 minuuttia. Liuokseen, jota sekoitettiin, lisättiin muutama pisara vastavalmistettua HCl-etanoliseosta ja edellä valmistetun bentsyylisuojatun laktaamin (1,11 g, 44 mmol) liuos. Liuosta sekoitettiin 1 tunti, jolloin TLC (etanoli-dikloorimetaaniseos, 1:9) osoitti sen sisältävän yhtä tuotetta (Rf = 0,1) eikä lainkaan lähtöainetta (Rf = 0,9). Liuos suodatettiin Celite-kerroksen läpi ja liuotin poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin väritöntä öljyä. Tämä öljy kiteytettiin uudelleen vedestä asetonin avulla, jolloin saatiin 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fukonolaktaamia (65 mg, 91 %) valkeana kiteisenä aineena, joka suli 226 - 227 °C:ssa hajoten samalla.

(Todettu: C 44,96, H 7,12, N 8,67 %. $C_6H_{11}O_4N$ edellyttää: C 44,72, H 6,83, N 8,69 %). $[\alpha]_D^{20}$ = -137,2° (c = 0,83, $H_2O$:ssa).

(j) 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitoli

Osassa (h) valmistettua bentsyylisuojattua laktaamia käytettiin myös 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitolin valmistamiseen muuntamalla se ensin suojatuksi amiiniksi, 3-O-bentsyyli-1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitoliksi, ja poistamalla sitten 3-O-bentsyyliryhmä kuten edellä osassa (i). Otsikon mukainen yhdiste saatiin talteen värittömänä öljynä. (Todettu: C 48,76, H 8,82, N 9,30 %. $C_6H_{13}NO_3N$ edellyttää: C 48,98, H 8,84, N 9,52 %). $[\alpha]_D^{20}$ = -49° (c = 0,78, $H_2O$:ssa).

Yhdisteen 1, jota kutsutaan myös L-fukono-ß-laktaamiksi, valmistusta kuvaavat Fleet et al., J. Chem. Commun. 1988, 483-485.

Esimerkit 2 ja 3

Yhdisteet 2 ja 3 voidaan valmistaa 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitolista. Viimeksi mainitun yhdisteen valmistusta kaupan olevasta metyyli-α-D-glukopyranosidista kuvaavat Fleet et al., J. Chem. Soc. 13 (1985) 841-842. Yhdisteiden 2 ja 3 tarkka valmistus oli seuraavanlainen:

1,5-dideoksi-1,5-imino-(N-metyyli)-L-fusitoli

1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitoli (90 mg, 0,61 mmol) liuotettiin 80 %:seen metanolin vesiliuokseen (3 ml). Lisättiin palladiumia hiilikantoaineella (50 mg), pullosta poistettiin kaasu ja se täytettiin vedylla. Seokseen lisättiin septumin läpi formaldehydiä (100 µl, 37 %:sta), ja seosta sekoitettiin magneettisekoittimella yön yli. Katalysaattori poistettiin suodattamalla, ja otsikon mukainen yhdiste eristettiin Dowex®50 ($H^+$)-ioninvaihtopylvästä käyttäen (eluenttina 1 M ammoniumhydroksidiliuos). Haihdutuksen ja kylmäkuivauksen jälkeen eristetyn tuotteen saanto oli 50 mg (52 %). Tuote kiteytyi metanolikloroformiseoksesta. $[\alpha]_D^{20}$ = +12,8° (c = 0,18, $CHCl_3$:ssa).
Todettu: C 52,01, H 9,51, N 9,00 %
Laskettu ($C_7H_{15}NO_3$): C 52,15, H 9,38, N 8,69 %.

1,5-dideoksi-1,5-(N-ω-metyylikaproaatti)-L-fusitoli

1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitoli (147 mg, 1 mmol) liuotettiin metanoliin (1,6 ml), veteen (0,4 ml) ja etikkahappoon (0,09 ml) pyöreäpohjaisessa pullossa. Liuokseen lisättiin palladiumia hiilikantoaineella (100 ml) ja metyyli-6-oksoheksanoaattia (0,2 ml). Pullosta poistettiin kaasu, samalla kun sitä sekoitettiin magneettisekoittimella ja siihen syötettiin vetyä, ja reaktioseosta sekoitettiin yön yli. TLC (etanolin, metanolin ja 1 M $NH_4OH$:n seos, 2:2:1) osoitti lähtöaineen (Rf = 0,23) reagoineen täydellisesti ja seoksen sisältävän yhtä tuotetta (Rf = 0,72). Seos suodatettiin puuvillatupon läpi suoraan pieneen Dowex®50-ionivaihtohartsipylvääseen ($H^+$-muoto) ja pestiin vedellä ja metanolilla. Otsikon mukaisen yhdisteen vapaa amiinimuoto muunnettiin HCl-suolan muotoon eluoimalla tuote pylväästä 0,5 M HCl:n metanoliliuoksella (noin 40-50 ml). Tuotetta sisältävät jakeet yhdistettiin, ja liuotin poistettiin haihduttamalla tuote kuiviin pyöröhaihduttimella. Yhdisteen 3 HCl-suolamuodon saanto oli 250 mg (80 %).

Esimerkki 4

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen yhdisteiden HIV:tä inhiboiva vaikutus osoitetaan in vitro-määritysjärjestelmällä, jossa kasvatetaan T-soluja sopivassa ravintoalustassa ja inokuloidaan ne HIV:llä tutkittavan yhdisteen läsna tai poissa ollessa ja tehdään vertailuja pelkassä ravintoalustassa kasvatettujen vertailusolujen kanssa. Sopivan inkubointiajan kuluttua viljelmät arvostellaan niin kutsuttujen synkytiaalisten solujen (jättisolujen) läsnäolon perusteella. Tyypillisiä esimerkkejä tällaisesta testistä HIV-inhibiittoreiden arvioimiseksi ovat esittäneet Fung et al., Bio/Technology 5 (1987) 940-946; Tyms et al., Lancet, 31. lokakuuta 1987, 1025-1026; Gruters et al., Nature 330 (1987) 74-77; ja Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 8120-8124.

Tässä tapauksessa käytettiin ihmisen leukeemista T-solulinjaa, jota kuvaa Karpas (Leuk. Res. 1 (1977) 35-49). Näitä soluja istutettiin mikromaljan syvennyksiin tiheydeksi 5 x $10^3$ solua/0,2 ml kasvualustaa kuhunkin syvennykseen. Kasvualustana käytettiin naudan sikiöseerumilla (10 %) täydennettyä RPMI-1640:ä. Kutakin tutkittavaa yhdistettä lisättiin joko 4 tai 6 mikromaljan syvennykseen. Kaksi tai kolme näistä syvennyksistä infektoitiin noin $10^3$ HIV-1-partikkelilla syvennys.a kohden ja kaksi tai kolme syvennystä infektoitiin samalla tavalla HIV-2-partikkeleilla. Seuraavien 3 viikon aikana, joiden kuluessa alusta vaihdettiin kahdesti viikossa tuoreeseen vastaavia tutkittavia yhdisteitä sisältävään alustaan, seurattiin infektoituja soluja synkytiaalisten muodostumien (jättisolujen) ja mahdollisen sytopaattisen vaikutuksen (CPE) suhteen. Infektoimattomien solujen kohdalla seurattiin tutkittavien yhdisteiden mahdollista sytotoksista vaikutusta. Samoin arvioitiin kasvunopeus suhteessa vertailusolujen kasvuun. Viljelmille annettiin pisteitä mikroskooppitarkastelun jälkeen käyttäen asteikkoa 0-4+ seuraavin perustein:

0 = täydellinen CPE
± = suurin osa soluista kuolleita
1+ = noin 1/4 soluista elossa
2+ = noin ½ soluista elossa
3+ = noin 3/4 soluista elossa
4+ = kaikki solut näyttävät olevan elossa

Seuraavassa taulukossa esitetään yhteenveto edellä mainituilla aktiivisilla yhdisteillä saaduista tuloksista.

Taulukko I

| Tutkittava yhdiste | Yhdisteen pitoisuus (mg/ml) | T-solut HIV:n infektoimat | Vertailusolut |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,1 | 1+ | 4+ |
| 2 | 0,1 | 1+ | 4+ |
| 3 | 0,03 | 1+ | 4+ |

Vertailun vuoksi mainittakoon, että samaa testiohjelmaa käytettäessä AZT on toksista pitoisuutena 0,01 µg/ml. Jonkin tietyn yhdisteen ennalta arvaamattoman tehon HIV-inhibiittorina ja siten sen, ettei tämä keksintö ollut ilmeinen, osoittavat seuraavat seikat. Edellä mainitut 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fukonolaktaamilla (yhdiste 1) saadut positiiviset inhibitiotulokset, kun taas vastaava 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitoli (valmistettiin esimerkissä 1(j)) oli inaktiivinen edellä mainitussa testiohjelmassa (arvosana 0).

Esimerkki 5

Yhdisteiden 1-3 kykyä estää HIV:n replikaatiota tutkittiin edelleen esimerkissä 4 saatujen tulosten varmistamiseksi. Jotta saataisiin tehdyksi ero spesifisen HIV:n vastaisen vaikutuksen ja sytotoksisuuden välillä, tutkittiin rinnakkain näiden yhdisteiden vaikutuksia HIV:n infektoimiin ja infektoimattomiin T-lymfosyytteihin. Käyttämällä T-solulinjaa ja infektoiduista viljelmistä valmistettuja soluttomia HIV-suspensioita, kuten esimerkissä 4, arvioitiin infektoivien hiukkasten pitoisuus (TCID, kudosviljelmän infektoiva annos) käyttämällä päätepistemääritystä, jossa infektoivien hiukkasten lukumäärä kussakin preparaatissa määritettiin mittaamalla suurin laimennusaste, joka vielä sisälsi infektoivia HIV-partikkeleita, mikä osoitettiin jättisolujen muodostumisella, sytotoksisuudella ja HIV-antigeenisynteesillä, kun näytettä oli viljelty 10 vrk $10^4$ T-45-solun kanssa. Kaikkien yhdisteiden varastoliuokset valj oistettiin liuottamalla kutakin yhdistettä pitoisuudeksi 1 mg/ml kasvualustaan. Nämä liuokset suodatettiin ja steriloitiin (0,22 µm). Aluksi tutkittiin kukin yhdiste käyttamällä pitoisuuksia 0,1 mg/ml ja 0,5 mg/ml. Jos yhdiste esti HIV:n replikaation ilman sytotoksisia vaikutuksia, määritys toistettiin käyttämällä suurempia laimennusasteita, tai jos inhibitio oli osittainen, käyttämällä suurempia pitoisuuksia.

Seuraavassa taulukossa esitetään näiden yhdisteiden sytotoksinen aktiivisuus (kuolleiden solujen osuus, %) ja HIV:n vastainen aktiivisuus (sytopaattisen vaikutuksen, CPE:n, pieneneminen, %).

Taulukko II

| Tutkittava yhdiste | Yhdisteannos (mg/ml) | Sytotoksinen aktiivisuus (% kuolleita soluja) | HIV:n vast. aktiivisuus (CPE:n pien. %) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,10 | 25 | 50 |
| 2 | 0,1 | 0 | 25 |
| 3* | 0,10, 0,25 | 0, 0 | 75, 90 |

* Tutkittiin sekä vapaan amiinin että HCl-suolan muodossa samanlaisin tuloksin.

Tässä kuvattuja virusten vastaisia aineita voidaan antaa ihmisen immuunikato-viruksen infektoimille potilaille tavanomaisin tavoin, edullisesti farmaseuttisesti hyväksyttäviä laimennus- ja kantaja-aineita sisältävissä formuloissa. Näitä yhdisteitä voidaan kävttää vapaan amiinin muodossa tai suolamuodossa. Farmaseuttisesti hyväksyttävistä suolajohdannaisista on esimerkkinä HCl-suola. Annettavan aktiivisen aineen määrän tulee olla vaikuttava määrä, ts. määrä, josta on lääketieteellistä hyötyä, mutta jolla ei ole toksisia vaikutuksia, jotka kumoavat käyttöön liittyvät edut. Voitaisiin odottaa, että aikuisen ihmisen annos on normaalisti vähintään noin 1 mg aktiivista yhdistettä. Edullinen antotapa on antaminen suun kautta kapseleina, tabletteina, siirappeina, eliksiireinä tms, vaikka myös parenteraalista antotapaa voidaan käyttää. Terapeuttisen annoksen sisältävässä muodossa olevia sopivia formuloita, jotka sisältävät aktiivista yhdistettä farmaseuttisesti hyväksyttävissä laimennus- ja kantaja-aineissa, voidaan valmistaa tavoilla, joita kuvataan alaa koskevissa yleisissä teksteissä kuten esimerkiksi teoksessa Remington's Pharmaceutical Sciences, toim. Arthur Osol, 16. p. Mack Publishing Co, Easton PA 1980.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä virusvastaisen yhdisteen valmistamiseksi, joka on

(a) 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fukonolaktaami,

(b) 1,5-dideoksi-1,5-imino-(N-metyyli)-L-fusitoli, tai

(c) 1,5-dideoksi-1,5-imino-(N-ω-metyylikaproaatti)-L-fusitoli,

tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävän suolajohdannaisen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

yhdisteen (a) valmistamiseksi 3-O-bentsyyli-1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitolista poistetaan bentsyyli-suojaryhmä;

yhdisteen (b) valmistamiseksi 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitoli saatetaan reagoimaan formaldehydin kanssa; ja

yhdisteen (c) valmistamiseksi 1,5-dideoksi-1,5-imino-L-fusitoli saatetaan reagoimaan metyyli-6-oksoheksanoaatin kanssa;

ja haluttaessa yhdisteet muutetaan farmaseuttisesti hyväksyttäviksi suolajohdannaisiksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan 1,5-dideoksi-1,5-imino-(N-ω-metyylikaproaatti)-L-fusitoli.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en virusmotverkande förening, vilken är

(a) 1,5-dideoxi-1,5-imino-L-fuconolaktam,

(b) 1,5-dideoxi-1,5-imino-(N-metyl)-L-fucitol, eller

(c) 1,5-dideoxi-1,5-imino-(N-ω-metylkaproat)-L-fucitol,

eller ett farmaceutiskt godtagbart saltderivat därav, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

för framställning av föreningen (a) avlägsnar bensylskyddsgruppen ur 3-O-bensyl-1,5-dideoxi-1,5-imino-L-fucitol;

för framställning av föreningen (b) bringar 1,5-dideoxi-1,5-imino-L-fucitol att reagera med formaldehyd; och

för framställning av föreningen (c) bringar 1,5-dideoxi-1,5-imino-L-fucitol att reagera med metyl-6-oxohexanoat;

och, om man så önskar, omvandlar föreningarna till sina farmaceutiskt godtagbara saltderivat.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer 1,5-dideoxi-1,5-imino-(N-ω-metylkaproat)-L-fucitol.