(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 906181 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 906181

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07H 3/02
C07H 3/10
C07H 13/04
C07H 15/04

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **14.12.1990**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **14.12.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **16.06.1991**

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

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

15.12.1989 EP 89123301

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Laevosan Gesellschaft m.b.H.,** Estermannstrasse 17, 4020 Linz, ITÄVALTA, (AT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Nitsch, Ernst,** Österreich, ITÄVALTA, (AT)
2 •**Lotz, Bernhard,** Österreich, ITÄVALTA, (AT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Uudet sokerijohdannaiset, niiden valmistusmenetelmä ja käyttö
Nya sockerderivater, deras tillverkningsmetod och användning

Uudet sokerijohdannaiset, niiden valmistusmenetelmä sekä niiden käyttö

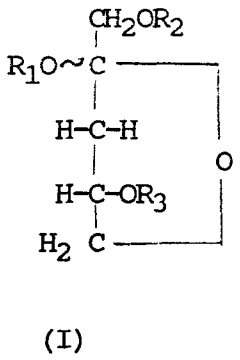
Esillä oleva keksintö koskee uusia sokerijohdannaisia, niiden valmistusmenetelmää ja lääkkeitä, jotka sisältävät näitä yhdisteitä vaikuttavana aineena.

Sytostaateilla tarkoitetaan kemoterapeuttisesti vaikuttavia aineita, joilla on solun kasvua estävä vaikutus; koska tämä estovaikutus kohdistuu erityisesti nopeasti kasvaviin soluihin, jollaisia esiintyy kasvaimissa ja leukemioissa, sytostaateilla ymmärretään tavallisesti kemoterapeuttisia aineita syöpää kohtaan (solun kasvua ehkäisevä aine). Laajoista tutkimuksista huolimatta solun kasvua ehkäiseville aineille ei tähän mennessä ollut mahdollista esittää yhtenäistä vaikutusmekanismia. Tähän saakka tunnetut ja tutkitut sytostaatit voidaan jakaa seuraaviin ryhmiin: alkyloivat yhdisteet; sytostaattiset luonnonyhdisteet; antimetaboliitit; yhdisteet, joilla on erikoinen rakenne ja vaikutustapa. Sytostaattien raskauttava haitta on niiden suuri myrkyllisyys, ja sen lisäksi useat sytostaatit itse vaikuttavat myös karsinogeeneina ja/tai mutageeneina.

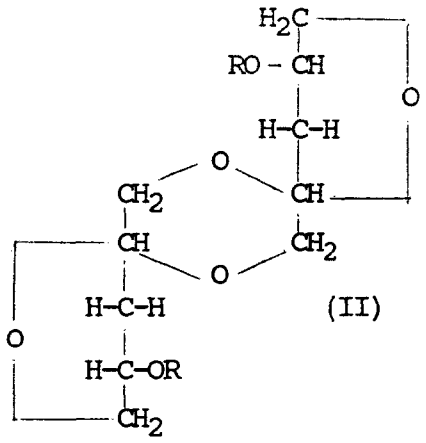
Siksi esillä olevan keksinnön tehtävänä on valmistaa sytostaatteina vaikuttavia yhdisteitä, joilla on alhainen myrkyllisyys.

Yllättäen havaittiin, että tietyillä, uusilla sokerijohdannaisilla, joilla on jäljempänä annetut kaavat I ja II, on osoitettavissa korkea solun lisäkasvua estävä - sytostaattinen - mibrobinvastainen vaikutus yhdistyneenä hyvin vähäiseen yleismyrkyllisyyteen.

Esillä olevan keksinnön kohteena sen tähden ovat uudet sokerijohdannaiset, joilla on kaavat I ja II.



(I)



(II)

joissa R_1 on vetyatomi tai alkyyliryhmä tai asyyliryhmä, joissa kussakin on 1 - 7 hiiliatomia, R_2 ja R_3 merkitsevät vetyatomia tai asyyliryhmää R_4CO, R on vetyatomi tai asyyliryhmä R_5CO ja R_4 ja R_5 merkitsevät alkyyliryhmää, jossa on 1 - 7 hiiliatomia.

Alkyyliryhmä R_1, R_4 tai R_5 voi olla haaroittunut ja on etupäässä suoraketjuinen; siinä on etupäässä 1 - 4 hiiliatomia, ja se on metyyli-, etyyli-, propyyli tai n-butyyli. Asyyliryhmä R_1 on mieluummin asetyyliryhmä. R_4 ja R_5 ovat erityisesti metyyli. Tähteet R_2 ja R_3 voivat mahdollisesti olla erilaisia, mutta etupäässä ne ovat samanlaisia. Suosittuja ovat myös yhdisteet, joissa R_1, R_2 ja R_3 eivät samanaikaisesti ole vetyatomeja.

Yleisen kaavan I mukaisia edullisia yhdisteitä ovat: metyyli-3-D-glyseropentulosidi (R_1 = CH_3, R_2, R_3 = H), n-butyyli-3-deoksi-D-glyseropentulosidi (R_1 = n-C_4H_9, R_2, R_3 = H), n-butyyli-diasetyyli-3-deoksi-D-glyseropentulosidi (R_1 = n-C_4H_9, R_2, R_3 = $COCH_3$), triasetyyli-3-deoksi-D-glyseropentuloosi ja mahdollisesti 3-deoksi-D-glyseropentuloosi (3-DGP; R_1, R_2, R_3 = H); suosittuja yleisen kaavan II mukaisia yhdisteitä ovat di-(3-deoksi-D-glyseropentuloosi)-dianhydridi (R = H) ja diasetyyli-di-3-(deoksi-D-glyseropentuloosi)-dianhydridi (R = $COCH_3$).

Kaavan I mukainen, keksinnönmukainen yhdiste, jossa R_1, R_2 ja R_3 merkitsevät vetyatomia (3-deoksi-D-glyseropentuloosi; 3-DGP), muodostetaan alkalikäsittelyn avulla α- tai β-1,4-kytketyistä di- tai oligosakkadireista, jotka pelkistävässä päässään sisältävät glukoosi-,

fruktoosi- tai mannoosimolekyylin (maltoosin, maltuloosin, epilaktoosin, laktuloosin, sellobioosin, oligomaltosidin). Se muodostuu käsittelemällä tätä di- ja oligosakkaridia alkaleilla, kuten esimerkiksi alkali- ja maa-alkalimetallien hydroksideilla, karbonaateilla tai sulfideilla tai orgaanisilla emäksillä, etupäässä esimerkiksi pyridiinillä tai trietyyliamiinilla saannon ollessa noin 0,5 - 5 % käytetyn sakkaridin suhteen. 3-deoksi-D-glyseropentuloosi (3-DGP), tähän mennessä tuntematon sokeri, on isomeeri 2-deoksi-riboosille, jolla on olennainen rooli lähtöaineessa.

Reaktiotuottteiden seoksesta voidaan 3-DGP väkevöidä tai puhdistaa erilaisin, sinänsä tunnetuin tavoin, esimerkiksi neste-neste-uuton avulla, joka suoritetaan etanolilla, asetonilla tai asetonitriilillä (nämä antavat konsentroiduilla sokeriliuoksilla 2-jakeisen seoksen, jonka yläjakeessa 3-DGP on voimakkaasti väkevöitynyt), mutta etupäässä neste-kiinteäkromatografian avulla. Tätä tarkoitusta varten stationäärisiksi faaseiksi soveltuvat erityisesti voimakkaat kationinvaihtajat, jotka muodostuvat haaroittuneesta polystyreenistä, joka on alkali- tai maa-alkalisuolana, etupäässä Na-, K- tai Ca-muodossa, sekä voimakkaat anioninvaihtajat, jotka on valmistettu polystyreenistä ja ovat suolana, etupäässä Cl-, SO_4- tai HSO_3-muodossa. Käytettäessä esimerkiksi vettä eluenttina, eluaattiin ilmestyvät ensin reagoimattomat sokerit ja niiden isomerointituotteet, sitten 3-DPG ilmestyy hyvin eronneena.

Sopivista jakeista voidaan erittäin hyvin puhdistettu 3-DGP saada värittömänä, kiteytymättömänä siirappina. Koska aineella on vedettömissä ja vettä niukasti sisältävissä olosuhteissa taipumus muodostaa dimeerinmuotoisia anhydridejä, on tarkoituksenmukaista valmistaa ja säilyttää se noin 50-prosenttisena vesiliuoksena. Mutta myös vesiliuos on suhteellisen epästabiili, ja se hajoaa hitaasti muuttuen ruskeanväriseksi, sameaksi ja muodostamalla erilaisia furaaniosasia. Lämpötilan nostaminen ja pH-arvon laskeneminen hidastavat tätä hajoamista. Säilyttämisen takia on siksi tarkoituksenmukaista pitää lämpötila $\leq$ 4 °C:ssa ja pH-arvo välillä 5 - 6. Sellaisissa liuoksissa esiintyy ilmeisesti α- ja β-furanoosien ja avoketjuisten ketoosien seos.

3-DGP on tässä muodossa biologisesti aktiivinen. Vapaan 3-DGP:n asemasta käytetään mieluummin stabiileja johdannaisia, nimittäin

triasyyliyhdisteitä, vastaavia glykosideja tai niiden diasyyliyhdisteitä (kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa R_1 merkitsee asyyli- tai alkyylitähdettä ja R_2 ja R_3 merkitsevät vetyatomia tai asyylitähdettä R_4CO), tavallisesti kiteytymättöminä, öljymäisinä yhdisteinä, tai kaavan II (R = H) mukaista dianhydridiä tai niiden diasyyliesteriä (kaava II, jossa R = asyyli), jolloin tavallisesti on kysymys hyvin kiteytyvistä yhdisteistä.

Glykosidit muodostuvat jo lyhyen, huoneenlämpötilassa suoritetun käsittelyn jälkeen erittäin helposti 3-DGP:n liuoksista vastaavissa alkoholeissa erittäin vähäisten hapon tai H^+-muodossa olevan ioninvaihtajan määrien ollessa katalysaattorina. Yhtä helposti vesiliuoksessa tapahtuu glykosidin hydrolyysi, niin että fysiologisissa olosuhteissa voidaan odottaa vapaan 3-DGP:n kanssa ekvivalenttista määrää.

Kaavan II (R = H) mukainen dianhydridi muodostuu helposti käsittelemällä 3-DGP:n kohtuullisen happamia liuoksia vettä sitovilla aineilla, kuten esimerkiksi vedettömällä natriumsulfaatilla tai kalsiumsulfaatilla, tai haihduttamalla 3-DGP:n vesi- tai orgaanisia liuoksia ja jättämällä vedetön tuote seisomaan. Vesiliuoksessa dianhydridi (kaava II) glykosidien tavoin lohkeaa helposti monomeereiksi.

Kaavojen I ja II, joissa R_1, R_2 ja R_3 tai R merkitsee asyyliryhmää, mukaiset asyyliyhdisteet, voidaan valmistaa kaavan I, jossa R_1 on vety tai alkyyliryhmä (glykosidi), mukaisista yhdisteistä, tai kaavan II mukaisesta dianhydridistä, jossa R on vetyatomi, sinänsä tunnetulla tavalla antamalla mainittujen yhdisteiden reagoida etikkahappoanhydridin kanssa pyridiinissä.

Sentähden esillä olevan keksinnön kohteena on keksinnönmukaisten yhdisteiden, joilla on yleinen kaava I tai II, jossa R_1:llä, R_2:lla, R_3:lla, R_4:llä, R_5:llä ja R:llä on edellä mainittu merkitys, ja joille on tunnusomaista, että α- tai β-1,4-kytkettyjä di- tai oligosakkarideja, jotka pelkistävässä päässään sisältävät glukoosi-, fruktoosi-, tai mannoosimolekyylin, käsitellään epäorgaanisilla tai orgaanisilla emäksillä, saadusta reaktioseoksesta sinänsä tunnetulla tavalla eristetään 3-deoksi-D-glyseropentuloosi (3-DGP), joka on kaavan

I mukainen, jossa R_1, R_2 ja R_3 merkitsevät vetyatomia, ja haluttaessa 3-DGP sinänsä tunnetulla tavalla muutetaan glykosidikseen (kaava I, R_1 = alkyyli), diasyyliglykosidikseen (kaava I, R_1 = alkyyli, R_2, R_3 = R_4CO) triasyyliglykosidikseen (kaava I, R_1, R_2, R_3 = R_4CO), dianhydridikseen (kaava II, R = H) tai diasyylianhydridikseen (kaava II, R = R_5CO).

Menetelmä suoritetaan etupäässä vettä sisältävässä välivaiheessa. Reaktion suorituslämpötila on mieluummin huoneenlämpötilan ja 100 °C:n välillä.

Kaavoja I ja II vastaavien, esillä olevan keksinnön mukaisten yhdisteiden solun lisäkasvua estävien-sytostaattisten-mikrobienvastaisten ominaisuuksien tutkimiseksi yhdisteet tutkittiin humaani munasarjakasvainsoluviljelmällä (HOC-7), jolloin koejärjestelmänä käytettiin niin sanottua humaani kasvain kloonausmääritystä (HTCA), järjestelmää, jossa kasvaimen yksittäissolujen klonaalinen kasvu selektiivisesti tarttuu kiinni puolikiinteissä elatusalustoissa (vrt. S. Hamburger, Science 197 (1977), 461). Yhdisteet osoittivat tällöin yllättävän korkeaa solun lisäkasvua estävää-sytostaattista-mikrobienvastaista vaikutusta.

Toksisuuskokeessa (hiiri, suun kautta suoritettu koe) havaittiin, että kaavoja I ja II vastaavilla, keksinnönmukaisilla yhdisteillä ei ilmennyt mitään havaittavaa, akuuttia toksisuutta.

Niiden huomattavan solun lisäkasvua estävän-sytostaattisen-mikrobienvastaisen sekä suotuisien toksisuutta koskevien tulosten perusteella esillä olevan keksinnön mukaisilla yhdisteillä osoittautuu olevan epätavallisen laaja farmakologinen indeksi (kerroin, joka muodostetaan tehokkaan annoksen ED ja toksisuuden LD_{50}) perusteella. Sitäpaitsi todettiin bakterisidinen vaikutus.

Esillä olevan keksinnön kohteena siitä syystä on myös lääkeaine, joka vaikuttavana aineena sisältää yhtä tai useampaa kaavan I ja/tai II mukaista yhdistettä. Tavanomaisten farmaseuttisten kantaja- ja/tai laimennusaineiden rinnalla nämä lääkeaineet voivat sisältää kaavan I ja/tai II mukaisten yhdisteiden rinnalla hoidon tukemiseksi mahdol-

lisesti vielä myös muita vaikuttavia aineita, sikäli kuin ne eivät keksinnönmukaisten yhdisteiden kanssa osoita ei-toivottuja sivuvaikutuksia. Sopivat, tarkoituksenmukaiset annostelumuodot, annostelu- ja käyttötavat esimerkiksi suun kautta suoritettavaa, topikaalista, infusoitavaa, injisoitavaa j.n.e. antamista varten vastaavat oleellisesti tunnettujen, solun liikakasvua estävien/sytotoksisesti vaikuttavien aineiden suhteen tunnettuja edellytyksiä, mutta jolloin esillä olevan keksinnönmukaisten yhdisteiden paremman terapeuttisen leveyden (oleellisesti alhaisemman myrkyllisyyden) perusteella yhdisteiden suurempi annostelu ja/tai useammin tapahtuva antaminen tulevat kysymykseen.

Niitä voidaan antaa kerran tai useammin päivässä. Tarkoituksenmukainen määrä ja antamisen toisto mukauutuu tällöin erityisesti sairauden laadun ja vaikeuden sekä potilaan voinnin mukaan.

Alla esitetyissä taulukoissa 1 - 3 esitetään esillä olevan keksinnön mukaisten yhdisteiden R_f-arvot, jotka niiden tutkimiseen käytetyt ohutlevykromatografialiuottimet sekä HPLC-järjestelmät antoivat.

Taulukko 1

Ohutlevykromatografia (DC)

	Liuotin^{+++}	R_f-arvo
3-DGP	1	0,49
3-DGP	2	0,29
3-DGP	4	0,17^{+}
metyyli-DGP	4	0,42 ja 0,55^{+}
etyyli-DGP	4	0,67
i-propyyli-DGP	4	0,90
n-butyyli-DGP	4	1,0^{+}, liuottimen kulkeutumismatka 76 mm
n-butyyli-DGP-diasetaatti	3	0,73 ja 0,64^{++}
di-DGP-dianhydridi	2	0,35
di-DGP-dianhydridi	4	0,25^{+}
DGP-4-nitrofenyyliosatsoni	5	0,21
di-DGP-dianhydridi-diasetaatti	4	0,64
3-DGP-triasetaatti	4	0,74

$^{+}$ R_f-arvo n-butyyli-DGP:lle = 1,0; liuottimen kulkeutumismatka 3 x 10 cm

$^{++}$ liuottimen kulkeutumismatka 2 x 10 cm

$^{+++}$ katso taulukko 2

Käytettiin seuraavia DC-liuottimia sekä HPLC-järjestelmiä:

Taulukko 2

DC-liuotin

No	(DC-valmislevyt, Kieselgel 60 F254 10x20 cm Merck tilausnumero 5729)		
1	metyylietyyliketoni/jääetikka/metanoli		
	60	20	20
2	metyylietyyliketoni/vesi		
	92,5	7,5	
3	metyylietyyliketoni/tolueeni		
	20	80	
4	metyylietyyliketoni/tolueeni		
	50	50	
5	bentseeni/tetrahydrofuraani/jääetikka		
	75	20	5

Suihkereagenssi: 200 mg 1,3-naftaliinidiolia 50 ml:ssa metanolia +
50 ml:ssa 20-prosenttista rikkihappoa; 10 minuuttia
100 °C:ssa

3-DGP ja johdannaiset tulevat näkyviin sinivihreinä läiskinä

Taulukko 3

HPLC-järjestelmä

	Järjestelmä 1	Järjestelmä 2
Pylväs	SHODEX S 801 8 x 500 mm	Vertex-Hypersie APS 3 µm 4,0 x 250mm
Eluentti	kalsiumatsidi vedessä	asetonitriili-fosfaattipuskuri
Virtaus ml/minuutti	0,9	1,2
Ilmaisin	RI (taitekerroin-detektori)	RI (taitekerroin-detektori)
Syöttötilavuus µl	20	20
Lämpötila °C	60	huoneenlämpötila
retentioaika noin minuutteja:		
3-DGP	26,80 (kuva 4)	3,29 (kuva 5)
dianhydridi (II, R =H)	25,54	---

Seuraavat esimerkit valaisevat lähemmin keksintöä yhdessä piirrosten kanssa. Piirroksissa esittävät seuraavasti:

Kuva 1 esimerkin 6 mukaisen yhdisteen IR-spektriä;
Kuva 2 esimerkin 6 mukaisen yhdisteen HNMR-spektriä;
Kuva 3 esimerkin 2 mukaisen yhdisteen IR-spektriä;
Kuva 4 HPLC-eluutiodiagrammia järjestelmässä 1 3-DPG:tä varten;
Kuva 5 HPLC-diagrammia järjestelmässä 2 3-DPG:tä varten ja
Kuva 6 HPLC-diagrammia järjestelmässä 1 dianhydridiä V varten.

Esimerkki 1

Laktoosimonohydraattia 52,63 g, vastaten 50,0 g vedetöntä laktoosia, liuotettiin 25 g:aan vettä 100 °C:ssa, lisättiin 0,65 g vedetöntä natriumsulfiittia, pidettiin 20 minuutin ajan 100 °C:ssa, jäähdytettiin nopeasti huoneenlämpötilaan, ympättiin noin 1 mg:lla laktoosi-monohydraattia, ja noin 24 tunnin kuluttua emäliuos erotettin imemällä

reagoimattomista laktoosikiteistä suorittaen jälkipesu vähäisellä määrällä jääkylmää vettä.

Suodos sisältää 36,4 g:ssa liuosta 9,5 g sakkaridia. Se suoloitettiin sekoitusalustavaihtajan kautta, ja saatu neutraali liuos haihdutettiin tyhjössä 20 g:aan.

Tuote pantiin lasipylvääseen (sisäläpimitta 26 mm, vaipan lämmitys 60 °C:een, pituus 100 cm, täytetty noin 500 ml:lla kationinvaihtajaa Lewatit MDS 1368 (voimakkaasti hapan, polystyreenimatriisi, valmistaja Bayer AG, Leverkusen, natriummuodossa), ja sitä eluoitiin vedellä. Esijakeen jälkeen, joka ei sisältänyt ainetta ja jonka tilavuus oli 175 ml, koottiin jae, jonka tilavuus oli 110 ml ja joka sisälsi pääosan laktoosista ja saattosakkarideista. Lisäjae, jonka tilavuus oli 150 ml, sisälsi koko 3-DGP:n sekä vähäisiä määriä saattosakkarideja.

3-DGP-jakeet, kaikkiaan 10:stä reaktioerästä, koottiin, haihdutettiin tyhjössä noin 20 g:ksi, ja niille toistettiin sama kromatografointimenettely. 3-DGP-jae sisälsi nyt jälkiä saattosokereista. Jae haihdutettiin tyhjössä 10 g:ksi.

Vesipitoisuus Karl Fischerin mukaan: 49,2 %
HPLC-analyysi (järjestelmä 1) antoi: 48,9 % 3-DPG:tä
0,8 % galaktoosia
1,1 % muita sokereita
Ominaiskiertokyky: - 22,1 ° (c = 3,0 vedessä)

Tämä tuote käytettiin esimerkissä 3 kuvattuihin kokeisiin soluviljelmillä.

Rakenneselitys:
Uusi aine pelkistää Fehlingin liuoksen mutta ei bromia heikosti happamessa ympäristössä. On siis kysymys ketoosista. Se antaa desoksisokerin reaktiot Keller-Kilianin (H. Kiliani, Ar. 234, (1986), 273) sekä Dischen mukaan (Z.Dische, Mikroch. 8, (1930), 4-32). Ominaiskiertokyky on $/alfa/^{20}_{D}$ = - 22,1° (c = 3,0 vedessä). Se käyttää moolia kohti 1 moolin perjodaattia, siinä on siis ainoastaan yksi dioliryhmä. Kiteytetty nitrofenyyliosatsoni osoittautui sulamispisteen (253°C) ja

alkuaineanalyysin perusteella identtiseksi 3-deoksiksyloosiksi kuvatun tuotteen kanssa (S. Mukherjee ja A.R. Todd, Soc. 94 (1947), 969-973). R_f-arvo liuottimessa on 5:0,21. Koska metyyliglykosidi (I, R_1 = CH_3, R_2, R_3 = H), n-butyyli(1)-glykosidi (I, R_1 = n-C_4H_9, R_2, R_3 = H) ja dianhydridi (II, R = H) eivät käytä perjodaattia, hydroksyyliryhmä sijaitsee glykosidisen ryhmän vieressä. n-Butyyli-glykosidi (I, R_1 = n-C_4H_9, R_2, R_3 = H) voi pyridiinissä reagoida etikkahappoanhydridin kanssa diasetyyliyhdisteeksi (I, R_1 = n-C_4H_9, R_2, R_3 = $COCH_3$), joka voidaan tislata suurpaineessa. Kiehumispiste: 90 °C (0,002 torria = 0,26 Pa). NaOH:lla suoritettu saippuointi antoi molekyylipainoksi 272,5 ($C_{13}H_{22}O_6$:lle laskettu molekyylipaino: 274,319). IR-spektri (kuva 1) ja massa- ja NMR-spektri (kuva 2) varmistavat annetun rakenteen.

Alkuaineanalyysi ($C_{13}H_{22}O_6$)
saatu: 56,61 % C, 7,93 % H, 35,6 % O
laskettu: 57,0 % C, 8,09 % H, 35,0 % O

HPLC, katso taulukko 3
DC, katso taulukko 1

Esimerkki 2

Di-(3-deoksi-D-glyseropentuloosi)dianhydridin (II, R = H) valmistus

5 g esimerkissä 1 valmistettua tuotetta, sisältäen 2,445 g 3-DGP:ta, haihdutettiin vesivakuumissa, noin 50 °C:n hauteenlämpötilassa, jäljelle jäänyt siirappi otettiin 10 ml:aan metyylietyyliketonia, haihdutettiin uudelleen, ja sama menettely toistettiin vielä neljä kertaa. Lopuksi kuivaa jäännöstä kuumennettiin vielä yhden tunnin ajan tyhjössä 100°C:een. Moniviikkoisen tyhjössä seisottamisen jälkeen tapahtui spontaani kiteytyminen paksuksi kidepuuroksi. 1-butanolista ja metanolista suoritetun uudelleenkiteyttämisen jälkeen saatiin 0,8 g värittömiä kiteitä. Sulamispiste: 148-149 °C.

Ominaiskiertokyky /alfa/$^{20}_D$ = -12,0°C (c = 2,3 vedessä)

Alkuaineanalyysi:
saatu: 51,35 % C, 6,83 % H, 41,26 % O
laskettu: 51,72 % C, 6,94 % H, 41,34 % O ($C_{10}H_{16}O_6$:lle)

IR-spektri käy selville kuvassa 3.

Aine ei pelkistä Fehlingin liuosta eikä käytä perjodaattia neutraalissa liuoksessa.

Etikkahappoanhydridillä/pyridiinillä saatava diasetyyliyhdiste (II, R= asetyyli) on samoin hyvin kiteytyvä yhdiste.
DC, katso taulukko 1.

Esimerkki 3

DGP:n saanto laktoosista erilaisilla reagoivilla aineilla

Kulloinkin 52,63 g laktoosimonohydraattia, vastaten 50 g:aa vedetöntä laktoosia, liuotettiin, kuten esimerkissä 1, 25 g:aan vettä 100 °C:ssa, lisättiin 25 ml reagoivien aineiden liuosta (konsentraatio kts. taulukko 4) ja pidettiin 20 minuutin ajan 100 °C:ssa. Nopean jäähdytyksen jälkeen arvioitiin HPLC-järjestelmällä 1 reaktioseoksen DGP-pitoisuus prosentteina käytetyn vedettömän laktoosin suhteen. Tulokset käyvät ilmi seuraavassa taulukossa 4.

Taulukko 4

Reagoiva aine	Konsentraatio g/100 ml	Muodostunut DGP %
Na_2SO_3	5	0,96
Na_2CO_3	4	0,17
NaOH	1,5	2,01
Trietyyliamiini	0,25 ml + 0,25 ml H_2O	0,34
Pyridiini	0,25 ml	0,13

Esimerkki 4

DGP:n saanto erilaisista di- ja oligosakkarideista

Suoritus oli samanlainen kuin esimerkissä 3. Laktoosin tilalla käytettiin 50 g (kuivapaino) kulloinkin erilaisia di- ja oligosakkarideja. Reagenssina lisättiin aina 25 ml natriumhydroksidiliuosta, jonka konsentraatio oli 1,5 g/100 ml. Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa 5.

Taulukko 5

Käytetty sakkaridi	Muodostunut DGP %
Laktuloosi	2,07
Maltoosi	1,54
Epilaktoosi	1,34
Oligomaltosidi+	1,51
Sellobioosi	1,75

+ Glukoositon, saatu tärkkelyssiirapista metanolilla saostamalla
Molekyylipaino noin 2300

Esimerkki 5

n-butyyli-deoksi-D-glyseropentulosidin valmistus

5 g esimerkissä 1 saatua tuotetta, joka sisälsi 2,445 g DGP:tä, sekoitettiin 5 ml:n kanssa n-butanolia ja haihdutettiin pyörö-haihduttajassa lähtötilavuuteen. Vaihe toistettiin vielä kolme kertaa kaiken veden poistamiseksi, tilavuus täydennettiin n-butanolilla 25 ml:ksi, ja liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 10 minuuttia, sen jälkeen kun siihen oli lisätty hienojakoista, voimakkaasti hapanta kationinvaihtajaa H^+-muodossa (Duolite Microionex H). Suodattamisen jälkeen pyridiinin (50 ul) lisäyksen jälkeen kaikki liuotin poistettiin haihduttamalla tyhjössä. Jäljelle jäi 3,40 g vaaleankeltaista, öljymäistä nestetttä, joka liukeni hyvin veteen, alkoholeihin ja alempiin ketoneihin. Ohutlevykromatoghrafia, kts. taulukko 1.

Esimerkki 6

n-butyyli-1,4-diasetyyli-3-deoksi-D-glyseropentulosidin valmistus

3,40 g esimerkin 4 mukaan valmistettua n-butyyliglykosidia liuotettiin 100 ml:aan pyridiiniä, lisättiin 10 ml etikkahappoanhydridiä, ja seos jätettiin 24 h:n ajaksi seisomaan huoneenlämpötilaan. Lietos kaadettiin sitten 1 litraan jäävettä, saostunut, väritön öljy pestiin useita kertoja vedellä ja kuivattiin tyhjössä P_2O_5:n päällä.

Saanto: 3,67 g

Tuote voitiin tislata 0,266 Pa:n (0,002 mm Hg) paineessa noin 80 °C:ssa.

Ominaiskiertokyky /alfa/$^{20}_D$ = -37,7° (c = 0,5; kloroformi)

Tiheys 20/4: 1,86

Alkuaineanalyysi:	C	H	O
$C_{13}H_{22}O$:lle laskettu	56,61	7,93	35,6
määritetty	57,0	8,09	35,0

IR-spektri, katso kuva 1
NMR-spektri, katso kuva 2
Ohutlevykromatografia, katso taulukko 1

Esimerkki 7

3-DGP-triasetaatin valmistus (R_1: asyyli)

3,16 g di-DGP-diasetaattia liuotettiin 10 ml:aan 0,1-normaalista HCl:a, joka oli jääetikassa, lisättiin 0,5 ml etikkahappoanhydridiä ja pidettiin 120 minuuttia 40°C:ssa. Sen jälkeen kun oli lisätty 200 ul trietyyliamiinia, liete haihdutettiin tyhjössä. Jäljelle jäi keltaista öljyä 5,15 g. Se liuotettiin 5 ml:aan tolueenia, pantiin pylvääseen, jossa oli 200 ml Kieselgel 60:a Merck (230 - 400 mesh), eluoitiin seuraavaksi 200 ml:lla tolueenia, sitten 200 ml:lla tolueeni-etyyliasetaattia (80 + 20) sekä 200 ml:lla tolueeni-etyyliasetaattia (60 + 40). Pääaine tuli näkyviin jakeessa 310-360 ml. Se haihdutettiin tyhjössä. Väritön öljy. Saanto: 3,62 g.

R_f-arvo katso taulukko 1.

Esimerkki 8

Biologinen koe

Esimerkissä 1 valmistettua 3-DGP:tä sekä DGP-DA:ta esimerkistä 2 tutkittiin niiden solun liikakasvua estävien-sytostaattisten-mikrobienvastaisten ominaisuuksien suhteen humaani munasolusyöpäsoluviljelmissä (HOC-7), jolloin koejärjestelmänä käytettiin niin sanottua humaani kasvainkloonausmääritystä (HTCA), jossa pahanlaatuisten yksittäissolujen klonaalinen kasvu puolijähmeissä väliaineissa selektiivisesti tarttui kiinni (vrt. S. Hamburger, Science 197 (1977), 461).

Menetelmä

Kumpikin 3-DGP:n ja DGP-DA:n vesiliuos tutkittiin seuraavassa laimennussarjassa.

Koekonsentraatio	Laimennus putkessa	Laimennus petrimal-jassa	% petrimaljassa	ug/ml
C	1:5	1:10	0,5	5000
D	1:10	1:20	0,25	2500
E	1:50	1:100	0,05	500
F	1:100	1:200	0,025	250
F1	1:125	1:250	0,02	200
F2	1:165	1:330	0,015	152
F3	1:250	1:500	0,01	100
G	1:500	1:1000	0,005	50
H	1:1000	1:2000	0,0025	25
I	1:5000	1:10000	0,005	5
J	1:10000	1:20000	0,00025	2,5

jolloin myös negatiivinen kontrollierä ($HgCl_2$:n muodossa) käsiteltiin liuottimella (kaksikertaa tislatulla vedellä) kuten yksi näyte-erä.

Viljelmiä inkuboitiin 21 päivää 37 °C:ssa, 5 %:ssa CO_2:a, 100-prosenttisessa ilmankosteudessa, tämän jälkeen viljely lopetettiin, jolloin kasvaneet pesäkkeet (kloonit) valittiin mikroskoopin alla.

Tutkitun liuoksen tehokkuus määritettiin pesäkkeiden eloonjäämisenä, joka oli < 50 % kontrollista.

Tulos

Liuotinkontrolli: VII: pesäkkeiden eloonjääminen 92 % = ei pesäkkeiden kasvun estoa

Negatiivinen kontrolli: VI: pesäkkeiden eloonjääminen 0 %

Lineaarisuuskontrolli: r = 0,968

Tutkittavan aineen konsentraatio: DGP

C-F: pesäkkeiden eloonjääminen	0 % = vaikutus
F1:	0,08 % = vaikutus
F2:	10 % = vaikutus
F3:	44 % = välivaikutus
G-J:	65 - 84 % = ei mitään vaikutusta

Tutkittavan aineen konsentraatio: DGP-DA

C:	pesäkkeiden eloonjääminen	30 % = vaikutus
D:		50 % = välivaikutus
E:		57 % = välivaikutus
F - J:		61 - 89 % = ei mitään vaikutusta

Tulos ilmaisee selvän eron tutkittujen munasarjaperäisten karsinooma-solupolvien herkkyyden ja resistenssin välillä, jolloin herkällä alueella voitiin osoittaa suuri solun liikakasvua estävä-sytostaattinen-mikrobienvastainen vaikutus.

Esimerkissä 1 kuvatuilla 3-DPG:n johdannaisilla (metyyliglykosidi, n-butyyliglykosidi, diasyyli-n-butyyliglykosidi) saatiin samoissa koeolosuhteissa selvä solun liikasvua estävä-sytostaattinen-mikrobienvastainen vaikutus.

Esimerkki 9

Säilöntä DAB 9, VIII, N1:n mukaan

Esillä olevan keksinnön mukaiset yhdisteet ilmaisevat bakterisidista vaikutusta kuten alla esitetyt koe-esimerkit osoittavat:

Valmiste: 0,3-, 1- ja 3-prosenttinen di-deoksi-glyseropentuloosi

Koe suoritettiin seuraavilla bakteerikannoilla:

Escherichia coli ATCC 8739
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Staphylococcus aureus ATCC 6538
Candida albicans ATCC 10231
Aspergillus niger ATCC 16404

Taulukko 6

Koeorganismi	Kons.	KBE/ml kokeen alussa	KBE 1 päivän kuluttua	KBE 3 päivän kuluttua	KBE 10 päivän kuluttua
E. coli		$1,43 \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$	0	0
Pseud. aerug.		$1,47 \times 10^5$	$4,30 \times 10^3$	$3,39 \times 10^4$	$1,10 \times 10^6$
Staph. aureus	0,3 %	$3,74 \times 10^5$	0	0	0
Cand.albicans		$3,40 \times 10^5$	$1,14 \times 10^6$	$1,16 \times 10^6$	$1,92 \times 10^6$
Asp. niger		$3,61 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$	$5,85 \times 10^5$	$4,15 \times 10^5$
E. coli		$0,70 \times 10^5$	0	0	0
Pseud. aerug.		$1,96 \times 10^5$	$4,20 \times 10^2$	$4,23 \times 10^3$	$5,88 \times 10^5$
Staph. aureus	1 %	$4,25 \times 10^5$	0	0	0
Cand. albicans		$3,25 \times 10^5$	$4,94 \times 10^5$	$1,60 \times 10^6$	$1,95 \times 10^6$
Asp. niger		$2,87 \times 10^5$	$3,90 \times 10^5$	$3,30 \times 10^5$	$5,30 \times 10^5$
E. coli		$0,65 \times 10^5$	0	0	0
Pseud. aerug.		$1,80 \times 10^5$	0	0	0
Staph. aureus	3%	$3,70 \times 10^5$	0	0	0
Cand. albicans		$3,19 \times 10^5$	$5,65 \times 10^5$	$1,80 \times 10^6$	$2,12 \times 10^6$
Asp. niger		$2,19 \times 10^5$	$4,27 \times 10^5$	$3,50 \times 10^5$	$4,55 \times 10^5$

Esimerkki 10

Säilöntä DAB 9, VIII N1:n mukaan

Yhteneväisesti esimerkin 9 mukaan tutkittiin DGP:n bakterisidinen vaikutus.

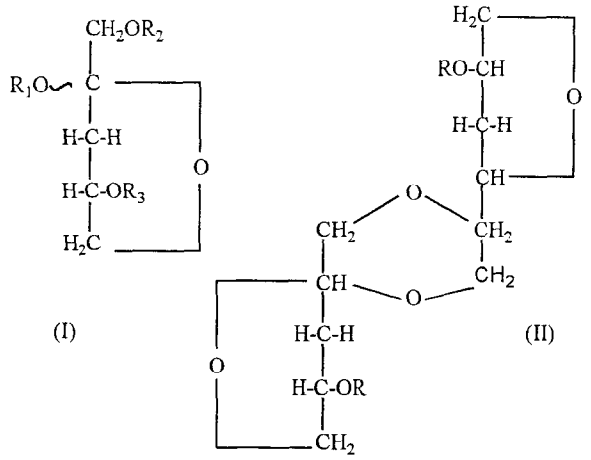
Valmiste: DBP:n vesisiirappi, 0,3-, 1- ja 3-prosenttinen,
Valmistuserä: 91621
Tutkimus suoritettiin seuraavilla bakteerikannoilla:
Escherichia coli ATCC 8739
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Staphylococcus aureus ATCC 6538
Candida albicans ATCC 10231
Aspergillus niger ATCC 16404

Taulukko 7

Koeorganismi	Kons.	KBE/ml kokeen alussa	KBE/ml 1 päivän kuluttua	KBE 3 päivän kuluttua	KBE 10 päivän kuluttua
E. coli		$1,1 \times 10^6$	$6,7 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$
Pseud. aerug.		$2,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$8,4 \times 10^3$	0
Staph. aureus	0,3 %	$1,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	0
Cand. albicans		$9,1 \times 10^5$	$4,8 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
Asp. niger		$1,9 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$
E. coli		$1,2 \times 10^6$	$5,9 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	$<10^2$
Pseud. aerug.		$2,2 \times 10^5$	$7,2 \times 10^4$	0	0
Staph. aureus	1 %	$1,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	3×10^4	0
Cand. albicans		$1,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	9×10^6	$3,9 \times 10^6$
Asp. niger		$1,7 \times 10^4$	6×10^3	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
E. coli		$1,2 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$	28×10^3	0
Pseud. aeruginosa		$2,2 \times 10^5$	15	0	0
Staph. aureus	3 %	$1,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	0	0
Cand. albicans		$1,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$
Asp. niger		$1,1 \times 10^4$	4×10^3	$4,5 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jolla on kaava I tai II



jossa R_1 merkitsee vetyatomia tai alkyyliryhmää tai asyyliryhmää, joissa kussakin on 1 - 7 hiiliatomia, R_2 ja R_3 merkitsevät vetyatomia tai merkitsevät myös asyyliryhmää R_4CO, R merkitsee vetyatomia tai asyyliryhmää R_5CO ja R_4 ja R_5 merkitsevät alkyyliryhmää, jossa on 1 - 7 hiiliatomia, t u n n e t t u siitä, että α- tai β-1,4-kytkettyä di- tai oligosakkaria, joka pelkistävässä päässään sisältää glukoosi-, fruktoosi- tai mannoosimolekyylin, käsitellään epäorgaanisella tai orgaanisella emäksellä, saadusta reaktioseoksesta eristetään kaavan I, jossa R_1, R_2 ja R_3 merkitsevät vetyatomia, mukaisen 3-deoksi-D-glyseropentuloosin (3-DGP), ja jos niin halutaan, 3-DGP sinänsä tunnetulla tavalla muutetaan triasyyliyhdisteeksi, glykosidikseen (kaava I, R_1 = alkyyli), diasyyliglykosidikseen (kaava I, R_1 = alkyyli, R_2, R_3 = R_4CO), dianhydridikseen (kaava II, R = H) tai diasyylianhydridikseen (kaava II, R = R_5CO).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan kaavan I mukainen yhdiste, jossa R_1 on vetyatomi, asyyli- tai alkyyliryhmä, joissa kussakin on 1 - 4 hiiliatomia.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan kaavan I tai II mukainen yhdiste, jossa R_4 tai R_5 on alkyyliryhmä, jossa on 1 - 4 hiiliatomia.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan 3-deoksi-D-glyseropentuloosi (kaava I, R_1, R_2, R_3 = H).

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan metyyli-3-deoksi-D-glyseropentulosidi (kaava I, R_1 = CH_3, R_2, R_3 = H).

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan n-butyyli-3-deoksi-D-glyseropentulosidi (kaava I, R_1 = n-C_4H_9, R_2, R_3 = H).

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan n-butyyli-diasetyyli-3-deoksi-D-glyseropentulosidi (kaava I, R_1 = n-C_4H_9, R_2, R_3 = $COCH_3$).

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan di-(3-deoksi-D-glyseropentuloosi)-dianhydridi (kaava II, R = H).

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan diasetyyli-di-(3-deoksi-D-glyseropentulosidi)-dianhydridi (kaava II, R = $COCH_3$).

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan triasetyyli-3-deoksi-D-glyseropentulosidi.

FIG.1

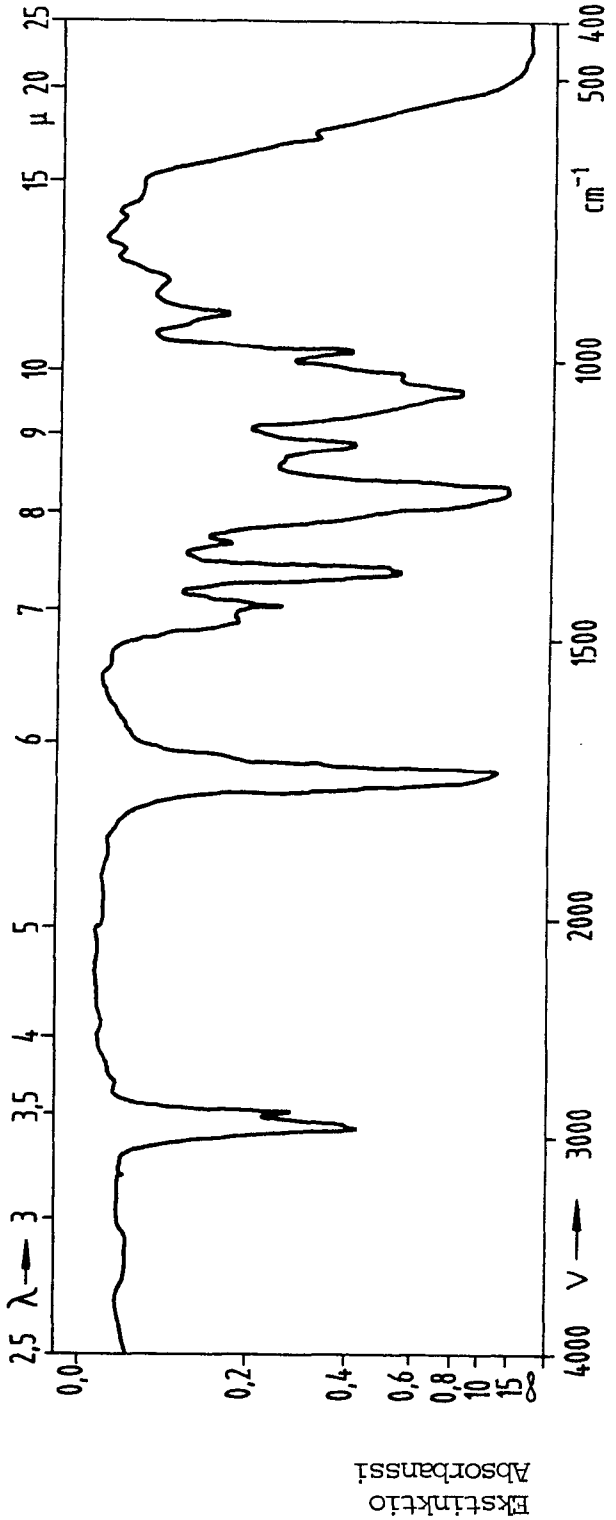
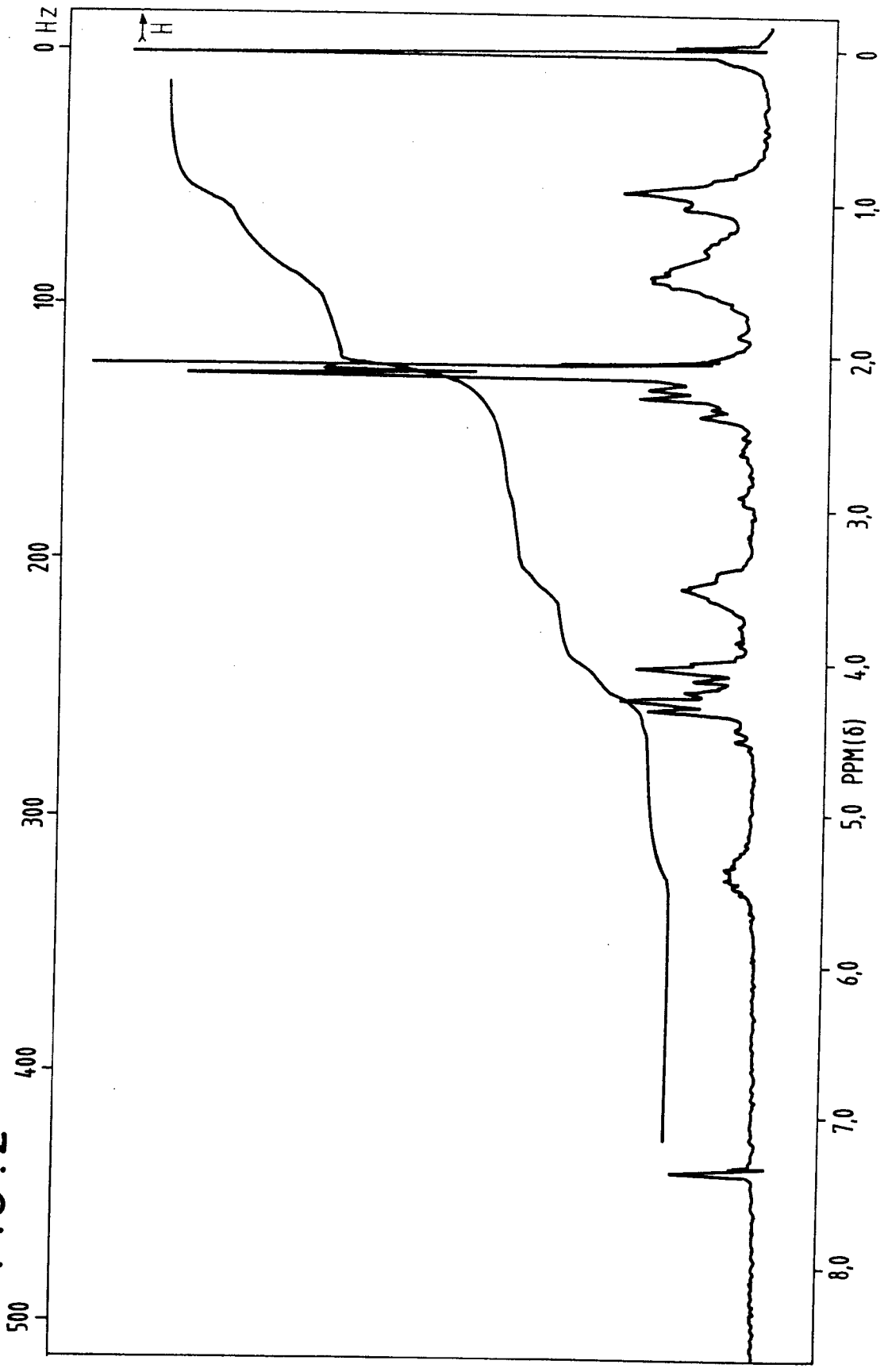

Ekstinktio
Absorbanssi
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,5
2,5 λ 3
3,5
4
5
6
7
8
9
10
15 μ 20
25
4000 ν 3000
2000
1500
1000
cm-1
500
400

FIG. 2



n-butyyli-1,4-diasetyyli-3-deoksi-D-glyseropentulosidi
Liuotin: $CDCl_3$

FIG. 3

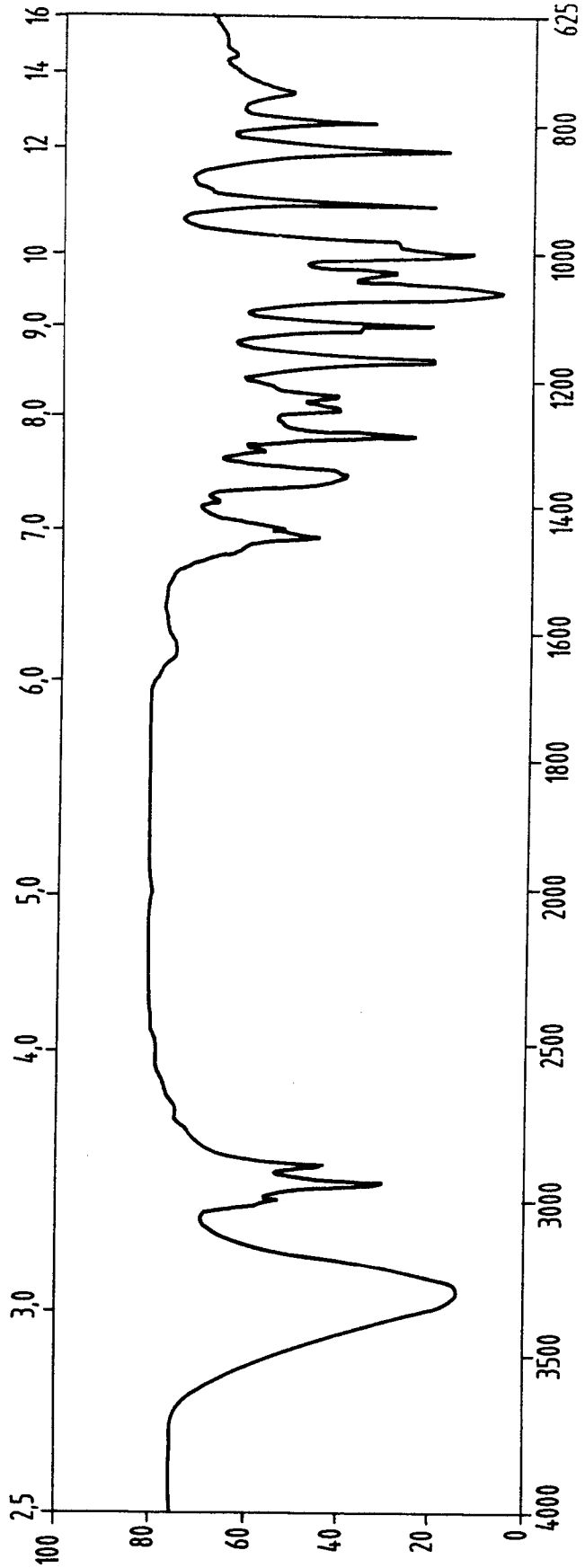

2,5
3,0
4,0
5,0
6,0
7,0
8,0
9,0
10
12
14
16
100
80
60
40
20
0
4000
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
625
Aaltoluku (CM-1)
Di(3-deoksi-D-glyseropentuloosi-dianhydridi

FIG.4

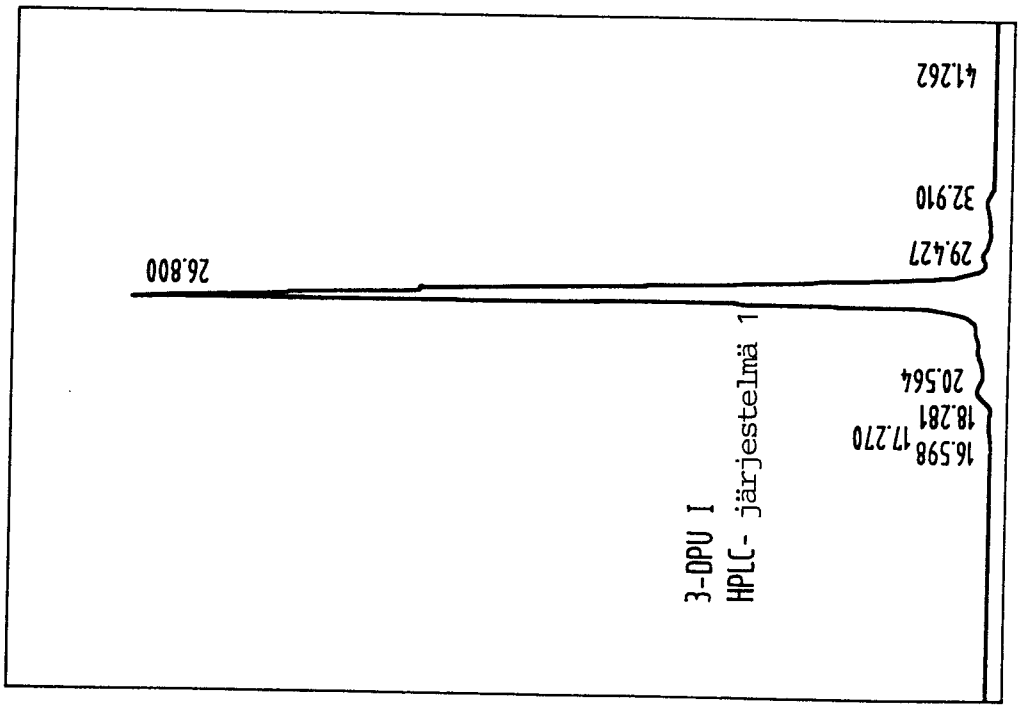

3-DPU I
HPLC- järjestelmä 1
16.598
17.270
18.281
20.564
26.800
29.427
32.910
41.262

FIG.5

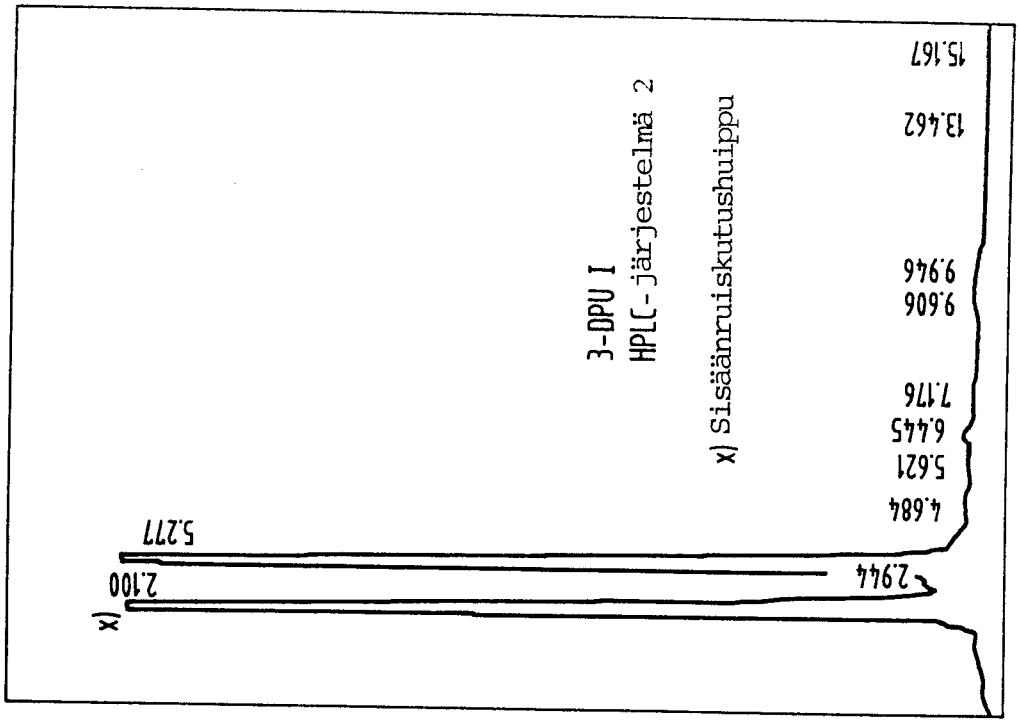
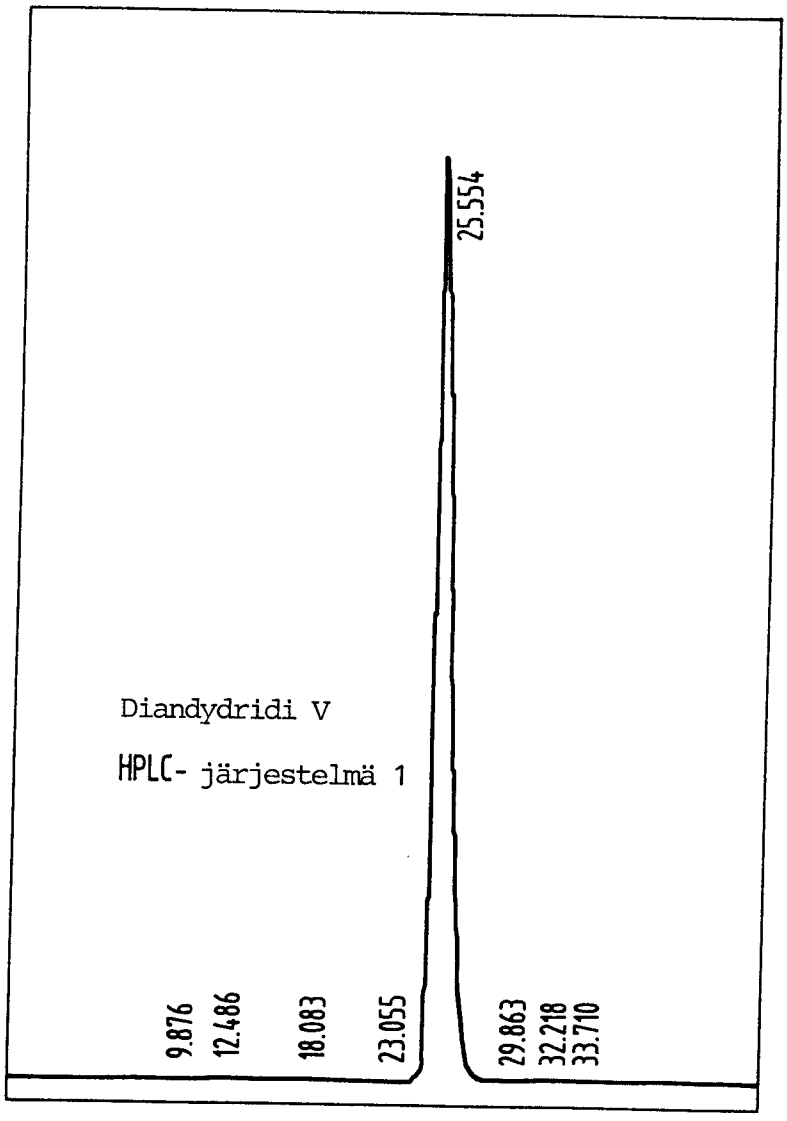

3-DPU I
HPLC- järjestelmä 2
x) Sisäänruiskutushuippu
x)
2.100
2.944
4.684
5.277
5.621
6.445
7.176
9.606
9.946
13.462
15.167

FIG.6


Diandydridi V
HPLC- järjestelmä 1
9.876
12.486
18.083
23.055
25.554
29.863
32.218
33.710

PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS
PATENTTIOSASTO

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAK.NRO	LUOKKA	TUTKIJA	TUTKIMUSTUL. SAATU
906181	C07H 3/02	NH	EP NO DK

TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT												TUTK. KESK. *)
	FI	SE	NO	DK	CH	DE	WO	EP	GB	US			
C07H 3/- -	X												
15/-													

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		
7)		
8)		
9)		

*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA

KÄÄNNÄ!

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA, HAKUSANAT YM.)

1. Chemical Abstracts, vol.64 (1966), 8571a : Biochim. Biophys. Acta 110(3),627-9(1965);
2. Chemical Abstracts, vol.64 (1966), 5280c : Hyogo Noka Daigaku Kenkyu Hokoku, Nogei-kagaku Hen 6(2), 73-80(1964).

HELSINKI 31.8.1995
PÄIVÄYS

ALLEKIRJOITUS