

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 930379 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **930379**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07C 49/727

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date **31.07.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **29.01.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.03.1993**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **31.07.1991 PCT/US1991/005431**
Internationell ansökan - International
application

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

01.08.1990 US 561964

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Scripps Clinic and Research Foundation, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Skokotas, Golfo, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Nicolaou, Kyriacos C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Golfomysiinijohdannaiset: uudet fuusiorengassyklodekadiyynijohdannaiset

Golfomycinderivat: nya fusionsringcyklodecadiynderivat

Golfomysiini johdannaiset: uudet fuusioirenkaiset syklodekadiyynijohdannaiset

- 5 Esillä oleva keksintö kuvaa uusia DNA:ta halkaisevia, anti-bioottisia ja kasvaimia torjuvia yhdisteitä ja erityisesti ryhmää 5-hydroksibentso-(1',2')-syklodeka-2,7-diyn-1-oni-yhdisteitä, jotka sisältävät asemassa 9,10 olevan aromaattisen monosyklisen tai bisyklisen fuusioituneen rengassysteemin ja joihin viitataan tässä yhteydessä nimillä golfomysiini ja sen johdannaiset.

Luonnontuotteet ovat kiinnostaneet ja kiehtoneet hyvin pitkään eristys-, synteesi- ja lääkekemistejä mielenkiintoisten rakenteidensa ja biologisten aktiivisuuksiensa johdosta. Keinotekoiset molekyylit ("designer-molekyylit"), joiden kemialliset ja biologiset ominaisuudet on määriteltä edeltäkäs in, voivat rikastuttaa ja täydentää tätä ainevalikoimaa sekä lisätä biologisesti ja terapeuttisesti hyödyllisten yhdisteiden kemiallisia valmistusmahdollisuuksia.

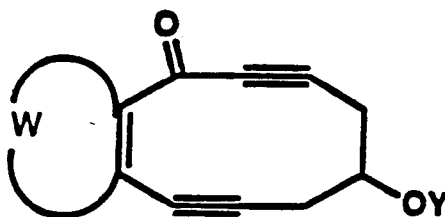
Tässä kuvataan uusien DNA:ta halkaisevien ja kasvaimia torjuvien designer-molekyylien suunnittelua, synteesiä sekä kemiallisia ja biologisia ominaisuuksia; keinotekoisista DNA:ta halkaisevista molekyyleista on muutamia tuoreita esimerkkejä seuraavissa viitteissä: (a) Nicolaou et al., Am. Chem. Soc., 110:7247 (1988); (b) Nicolaou et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 28:1272 (1989); (c) Povsic et al., J. Am. Chem. Soc., 111:3059 (1989); (d) Hertzberg et al., J. Am. Chem. Soc., 104:313 (1982); (e) Moser et al., Science, 238:645 (1987); (f) Corey et al., J. Am. Chem. Soc., 111:8523 (1989); (g) Pyle et al., J. Am. Chem. Soc., 111:4520 (1989); (h) Sigman, J. Am. Chem. Soc., 111:4941 (1989); (i) Ohno et al., J. Am. Chem. Soc., 112:0000 (1990); (j) Danishefsky, J. Org. Chem., 54:2781 (1989).

Keinotekkoisten DNA:ta halkaisevien yhdisteiden lisäksi myös luonnossa esiintyviä eenidiyyni-yhdisteitä on tutkittu. Luonnossa esiintyvien eenidiyynien joukkoon kuuluvat kali-

keamisiini ja esperimisiini, joiden aglykoniosat ovat olen-
 naisesti identtiset, mutta joiden sokeriosuudet eroavat
 toisistaan [(a) Lee et al., J. Am. Chem. Soc., 109:3464,
 3466 (1987); (b) Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc.,
 5 110:7247 (1988); (c) Hawley et al., Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 86:1105 (1989); (d) Golik et al., J. Am. Chem. Soc.,
109:3461, 3462 (1987)] sekä neokarsinostatiini, joka sisäl-
 tää myös sokerijohdannaisivuketjuja [(a) Edo et al., Tetra-
hedron Lett., 26:331 (1984); Chin et al., Biochemistry,
 10 27:8106 (1988); (c) Lee et al., Biochemistry, 28:1019
 (1989)].

Tässä keksinnössä tarkastellaan uusia DNA:ta halkaisevia,
 antibioottisia ja kasvaimia torjuvia yhdisteitä, joihin
 15 viitataan tässä yhteydessä nimillä golfomysiini ja sen
 johdannaiset. Keksinnön mukaisen yhdisteen rakennekaava on

20



25

jossa ryhmä Y valitaan ryhmästä, joka sisältää vedyn,
 trimetyylisilyylin, formyylin, asetyylin, propionyylin,
 butyryyliin, 2-metyyllibutyryyliin, heksanoyyliin, butyryyliin,
 2-metyyllibutyryyliin, heksanoyyliin, [C₁-C₆-akryyli]bentsoyy-
 30 llin, fosfaattiesterin kahden yksiarvoisen metalli-ionin
 kanssa muodostaman suolan (PO₃M₂);

35

ja rengas W yhdessä kuvatus vinyleeniryhmän tyydyttymättö-
 mien hiiliatomien kanssa muodostaa aromaattisen monosyklisen
 renkaan tai bisyklisen fuusioituneen rengassysteemin, joka
 sisältää viisi tai kuusi atomia renkaassa, jossa on kuvattu
 vinyleeniryhmä.

Yhdisteet, joissa rengas W on bentso- ja naftoryhmä, ovat erityisen edullisia.

5 Tarkastellaan myös farmaseuttista seosta, joka sisältää edellä määriteltä, fysiologisesti siedettävään laimentimeen liuotettua tai dispersoitua yhdistettä siinä määrin, että se halkaisee DNA:ta, tappaa mikrobeja ja estää kasvainten kasvua.

10 Tarkastellaan myös menetelmää, jossa edelläkuvattua seosta käytetään. Tällöin halkaistava DNA, tuhottavana olevat mikrobisolut tai ne kasvainsolut, joiden kasvu halutaan estää johdetaan kosketukseen edelläkuvatun seoksen kanssa. Kontaktia ylläpidetään niin kauan kuin on tarpeellista
15 halutun tuloksen aikaansaamiseksi. Tarkastellaan myös seoksen monia antamistapoja.

Piirroksissa, jotka muodostavat osan tätä julkaisua,

20 Kuvio 1 esittää reaktiokaavaa (kaavio 1), joka määrittää keksinnön mukaisen yhdisteen ja erityisesti yhdisteen 1, golfomysiinin, DNA:ta halkaisevien ominaisuuksien mekanistiset perusteet. Kaaviossa kaksi elektronia sisältävä nukleo-
fiili RNuH reagoi yhdisteen 1 kanssa muodostaen välituote-
25 yhdisteen 2, joka muodostaa renkaan tuottaen biradikaalin 3, joka puolestaan voi halkaista DNA:n polkua a pitkin. Toisella polulla DNA toimii kaksi elektronia sisältävänä nukleo-
fiilinä (DNA-Nu), joka liittyy ristikkäin konjugoituun asetyleeniin muodostaen varatun yhdisteen 4, joka halkaisee
30 DNA:n polkua b pitkin.

Kuvio 2 esittää reaktiokaavion (kaavio 2) yhdisteen 1, golfomysiini A, valmistamiseksi yhdisteestä 5.

35 Kuvio 3 on valokuva etidiumbromidilla värjätystä 1- prosenttisesta agarosigeelistä, joka esittää Φ X174:n halkaisua DNA:sta yhdisteellä 1 1000 μ M pitoisuudessa 20 tunnin kulut-

tua 37°C:ssa eri pH-arvoilla. Kaista 1 esittää DNA:ta yksinään pH:n ollessa 8,5. Kaistat 2-11 vastaavat reaktioita, joiden on annettu tapahtua pH:n ollessa vastaavasti 5,0, 6,0, 7,0, 7,4, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 ja 10,7. Muodot I, II ja III valokuvan vasemmalla puolella esittävät vastaavasti ylikietoutuneen (muoto I), auenneen (muoto II) ja lineaarisen (muoto III) DNA:n suhteellisia kulkemia.

Kuvio 4 esittää reaktiokaaviota (kaavio 3), jonka mukaan golfomysiini A (yhdiste 1) reagoi DBU:n läsnäollessa.

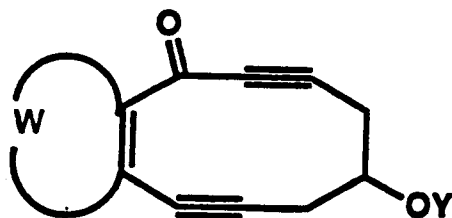
Kuvio 5 esittää kahta toisiinsa liittyvää reaktiokaaviota (a ja b) (kaavio 4), jonka mukaan yhdisteet 12 ja 15 reagoivat metyyliitioglykolaatin kanssa DBU:n ja emäksen läsnäollessa.

Kuvio 6 esittää reaktiokaavion (kaavio 6) naftyyliigolfomysiinin, yhdisteen 37 synteesille yhdisteestä 30 lähtien.

Kuvion 1 kaavio 1 valaisee mekanistista perustetta, joka johti yhdisteen 1 (golfomysiini A), DNA:ta halkaisevan molekyylin suunnitteluun. Kahta vaihtoehtoista reaktiota pidettiin todennäköisinä: nukleofiilinen reaktio, joka johtaa diradikaalin syntyyn ja nukleofiilinen reaktio, joka johtaa varatun yhdisteen muodostumiseen.

Nukleofiilinen reaktio (esim. kofaktorin tai DNA:n) ja ynioni-funktionaaliseen ryhmän välillä johtaisi alleeni-eeni-yni -rakenteen muodostumiseen, jonka oletettiin edellisten tulosten perusteella muodostavan helposti renkaan ja siten diradikaalin 3. Yhdisteen 3 oletettiin sitten halkaisevan DNA:n radikaalimekanismilla (a, kaavio 1). Toisaalta DNA:n nukleofiilinen reaktio yhdisteen 1 kanssa voisi synnyttää yhdisteen 4, jonka odotettiin muuttuvan kemiallisesti johtaen DNA:n halkeamiseen nukleofiilisen mekanismin mukaisesti (b, kaavio 1). Yhdisteen 1 erityisen jännittyneen olomuodon oletettiin helpottavan kaaviossa 1 ehdotettujen reaktioiden tapahtumista.

Näiden halutut ominaisuudet omaavien yhdisteiden yleinen rakennekaava esitetään alla:



10

jossa ryhmä Y valitaan ryhmästä, joka sisältää vedyn, trimetyylisilyylin, formyylin, asetyylin, propionyylin, butyryylin, 2-metyylibutyryylin, heksanoyylin, butyryylin, 2-metyylibutyryylin, heksanoyylin, $[C_1-C_6\text{-akryyli}]$ bentsoyylin, fosfaattiesterin kahden yksiarvoisen metallin kanssa muodostaman suolan (PO_3M_2); ja

20

rengas W yhdessä kuvatun vinyleeniryhmän tyydyttymättömien hiiliatomien kanssa on aromaattinen monosyklinen rengas tai kaksirenkainen fuusioitunut rengassysteemi, joka sisältää viisi tai kuusi atomia renkaassa sisältäen kuvatun vinyleeniryhmän.

25

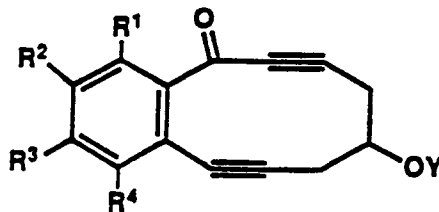
Edelleen rengassysteemiin W voi olla sitoutuneena eri asemiin (muihin kuin dekadyylnirenkaaseen fuusioitumista varten tarvittaviin) joukko substituentteja kuten metyyli, etyyli, isopropyyli, n-propyyli, isopropyyli, sek-butyli, t-butyli (C_1-C_6 -alkyyli), metoksi, etoksi, propoksi, butoksi, isobutoksi, syklopentyylioksi, sykloheksyylioksi, (C_1-C_6 -alkoksi), perfluorimetyyli, perfluorimetoksi, hydroksyyli, C_1-C_6 -asyylioksi, bentsyylioksi, nitro, halogeeni (fluori, kloori, bromi ja jodi) ja amino, jonka kaava on NR^5R^6 , jossa R^5 valitaan vetyn (H), C_1-C_6 -alkyylin, bentsyylin, C_1-C_6 -alkyylin ja bentsoyylin sisältävästä ryhmästä ja R^6 valitaan vetyn, C_1-C_6 -alkyylin ja bentsyylin sisältävästä ryhmästä tai NR^5R^6 muodostaa 5- tai 6-jäsenen renkaan.

30

35

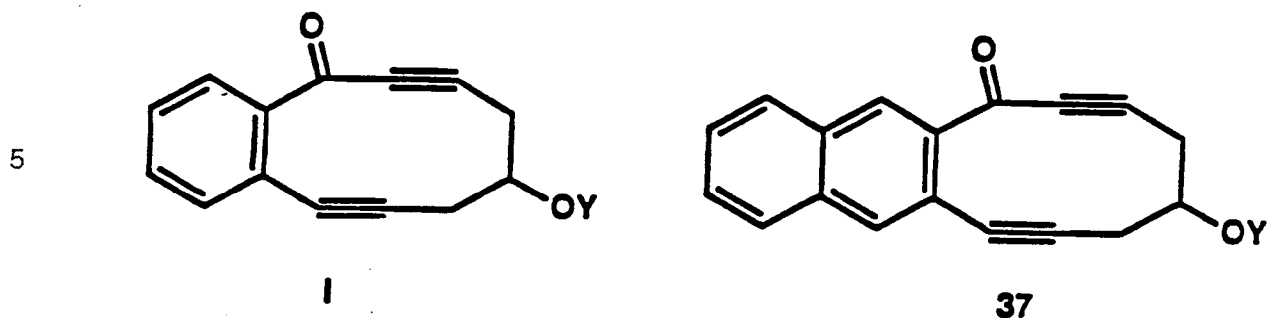
Esimerkkeinä substituoimattomista W-renkaista ovat bentseeni, furaani, tiofeeni, pyridiini, oksatsoli, pyratsiini, pyrimidiini, naftaleeni, bentsofuraani, bentsotiofeeni, isobentsofuraani, isobentsotiofeeni, N-C₁-C₆-alkyyliindoli, N-C₁-C₆-alkyyli-isoindoli, N-C₁-C₆-alkyylibentsimidatsoli, kinoliini, isokinoliini, bentsoksatsoli ja kinoksaliini.

Yllämainituista W-renkassysteemeistä pidetään edullisina bentso- ja naftorenkaita ja edullisimpana bentsorengasta. Myös korvattua bentsorengasta kuten muitakin korvattuja rengassysteemejä W tarkastellaan ja 1-4 substituentit voidaan liittää jäljelläoleviin asemiin, joita ei ole käytetty fuusiossa dekadiyyni-makrorenkaaseen. Nämä substituentit voidaan myös yhdistää pareittain ja muodostaa toinen fuusioitunut aromaattinen rengas. Alla on kuvattu sellaisen yhdisteen rakennekaava, jossa Y on edellä määritellyn mukainen.



missä R¹, R², R³ ja R⁴ valitaan toisistaan riippumatta edellä kuvatuista substituentteista tai missä R¹ ja R², R² ja R³ tai R³ ja R⁴ yhdessä kuvatun bentsorengaan kanssa muodostavat fuusioituneen kaksirenkaisen aromaattisen rengassysteemin.

Erityisen edullisina keksinnön mukaisina yhdisteinä pidetään golfomysiiniä A (yhdiste 1) ja naftyyligolfomysiiniä (yhdiste 37), joiden rakenteet on esitetty alla, missä Y on edellä määritetty.



10

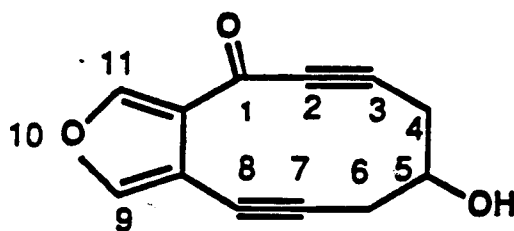
Mikäli kyseessä on muuten substituoimaton fenyylirengas W, rakenne on symmetrinen ja sen vuoksi isomeerit eivät ole mahdollisia fenyylirengaan luonteen takia. Tämä ei koske
 15 heterosyklisiä rakenteita kuten furaania. Furaani voi fuusioitua W-renkaana ainoastaan pitkin furaanin 2-3, 3-4 tai 4-5 -sivuja, mutta happi voi olla joko samalla tai vastakkaisella puolella kuin ketoryhmä syklodekadiyynirenkaassa. Jotta vältetään sekaannus näiden heterosyklisten renkaiden fuusioitumista käsiteltäessä, tässä yhteydessä käytettävä järjestelmä antaa heterosyklisen renkaan (Chemical Abstracts'in järjestelmä) asemanumerot fuusioitumisen suunnassa, joka annetaan numeroparilla, joista ensimmäinen numero tarkoittaa asemaa, joka on lähinnä syklodekadiyynirenkaan ketoryhmää.

Esimerkiksi furaanirenkaan numerointi alkaa hapella, joka merkitään 1':lla ja loput numeroista annetaan renkaan ympäri. Siten fuusioituminen voi tapahtua 3',4'-sidoksessa, mikä voi johtaa symmetriseen rakenteeseen. Sivut 2',3' voi kuitenkin olla orientoitunut siten, että happi on joko samalla tai vastakkaisella puolella kuin ketoryhmä viereisessä renkaassa. Jotta voidaan erottaa nämä kaksi mahdollisuutta, merkin-
 30 tä 3',2' osoittaa, että asema 3' furaanirenkaassa on sitoutunut ketoryhmään. Päinvastainen merkintä 2',3' osoittaa, että asema 2' on sitoutunut ketoryhmään. Siten minkä tahansa heterosyklisen tai asymmetrisen, syklodekadiyynirenkaaseen

fuusioituneen renkaan W fuusiota osoittava ensimmäinen numero ilmaisee ketoryhmään sitoutuneen atomin.

Täysin fuusioituneen rengassysteemin numerointi alkaa keto-ryhmällä ja jatkuu ensin asetyleenirenkaan ympäri ja sitten aromaattisen renkaan ympäri. Sillanpääasemia ei numeroida koska näiden asemien substituutio ei ole enää mahdollista. Heittomerkillä merkityt asemat, jotka osoittavat aromaattisen renkaan heteroatomin orientoitumisen merkitään sulkuihin.

5-hydroksifurano-(3',2')-syklodeka-2,7-diyn-1-onin rakenne on esitetty alla hiiliatomien numerointineen:



Seuraavassa taulukossa on esitetty useita esimerkkejä tämän keksinnön mukaisista ryhmällä H ja C₁-C₆-alkyyli korvatuista yhdisteistä, joissa fuusioituneiden rengasyhdisteiden asemat on numeroitu yllä esitetyn Chemical Abstracts'in järjestelmän mukaisesti. Lyhyiden vuoksi on esitetty ainoastaan 3',4'- ja 3',2'-fuusiot.

FUUSIOITUNEET (3',4')- ja (3',2')-FURAANIJOHDANNAISET

	<u>Fuusio</u>	<u>Asema 9</u>	<u>Asema 10</u>	<u>Asema 11</u>
	3',4'	H	-	H
	"	metyyli	-	H
5	"	H	-	metyyli
	"	metyyli	-	metyyli
	"	propyyli	-	H
	"	H	-	propyyli
	"	propyyli	-	butyyli
10	"	metyyli	-	sykloheksyyli
	"	propyyli	-	metyyli
	"	etyyli	-	H
	"	H	-	etyyli
	"	etyyli	-	pentyyli
15	"	etyyli	-	etyyli
	"	heksyyli	-	propyyli
	"	metyyli		etyyli
	"	propyyli		butyyli
	3',2'		H	H
20	"		metyyli	H
	"		H	metyyli
	"		metyyli	metyyli
	"		etyyli	H
	"		H	etyyli
25	"		pentyyli	etyyli
	"		metyyli	etyyli
	"		etyyli	metyyli
	"		H	propyyli
	"		propyyli	H
30	"		propyyli	propyyli
	"		sykloheksyyli	metyyli
	"		metyyli	propyyli
	"		propyyli	etyyli
	"		etyyli	2-metyyli
35				butyyli

Yllä esitetyissä yhdisteissä asemissa 9, 10 ja 11 olevat substituentit voivat olla kaikki erilaisia tai kaikki saman-

laisia, eivätkä ainoastaan ryhmiä H (vety) tai C_1-C_6 -alkyyli, kuten taulukossa esitetään vaan myös kuten edellä on esitetty. Aseman 5 substituentti on -OY ja se on edellämääritellyn mukainen.

5

Seuraavassa on esimerkkejä monoaromaattisista fuusioituneista W-rengasjärjestelmistä:

	<u>Aromaattinen Rengas</u>	<u>Fuusio</u>	<u>Asema</u>			
			<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
10	fenyyli	1',2'	x	x	x	x
	furaani	3',4'	x	-	x	-
	furaani	2',3'	-	x	x	-
	furaani	3',2'	-	x	x	-
15	tiofeeni	3',4'	x	-	x	-
	tiofeeni	2',3'	-	x	x	-
	tiofeeni	3',2'	-	x	x	-
	pyridiini	3',2'	-	x	x	x
	pyridiini	2',3'	x	x	x	-
20	pyridiini	3',4'	x	x	-	x
	pyridiini	4',3'	x	-	x	x
	oksatsoli	4',5'	-	-	x	-
	oksatsoli	5',4'	x	-	-	-
	oksatsoli	3',4'	x	-	-	-
25	oksatsoli	4',3'	-	-	x	-
	pyratsiini	2',3'	-	x	x	-
	pyrimidiini	5',6'	-	x	-	x
	pyrimidiini	6',5'	x	-	x	-
	pyridiini	2',3'	-	-	-	-
30	pyridiini	2',3'	-	x	-	-
	pyridiini	2',3'	-	-	x	x
	pyridiini	3',4'	-	-	x	-
	pyridiini	3',2'	-	x	-	-

35

Ylläolevassa taulukossa lueteltujen monoaromaattisten yhdisteiden asemissa 9, 10, 11 ja 12 olevat substituentit voivat olla kaikki samanlaisia tai erilaisia ja ne on esitelty

edellä. Aseman 5 substituentti on edelleen edellä määritelty -OY.

Seuraava taulukko sisältää sopivia johdannaisia renkaan W
5 ollessa bisyklinen aromaattinen rengasjärjestelmä;

			<u>Asema</u>						
<u>Aromaattinen Rengas</u>			<u>Fuusio</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>
10		naftaleeni	6',7'	x	x	x	x	x	x
		naftaleeni	5',6'	x	x	x	x	x	x
		naftaleeni	6',5'	x	x	x	x	x	x
		bentsofuraani	2',3'	x	x	x	x	-	-
		bentsofuraani	3',2'	-	x	x	x	x	-
15		bentsofuraani	5',6'	x	-	x	x	x	-
		bentsofuraani	6',5'	x	x	x	-	x	-
		bentsofuraani	6',7'	-	x	x	x	x	-
		bentsofuraani	7',6'	x	x	x	x	-	-
		bentsofuraani	4',5'	x	x	-	x	x	-
20		bentsofuraani	5',4'	x	x	-	x	x	-
		bentsotiofeeni	2',3'	x	x	x	x	-	-
		bentsotiofeeni	3',2'	-	x	x	x	x	-
		bentsotiofeeni	5',6'	x	-	x	x	x	-
		bentsotiofeeni	6',5'	x	x	x	-	x	-
25		bentsotiofeeni	6',7'	-	x	x	x	x	-
		bentsotiofeeni	7',6'	x	x	x	x	-	-
		bentsotiofeeni	4',5'	x	x	-	x	x	-
		bentsotiofeeni	5',4'	x	x	-	x	x	-
		isobentsofuraani	5',6'	x	x	-	x	x	-
30		isobentsofuraani	4',5'	x	x	x	-	x	-
		isobentsofuraani	5',4'	x	-	x	x	x	-
		isobentsotiofeeni	5',6'	x	x	-	x	x	-
		isobentsotiofeeni	4',5'	x	x	x	-	x	-
		isobentsotiofeeni	5',4'	x	-	x	x	x	-
35		N-metyyli-indoli	3',2'	-	x	x	x	x	-
		N-etyyli-indoli	2',3'	x	x	x	x	-	-
		N-butyli-indoli	5',6'	x	-	x	x	x	-
		N-propyyli-indoli	6',5'	x	x	x	-	x	-

	N-sykloheksyyli-indoli	4',5'	x	x	-	x	x	-
	N-metyyli-indoli	5',4'	x	x	-	x	x	-
	N-isopropyli-indoli	6',7'	-	x	x	x	x	-
	N-pentyyli-indoli	7',6'	x	x	x	x	-	-
5	N-metyyli-isoindoli	5',6'	x	x	-	x	x	-
	N-metyyli-isoindoli	4',5'	x	x	x	-	x	-
	N-metyyli-isoindoli	5',4'	x	-	x	x	x	-
	N-metyylibentsimidatsoli	5',6'	x	-	x	-	x	-
	N-isopentyylibentsimidatsoli	6',5'	x	-	x	-	x	-
10	N-etyylibentsimidatsoli	4',5'	x	x	-	x	-	-
	N-pentyylibentsimidatsoli	5',4'	-	x	-	x	x	-
	N-butyylibentsimidatsoli	6',7'	-	x	-	x	x	-
	N-heksyylibentsimidatsoli	7',6'	x	x	-	x	-	-
	kinoliini	2',3'	x	x	x	x	x	-
15	kinoliini	3',2'	-	x	x	x	x	x
	kinoliini	3',4'	x	x	x	x	-	x
	kinoliini	4',3'	x	-	x	x	x	x
	kinoliini	5',6'	x	x	-	x	x	x
	kinoliini	6',5'	x	x	x	-	x	x
20	kinoliini	6',7'	x	-	x	x	x	x
	kinoliini	7',6'	x	x	x	x	-	x
	kinoliini	7',8'	-	x	x	x	x	x
	kinoliini	8',7'	x	x	x	x	x	-
	isokinoliini	3',4'	x	x	x	x	-	x
25	isokinoliini	4',3'	x	-	x	x	x	x
	isokinoliini	6',7'	x	-	x	x	x	x
	isokinoliini	7',6'	x	x	x	x	-	x
	bentsoksatsoli	4',5'	x	x	-	-	x	-
	bentsoksatsoli	5',4'	x	-	-	x	x	-
30	bentsoksatsoli	5',6'	x	-	-	x	x	-
	bentsoksatsoli	6',5'	x	x	-	-	x	-
	bentsoksatsoli	6',7'	-	-	x	x	x	-
	bentsoksatsoli	7',6'	x	x	x	-	-	-
	kinoksaliini	2',3'	-	x	x	x	x	-
35	kinoksaliini	5',6'	-	x	x	x	x	-
	kinoksaliini	6',5'	-	x	x	-	x	x
	kinoksaliini	6',7'	x	-	x	x	-	x

Yllä olevassa taulukossa substituentit (x) asemissa 9-14 voivat olla kaikki erilaisia tai samanlaisia ja ne ovat edellä määritellyn mukaisia. Aseman 5 substituentti on -OY kuten edellä on määritelty.

5

Tässä yhteydessä pidetään erityisen edullisena golfomysiini A:ta, jossa yleistetyn kaavan W yhdessä vinylideeniryhmän hiilien kanssa muodostaa bentseenirenkaan ja naftyylogolfomysiiniä, jossa W yhdessä vinylideeniryhmän hiiliatomien kanssa muodostaa naftaleenirenkaan.

10

Keksinnön yhdiste on helppo valmistaa. Siten renkaan W muodostavan aromaattisen yhdisteen, joka sisältää halogeeniryhmän, edullisesti jodin, ja sen vieressä olevan estetyn hydroksimetyyliryhmän, annetaan reagoida 4-O-suojatun-hepta-1,7-diyynin kanssa palladiumtrifenyylifosfeenin ja kuparijodidin läsnäollessa. Reaktion seurauksena aromaattinen halidi kuluu ja 4-O-suojattu-hepta-1,7-diyyini liittyy aromaattiseen renkaaseen.

20

Hydroksimetyyliryhmää suojaava (estävä) ryhmä, tavallisesti trialkyylisilyyliryhmä kuten t-butyylidimetyylisilyyli poistetaan ja alkoholi hapetetaan aldehydiksi. Kymmenjäseninen rengas suljetaan poistamalla vapaa asetyleenivety sopivalla emäksellä kuten esimerkiksi di-(trimetyylisilyyli)-amiinilla. Syntyvän asetyleenikarbanioidin reaktiolla aldehydyhmän kanssa suljetaan rengas, jolloin aldehydistä syntyy sekundäärinen alkoholiryhmä.

25

30

Syntyvä alkoholi hapetetaan, jolloin muodostuu fuusioidun rengassysteemin ketoniryhmä. Alkuperäisen 4-O-suojatun-hepta-1,7-diyynin suojaryhmä poistetaan, jolloin muodostuu alkoholi, joka voidaan käyttää sellaisenaan tai sen voidaan antaa reagoida edelleen fosfaatin tai muiden estereiden muodostamiseksi.

35

Mitä erityisesti golfomysiini A:n synteesiin tulee, yhdistettä 1 käytetään tämän reaktiosarjan erityisenä esimerkkinä ja sen synteesi on kuvattu yksityiskohtaisesti kuvion 2 kaaviossa 2.

5

Siten Grignard-reagenssin, yhdisteen 5 ylimäärän reagoidessa etyyliformaatin kanssa syntyi diasetyyleeni-4,0-suojattua hepta-1,7-diyyniä, yhdistettä 6 (80 prosenttia), joka silyloitiin yhdisteen 7 (95 prosenttia) tuottamiseksi. Liittämällä yhdiste 7 aromaattisen jodidiyhdisteen, yhdisteen 8 kanssa $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{-CuI}$:n ollessa katalyyttinä saatiin yhdistettä 9 (70 prosenttia), mikä hapetettiin MnO_2 :lla jolloin saatiin asetyleenialdehydiyhdistettä 10 (82 prosenttia). Yhdisteestä 10 ja $\text{KN}(\text{SiMe}_3)_2$:sta saadun asetylidin molekyylin sisäinen additio yhdisteen 10 aldehydifunktioon johti 10-jäseniseen rengasalkoholihydriin, yhdisteeseen 11 (51 prosenttia), jota hapetettiin varovasti (80 prosenttia) ja desilyloitiin (89 prosenttia), jolloin saatiin tuotteeksi haluttu yhdiste 1 sen silylieetterin (yhdiste 12) kautta.

20

Lähtöaineena oleva aromaattinen halogeenihydroksimetyyliyhdiste on tyypillisesti sinänsä tunnettu yhdiste tai se voidaan valmistaa alalla tunnetuilla menetelmillä. Eräässä esimerkisynteesissä visinaalinen aromaattinen aminohappo kuten 3-amino-2-naftenohappo, yhdiste 30, on lähtöaineena. Tämä reaktiojakso on esitetty kuvion 6 kaaviossa 5.

Siten karboksyyli-ryhmä esteröidään sopivan $\text{C}_1\text{-C}_6$ -alkyylialkoholin kuten metanolin kanssa ja esteriyhdiste 31, pelkistetään, jolloin muodostuu hydroksimetyylijohtannainen, yhdiste 32. Sopiva pelkistävä aine on di-isobutyylialumiinihydridi (DIBAL). Diatsotoimista seuraava reaktio jodidisuolan kuten KI:n kanssa muodostaa visinaalisen aromaattisen hydroksimetyylijodidihydriin 33, jonka annetaan reagoida yllä esitetyllä tavalla yhdisteen 6 kanssa, jolloin muodostuu osittain suljettua rengasmaista yhdistettä 34. Yhdiste 34 hapetetaan, jolloin muodostuu alkoholialdehydiyhdiste 35. Alkoholi

5 suojataan ja makrosyklinen rengas suljetaan, jolloin muodostuu alkoholiyhdistettä 36. Hapettamalla alkoholi vastaavaksi ketoniksi ja poistamalla alkoholia suojaava ryhmä saadaan tuotettua haluttua golfomysiini johdannaisista, tässä tapauksessa naftyyli golfomysiiniä, yhdistettä 37.

10 Kaupallisesti on saatavilla useita visinaalisia aromaattisia aminohappoja. Esimerkiksi Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI) myy yllämainittua aminonaftohappoa sekä 2-aminonikotiinihappoa ja 3-amino-pyratsiini-2-karboksyylihappoa, antraniilihappoa (2-aminobentsohappo) ja kolmella metyyli-

15 ryhmällä substituoituja antraniilihappoja. Lisäksi kaupallisesti on saatavilla useita hydroksimetyyliyhdisteitä, jotka täytyy vain sopivasti halogenoida tähän käyttötarkoitukseen. Esimerkiksi Aldrich toimittaa kaikkia kolmea hydroksimetyylipyridiiniä, sekä hydroksimetyyli-naftaleeneja että indoli-3-karbinolia.

20 Aromaattisia hydroksimetyyliyhdisteitä voidaan myös valmistaa vastaavista karboksyylihappoestereistä kuten edellä on mainittu. Pitäytyen samassa toimittajassa Aldrich Chemical Co. myy kolmea kinoliinikarboksyylihappoa, kahta indolikarboksyylihappoa ja indolikarboksyaldehydiä sekä pyratsiinikarboksyylihappoa ja kinoksaliinikarboksyylikloridia, jotka 25 kaikki voidaan pelkistää vastaaviksi hydroksimetyyliyhdisteiksi ja sen jälkeen halogenoida ja käyttää tämän keksinnön mukaisen yhdisteen valmistukseen.

30 Tämän keksinnön mukaista yhdistettä käytetään DNA:ta halkaisevana aineena sekä myös mikrobien vastaisena (antibioottisena) aineena ja solumyrkkinä (kasvaimia torjuvana aineena) samoin kuin dynamisiini A:ta, kalikeamisiinia, esperimisiinia ja neokarsinostatiinia. Sen vuoksi keksinnön mukaiseen 35 yhdisteeseen voidaan viitata myös nimillä "aktiivinen aine" tai "aktiivinen ainesosa".

DNA:n halkaisua voidaan analysoida käyttämällä jäljempänä kuvattuja tekniikoita tai myös niitä tekniikoita, joita kuvataan viitteissä Mantlo et al., J. Org. Chem., 54:2781 (1989), Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., 110:7147 (1989),
 5 Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., 110:7247 (1988) tai Zein et al., Science, 240:1198 (1988) ja näissä olevissa viitteissä. Mikrobien ja kasvainten vastaisen toiminnan määrittämiseen voidaan käyttää myös tekniikoita, joita on kuvattu yhdysvaltalaisessa patentissa n:o 4837206, jonka ilmoitukset
 10 liitetään tähän viitteenä, samoin kuin jäljempänä kuvattuja menetelmiä.

Edelläkuvatun yhdisteen voidaan osoittaa reagoivan myös Bergmanin rengasaromatisaatioreaktion mukaisesti bentsyyli-
 15 merkaptaanin, trietyyliamiinin ja 1,4-sykloksadieenin läsnäollessa, kuten viitteessä Haseltine et al., J. Am. Chem. Soc., 111:7638 (1989) on esitetty. Tässä reaktiossa tapahtuu tetrasyklinen reaktio kuten DNA:ta halkaistaessa, joten sitä voidaan käyttää lisävalikointiperusteena valittaessa aktiivisempia yhdisteitä.
 20

Siten tarkastellaan farmaseuttista seosta, joka sisältää edelläkuvattua, tämän keksinnön mukaista yhdistettä aktiivisena aineena. Farmaseuttinen seos valmistetaan millä tahansa
 25 farmasian alalla tunnetulla menetelmällä, joka käsittää aktiivisen yhdisteen ja kantaja-aineen yhdistämisen. Terapeuttista käyttöä varten tässä keksinnössä käytetty yhdiste voidaan antaa potilaalle tavanomaisten seosten muodossa. Nämä seokset voidaan valmistaa siten, että ne voidaan
 30 antaa suun kautta tai parenteraalisesti tai peräpuikkoina. Näissä seoksissa vaikuttava aine on tyypillisesti liuotettu tai dispergoitu fysiologisesti siedettävään kantaja-aineseen.

Kantaja-aineena tai laimentimena käytetään materiaalia, jonka avulla voidaan antaa aktiivista ainetta ja jonka
 35 täytyy olla "farmaseuttisesti hyväksyttävä". Tämä tarkoittaa

taa, että sen täytyy sopia yhteen muiden aineosasten kanssa ja että se ei saa olla haitallinen vastaanottajalleen. Siten tässä yhteydessä käytetään vaihdellen ilmaisuja "fysiologisesti siedettävä" ja "farmaseuttisesti hyväksyttävä" ja
 5 niillä tarkoitetaan molekyyliä tai seoksia, jotka eivät aiheuta allergisia tai vastaavia sopimattomia reaktioita, kuten ruuansulatushäiriöitä, huimausta ja vastaavia reaktioita niitä annettaessa nisäkkäille. Fysiologisesti siedettävän kantaja-aineen muodot voivat vaihdella laajasti riippuen
 10 valmisteesta, jota halutaan antaa ja antotavasta.

Esimerkkinä käyttökelpoisesta seoksesta tämän keksinnön mukainen yhdistettä (aktiivista ainetta) voidaan käyttää, liuotettuna tai dispersoituna nesteseoksiin kuten steriiliin
 15 suspensioon tai liuokseen, tai isotonisena valmisteena, joka sisältää sopivia suoja-aineita. Erityisen hyvin sopivia tähän tarkoitukseen ovat injektoitavat aineet, jotka koostuvat nestemäisistä, injektoitavista puskuroidoista tai pusku-roimattomista isotonisista ja steriileistä suola- tai glu-
 20 koosiliuoksista tai myöskin pelkästään vedestä tai etanolin vesiliuoksista. Muihin nesteisiin, joihin nämä yhdisteet voidaan sekoittaa potilaalle antamista varten kuuluvat maustetut emulsiot, jotka sisältävät ruokaöljyä kuten puuvillansiemenöljyä, sesamöljyä, kookospähkinäöljyä, maa-
 25 pähkinäöljyä ja vastaavia öljyjä sekä eliksiirejä ja vastaavia farmaseuttisia liuotteita. Lisäesimerkkejä nestemäisistä liuottimista on löydettävissä viitteestä Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA (1980).

30 Aktiivinen aine voidaan antaa myös liposomien muodossa. Kuten alalla on tunnettua, liposomit ovat yleensä fosfolipidien tai muiden lipidien johdannaisia. Liposomit muodostetaan yksi- tai useampilamellisista hydratoiduista nesteki-teistä, jotka on dispersoitu nestemäiseen aineeseen. Mitä
 35 tahansa myrkytöntä, fysiologisesti hyväksyttävää ja metabo-loituvaa rasvaa, joka voi muodostaa liposomeja, voidaan käyttää. Nämä liposomin muodossa olevat seokset voivat

sisältää stabilaattoreita, säilöntäaineita, täyteaineita ja vastaavia aineita vaikuttavan aineen lisäksi. Edullisia lipidejä ovat luonnolliset ja synteettiset fosfolipidit ja fosfatidyylikoliinit (lesitiinit).

5

Liposomien muodostamismenetelmät ovat alalla tunnettuja. Katso esimerkiksi Precott, Ed., Methods in Cell Biology, Vol. XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), s. 33 eteenpäin.

10

Aktiivista ainetta voidaan käyttää myös tabletti- ja pilleriseoksissa, jotka sisältävät edullisesti yksikköannoksen yhdistettä. Tätä tarkoitusta varten vaikuttava aine (aktiivinen ainesosa) sekoitetaan tavanomaisten tabletoimisaineiden kanssa kuten maissitärkkelyksen, laktoosin, sakkaroosin, sorbitolin, talkin, steariinihapon, magnesiumstearaatin, dikalsiumfosfaatin, kumien tai vastaavien materiaalien kuten myrkyttömien, fysiologisesti siedettävien kantaja-aineiden kanssa. Tabletit tai pillerit voidaan laminoida tai käsitellä muuten, jotta saadaan yksikköannoksia, joiden vaikutus on pitkäaikainen tai viivytetty.

20

25

On tarkoitus, että edellämainittujen kantaja-aineiden lisäksi tässä kuvatut farmaseuttiset seokset voivat sisältää, mikäli tarkoituksenmukasta, yhtä tai useampaa kantaja-aineesaa kuten laimentimia, puskureita, makuaineita, sideaineita, pinta-aktiivisia aineita, paksunnosaineita, voiteluaineita, säilöntäaineita (käsittäen hapetusta estävät aineet) ja vastaavia aineita, ja lisäksi voidaan reseptiin sisällyttää aineita, joiden avulla tehdään koostumus vastaanottajan veren kanssa isotoniseksi.

30

35

Tabletit tai pillerit voidaan myös varustaa kotelomaisella, enteerisellä päällysteellä, jolla estetään hajoaminen vatsalaukussa ja jonka ansiosta aktiivinen aine kulkeutuu muuttomattomina pohjukaissuoloen asti tai sen vapautumista voidaan hidastuttaa. Useita eri aineita voidaan käyttää tällaisiin

enteerisiin tai muihin päällystyksiin käsittäen polymeeriset hapot tai sellaisten happojen seokset esimerkiksi sellakan, sellakka- ja setyylialkoholin, selluloosa-asetaatiftalaatin ja vastaavien kanssa. Erityisen sopiva enteerinen päällyste sisältää styreenimaleiinihapon kopolymeeria yhdessä tunnet-
 5 tujen materiaalien kanssa, jotka osaltaan parantavat päällystyksen enteerisiä ominaisuuksia. Menetelmiä, joiden avulla voidaan valmistaa enteerisesti päällystettyä tabletteja kuvataan Sipos'in yhdysvaltalaisessa patentissa
 10 4079125, joka liitetään tähän viitteeksi.

Termillä "yksikköannos" tarkoitetaan tässä yhteydessä fyysisesti erillisiä yksikköjä, jotka sopivat annettaviksi jakamattomina annoksina lämmينverisille eläimille kunkin sellaisen yksikön sisältäessä ennalta määrätyn määrän vaikuttavaa ainetta, jonka on laskettu aiheuttavan haluttu terapeuttinen vaikutus farmaseuttisesti hyväksyttävän laimentimen kanssa. Esimerkkejä sopivista yksikköannosmuodoista, jotka ovat sopusoinnussa tämän keksinnön kanssa ovat tabletit, kapselit, pillerit, pulveripaketit, jyväset, keksit, teelusikalliset, tippa-annostimelliset, ampullit, lääkepullot, minkä tahansa edellämainitun eri kerrannaiset ja vastaavat.

Keksinnön mukaista yhdistettä on tällaisessa farmaseuttisessa seoksessa haluttuun tulokseen riittävä määrä. Esimerkiksi haluttaessa halkaista DNA in vitro, keksinnön mukaista yhdistettä voidaan käyttää siinä määrin, että saatu konsentraatio on välillä noin 1.0 - noin 5000 $\mu\text{mol/L}$ (μM) DNA:n konsentraation ollessa noin 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Käytettäessä keksinnön mukaista yhdistettä solumyrkkinä (kasvaimia torjuvana) aineena sen tehokas määrä on noin 0.1 - noin 15 mg ruumiinpainokiloa kohti tai määrä, joka on riittävä nostamaan aineen konsentraation veressä välille noin 0.01 - noin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Keksinnön mukainen yhdiste estää mikrobiologisen aktiivisuuden konsentraatiovälillä noin 0.01 - noin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Yllämainitut konsentraatiot ja annostukset vaihtelevat riippuen käytettävästä, erityisestä keksinnön mukaisesta

yhdisteestä ja sen kohteesta, joka voi olla esim. DNA, kasvain tai mikrobi, kuten tunnettua.

5 Keksinnön mukaista yhdistettä käytetään DNA:n halkaisuun, solumyrkkynä ja myös estämään neoplastisten solujen kasvua sekä tällaisen tuloksen aikaansaavassa menetelmässä. Keksinnön mukaista yhdistettä käytetään tyypillisesti edelläkuvatussa seoksessa.

10 Tämän menetelmän mukaisesti DNA tai kohteena olevat solut, jotka pitää tuhota tai joiden kasvu halutaan estää asetetaan kosketukseen seoksen kanssa, joka sisältää tämän keksinnön mukaista yhdistettä (aktiivista ainesosaa) tehokkaan tai tarpeellisen määrän yllämainittua tarkoitusta varten, liuotettuna tai dispersoituna fysiologisesti siedettävään (farmaseuttisesti hyväksyttävään) laimentimeen. Kontaktia ylläpidetään riittävän pitkän aikaa, jotta voidaan saavuttaa halutut tulokset eli halkaista DNA, tuhota solut tai estää neoplastisten solujen kasvu.

20

Jos tulos halutaan saavuttaa in vitro -olosuhteissa, kontaktia ylläpidetään yksinkertaisesti sekoittamalla DNA tai kohdesolut seoksen kanssa ja pitämällä niitä yhdessä sopivassa lämpötilassa ja solujen kasvulle sopivissa olosuhteissa, koska kontrollina on käsittelemättömiä soluja. Siten yksinkertainen sekoitus ja kontakti riittää tyypillisesti in vitro tarkoituksiin.

Ylläoleva menetelmä on myös käyttökelpoinen in vivo käsiteltäessä nisäkkäitä, kuten jyrsijöitä, esimerkiksi rottia, hiiriä tai kaniineja, maatalouseläimiä kuten hevosia, lehmiä tai vuohia tai kehittyneempiä eläimiä kuten apinoita ja ihmisiä. Tällöin yhdisteen kontakti tuhottaviin soluihin tai soluihin, joiden kasvua halutaan estää, saadaan aikaan antamalla seosta nisäkkäälle suun tai nenän kautta, anaalisesti, laskimonsisäisesti, ihonalaisesti tai intraperitone-

aalisesti. Siten kontakti in vivo saadaan aikaan veren tai imunesteen välityksellä.

5 Vaikka yksi ainoa antokerta (sekoitus) ja siitä seuraava kontakti riittävät tavallisesti ylläpitämään tarvittavan kontaktin ja aikaansaamaan halutun tuloksen in vitro, käytetään tyypillisesti useita antokertoja in vivo. Siten johtuen kehon hajotus- ja erityisreiteistä, seoksen aktiivisen aineksen ja kohdesolujen välistä kontaktia pidetään tyypil-

10 lisesti yllä antamalla keksinnön mukaista yhdistettä toistuvasti tietyn ajan kuten päivien, viikkojen tai kuukausien ajan tai pidempään riippuen kohdesoluista.

Esimerkinomaisia keksinnön mukaisia, DNA:n halkaisuun ja ihmisen haimasyöpäsolujen MIA PaCa-2 (ATCC CRL 1420) sekä

15 hiiren virtsarakon syöpäsolujen MB49 inhibitioon (jotka on saatu tohtori Lan Bo Chen:lta Dana Farber Cancer Research Instituutista, Boston MA:sta) soveltuvia menetelmiä on kuvattu jäljempänä.

20 Golfomysiini A:n (yhdiste 1) todettiin halkaisevan DNA:ta pH:sta riippuen kuten kuvassa 3 on osoitettu. Metyyylitioglykolaatin lisäys kofaktoriksi pikemminkin inhiboi kuin lisäsi yhdisteen 1 aktiivisuutta, kun taas katalaasin mukana olo ei aiheuttanut mitään mitattavissa olevaa vaikutusta halkaisuun.

25 Naftyyligolfomysiinillä, yhdisteellä 37 saatiin aikaan samanlainen DNA:n halkaisu.

Yhdisteen 1 kemialla tutkittiin sitten sen vaikutustavan selville saamiseksi, ja tätä kemialla kuvataan kuvion 4 kaaviossa 3.

30

Siten yhdiste 1 muuttui nopeasti reagoidessaan 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undeka-7-eenin (DBU) kanssa voimakkaasti fluoresoivaksi yhdisteeksi (75 prosenttia), joka osoitettiin rakenteeltaan yhdisteeksi 15 (golfomysiini B) sen spektrin ja kemiallisten ominaisuuksien perusteella.

35

Golfomysiini B (yhdiste 15) reagoi nopeasti NaBH_4 :n kanssa nollassa $^{\circ}\text{C}$:ssa, jolloin syntyi kvantitatiivisesti yhdistettä 16, jonka rakenne vahvistettiin röntgensädekristallografisella analyysillä sen p-bromibentsoaatista, yhdisteestä 17 (valmistettu yhdisteestä 16 saannon ollessa 80 prosenttia). Jotta voitaisiin selittää yhdisteen 15 muodostuminen yhdisteestä 1 emäksisissä olosuhteissa, oletettiin seuraavat, kuvion 4 kaaviossa 3 esitetyt reaktiot tapahtuviksi: a) retroaldolireaktio (1 13); b) emäsindusoitu isomeraatio (13 14) ja c) molekyylien välinen 4+2 -sykloadditio (14 15). Havaittu toinen DNA:n halkaisuaalto olosuhteissa, joissa $\text{pH} \geq 9$ saattaa merkitä tämän reaktiosarjan alkua. Alhaisen lämpötilan NMR-tutkimukset osoittivat, että yhdistettä 13 oli hetkellisesti reaktioseoksessa [-20 25°C , δ 9.77 (t, $J=2.5$ Hz, C HO)], mutta vastaavia yhdistettä 14 vastaavia signaaleja ei voitu havaita noissa olosuhteissa (luultavasti sykloadditioreaktion nopeasta luonteesta johtuen).

Golfomysiini A:n (yhdiste 1) ja B:n (yhdiste 15) ja nukleofiilien välisiä reaktioita tutkittiin sitten käyttämällä metyyliitioglykolaattia mallireagenssina (kuvion 5 kaavio 4). Siten silyylieetteri, yhdiste 12 reagoi hitaasti metyyliitioglykolaattireagenssiylimäärän ja DBU:n kanssa 10°C :ssa emäksisissä olosuhteissa tuottaen yhdistettä 19 (55 prosenttia) ja 20 (20 prosenttia) luultavasti alussa muodostuneen additiotuotteen, välivaiheyhdisteen 18 kautta. Ilmeisesti metyyliitioglykolaatin -SH-ryhmä liittyy asetyleeniin trans-tavalla synnyttäen yhdistettä 18, muutoin seuraava vaihe 18 19 olisi geometrisesti mahdoton. Tämän havainnon kanssa yhtäpitäviä ovat MM2-laskelmat osoittaen, että yhdiste 18 on noin 4.9 kcal/mol vähemmän jännittynyt kuin sen geometrinen isomeeri. Yhdisteen 19 stereokemialla ei tutkittu.

Vastaavissa olosuhteissa, paitsi että lämpötila oli 25°C , yhdiste 15 tuotti 1,6-additiotuotetta, yhdistettä 21 saannon ollessa 67 prosenttia ja alueselektiivisyyden ollessa vastakkainen yhdisteen 15 hydridipelkistyksessä yhdisteeksi 16

(kaavio 3). Kummankin yhdisteen 12 ja 15 taipumus joutua helposti nukleofiilisten reaktioiden kohteeksi johtuu luultavasti niiden jännittyneestä reliefistä (yhdisteillä 12 ja 15) sekä aromaattisista vahvistuksista (yhdiste 15). MM2-laskelmat vahvistavat energialisäykset näissä reaktioissa. Niinpä yhdisteen 1 analoginen avoin ketju ei osoittanut samaa reaktiivisuutta eikä se myöskään halkaissut DNA:ta samoissa olosuhteissa.

Ylläesitetyt tulokset viittaavat selvästi siihen, että golfomysiini A:n (yhdiste 1) aiheuttama DNA:n halkaisu tapahtuu pikemminkin nukleofiilisella mekanismilla (polku b, kaavio 1) kuin radikaalimekanismilla (polku a, kaavio 1), sama pätee golfomysiini B:lle (yhdiste 15).

Golfomysiini A:n ja B:n ominaisuudet kannustivat määrittämään saattaisiko niillä olla kasvaimien vastaista aktiivisuutta. Alustavat *in vitro*-testit osoittavat todellakin, että golfomysiini A estää hiiren virtsarakon syöpäsolujen MB kasvua, IC_{50} -arvon ollessa $3.4 \mu\text{mol/L}$ neljän päivän altistuksen kuluessa (37°C , CO_2 -pitoisuus 7 prosenttia). Ihmisen haimasyöpäsolujen MIA PaCa-2 IC_{50} -arvo oli $0.93 \mu\text{mol/L}$ samantaista määritysmenetelmää käytettäessä.

Esimerkki 1: Golfomysiini A:n (yhdisteen 1) synteesi

12,30 g:aan (504 mmol) murskattua ja liekkikuivattua magnesiumia, joka oli 50 ml:ssa etyylietteriä, lisättiin 2,0 g elohopeakloridia ja reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 30 minuuttia. Sen jälkeen reaktioseokseen lisättiin 50,00 g (420 mmol) propargyylibromidia -30°C :ssa ja seoksen annettiin lämmitä hitaasti nollaan $^\circ\text{C}$:seen. Sitten lisättiin 15,50 ml (382 mmol) etyyliformaattia nollassa $^\circ\text{C}$:ssa ja reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 2:n tunnin ajan. Senjälkeen reaktioseos tehtiin happamaksi 2 N HCl:lla kunnes saavutettiin pH-arvo 4. Happamaksi tehty reaktioseos uutettiin 1 l:lla etyyliasetaattia, pestiin 200 ml:lla suolavettä, kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsen-

troitiin vakuumissa. Tuote puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (30 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin saatiin 33,04 g (305 mmol) alkoholiyhdistettä 6 (saanto 80 prosenttia).

5

13,00 g:aan (120 mmol) alkoholiyhdistettä 6, joka oli 100 ml:ssa kuivaa DMF:ää, lisättiin 16,40 g (240 mmol) imidatso-
lia ja 27,10 g (180 mmol) tert-butyylidimetyylisilylikloridia nollassa °C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen
10 lämpötilassa 8 tunnin ajan. Reaktioseokseen lisättiin 200 ml vettä ja tuote uutettiin 600 ml:lla etyyliasetaattia, pestiin suolavedellä, kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsentroitiin vakuumissa. Tuote puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (5 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin
15 saatiin saannoksi 25,35 g (114 mmol) silyloitua alkoholiyhdistettä 7 (saanto 95 prosenttia).

1,90 g:aan (1,64 mmol) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$:a, joka oli 100 ml:ssa kaasuvapaata bentseeniä, lisättiin 9,57 g (40,88 mmol) 2-
20 jodibentsyylialkoholia ja reaktioseosta sekoitettiin 30 minuutin ajan. Sitten lisättiin 5,66 ml (57,23 mmol) butyyliamiinia ja reaktioseosta sekoitettiin 45 minuuttia. Reaktioseos jäädytettiin nolnaan °C:seen ja lisättiin ensin
25 1,25 g (6,54 mmol) kuparijodidia ja sen jälkeen 20,00 g (89,93 mmol) diasetyleenä. Reaktioseosta sekoitettiin 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos laimennettiin 500 ml:lla etyyliasetaattia, pestiin 200 ml:lla kylläistä NH_4Cl -liuosta ja 100 ml:lla suolavettä, kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsentroitiin vakuumissa. Tuote puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (10 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin saatiin saannoksi 9,33 g (114 mmol) kytkettyä bentsyylialkoholiyhdistettä 9 (saanto 70 prosenttia).

10,00 g:aan (30,67 mmol) kytkettyä bentsyylialkoholiyhdistettä, joka oli 200 ml:ssa metyleenikloridia, lisättiin 50,0 g mangaanidioksidia nollassa °C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4 tuntia. Reaktioseos suodatet-

tiin, konsentroitiin vakuumissa ja puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (5 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin saatiin saannoksi 8,15 g (25,15 mmol) vastaavaa aldehydyhdistettä 10 (saanto 82 prosenttia).

5

6,00 g:aan aldehydyhdistettä 10, joka oli 600 ml:ssa THF:-ää, lisättiin 44,40 ml (22,20 mmol) $((\text{CH}_3)_3\text{Si})_2\text{NK}:\text{a}$ $-78^\circ\text{C}:\text{ssa}$. Reaktioseosta sekoitettiin $-78^\circ\text{C}:\text{ssa}$ 45 minuuttia ja sen jälkeen lisättiin 100 ml kylläistä NH_4Cl -liuosta. Lämpötilan annettiin nousta hitaasti huoneen lämpötilaan ja reaktioseos uutettiin 500 ml:lla etyyliasetaattia, pestiin suolavedellä, kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsentroitiin vakuumissa. Tuote puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (5 prosenttia etyyliasetaattia petrolieetterissä), jolloin saatiin 3,08 g (9,44 mmol) rengassuljettua alkoholiyhdistettä 11 (saanto 51 prosenttia).

3,08 g:aan (9,44 mmol) rengassuljettua alkoholiyhdistettä 11, joka oli 100 ml:ssa metyleenikloridia, lisättiin 15,0 g mangaanidioksidia $25^\circ\text{C}:\text{ssa}$. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4 tuntia. Reaktioseos suodatettiin, konsentroitiin vakuumissa ja puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (2,5 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin saatiin saannoksi 2,51 g (7,74 mmol) ketoniyhdistettä 12 (saanto 82 prosenttia).

1,84 g:aan (5,66 mmol) ketoniyhdistettä 12, joka oli 95 ml:ssa asetonitriiliä, lisättiin 35 ml 0,55 M $\text{HF}:\text{a}$ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{ssa}$ nollassa $^\circ\text{C}:\text{ssa}$. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 3 tunnin ajan ja sitten lisättiin 50 ml kylläistä NaHCO_3 -liuosta. Tuote uutettiin 300 ml:lla etyyliasetaattia, kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsentroitiin vakuumissa ja puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (20 prosenttia etyyliasetaattia petrolieetterissä), jolloin saatiin saannoksi 1,06 g (5,04 mmol) lopputuotetta, yhdistettä 1 (saanto 89 prosenttia).

Spektritiedot: Vaalean keltainen amorfinen; R_f 0,36 (piidi-
 oksidi, 70 prosenttia eetteriä petrolieetterissä); ^1H NMR(500
 MHz, CDCl_3) δ 8,17(1H, d, $J=8,7\text{Hz}$, Ar), 7,46(3H, m, Ar),
 4,16(1H, m, CH-OH), 2,92(4H, m, propargyyli), 2,58(1H, d,
 5 $J=8,5\text{Hz}$, OH); IR(CHCl_3) ν_{max} 3607, 3556, 3019, 2255, 2227,
 1630, 1592, 1280, 1216, 668; ^{13}C NMR(125MHz, CDCl_3) δ
 176,06(-C=O), 136,30(Ar), 133,07(Ar), 132,67(Ar),
 129,19(Ar), 128,13(Ar), 124,44(Ar), 95,80(asetyleeni),
 65,14(C-OH), 28,96(propargyyli), 28,69(propargyyli);
 10 UV(MeOH) λ_{max} 330($\epsilon=0,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 274($1,4 \times 10^4$),
 240($5,9 \times 10^4$) nm; HRMS laskettu $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2$:lle (M+) 211,0759,
 havaittu 211,0791.

Esimerkki 2: Naftyyliigolfomysiin (yhdisteen 37) synteesi

15 500 ml:aan metanolia (MeOH) ja 50 ml:aan asetyylikloridia
 lisättiin 11,950 g (63,83 mmol) 3-amino-2-naftohappoa,
 yhdistettä 30 100 ml:ssa MeOH:a. Tähän seokseen lisättiin 50
 ml bentseeniä ja 50 ml CH_2Cl_2 :a. Reaktioseosta sekoitettiin
 huoneen lämpötilassa kaksi tuntia ja kuumennettiin
 20 palautusjäähdyttären sen jälkeen kolme tuntia. Sen jälkeen
 lisättiin MgSO_4 :a ja reaktioseosta kuumennettiin
 palautusjäähdyttären 12 tuntia. MgSO_4 korvattiin 3 Å:n
 molekyyliseuloilla ja reaktioseosta kuumennettiin
 palautusjäähdyttären 48 tuntia. Sitten reaktioseos
 25 laimennettiin 500 ml:lla etyyliasetaattia (EtOAc), pestiin
 100 ml:lla kylläistä NH_4Cl -liuosta, 100 ml:lla kylläistä
 NaHCO_3 :a, 100 ml:lla 5-prosenttista Na_2CO_3 :a, suolavedellä,
 kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsentroitiin. Tuote puhdistettiin
 pylväskromatograafisesti (10 prosenttia eetteriä
 30 petrolieetterissä), jolloin saatiin 7,412 g (36,83 mmol)
 aminonaftoesteriyhdistettä, yhdistettä 31 (saanto 58
 prosenttia).

0,500 g:aan (2,500 mmol) esteriyhdistettä 31, joka oli 25
 35 ml:ssa CH_2Cl_2 :a, lisättiin 10 ml DIBAL:ia (1 M heksaanissa) -
 78°C :ssa ja reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa.
 Reaktioseokseen lisättiin 20 ml MeOH:a, 50 ml EtOAc:a ja 20

ml Rochelle'n suolaa. Orgaaninen kerros pestiin kylläisellä ammoniumkloridiliuoksella, kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsentroitiin. Tuote uudelleenkiteytettiin tolueenista, jolloin saatiin saannoksi 0,255 g (1,472 mmol) 3-amino-2-naftyylialkoholihdistettä 32 (saanto 59 prosenttia).

5 Aminonafthyylialkoholihdistettä 32 (1,3240 g; 7,736 mmol), joka oli 13 ml:ssa 6 M rikkihappoa, lämmitettiin liuoksen muodostamiseksi ja sen jälkeen jäähdytettiin nollaan °C:seen. Syntyneeseen suspensioon lisättiin 0,587 g (8,510 mmol) NaNO_2 :a ja reaktioseosta sekoitettiin nollassa °C:ssa 10 minuuttia. 0,200 g ureaa 2 ml:ssa vettä lisättiin nollassa °C:ssa sekoittaen samalla 5 minuuttia. Seuraavaksi lisättiin 1,926 g (11,604 mmol) KI:a 2 ml:ssa vettä nollassa °C:ssa sekoittaen samalla huoneen lämpötilassa 15 minuuttia. 15 Lisättiin 50 ml:n annos 1:1 valmistettua eetteri-etyyliasettaatti -seosta ja 20 ml kylläistä ammoniumkloridiliuosta ja 20 ml natriumbisulfaattia, orgaaninen kerros erotettiin ja pestiin ammoniumkloridilla, natriumbikarbonaatilla, suolavedellä ja kuivattiin MgSO_4 :lla. Tuote puhdistettiin pylväskromatograafisesti (30 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin saatiin 0,585 g (saanto 27 prosenttia) 3-jodi-2-naftyylialkoholihdistettä 33.

0,174 g:aan (0,151 mmol) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$:a, joka oli 10 ml:ssa kaasuvapaata THF:ää, lisättiin 1,070 g (3,768 mmol) jodinaftyylialkoholihdistettä 33 ja reaktioseosta sekoitettiin 30 minuutin ajan. Sitten lisättiin 0,521 ml (5,275 mmol) butyyliamiinia ja reaktioseosta sekoitettiin 45 minuuttia. Reaktioseos jäähdytettiin nollaan °C:seen ja lisättiin ensin 30 0,115 g (0,603 mmol) kuparijodidia ja sen jälkeen 0,896 g (8,289 mmol) yhdistettä 6. Reaktioseosta sekoitettiin 3 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos laimennettiin 50 ml:lla etyyliasettaattia, pestiin 20 ml:lla kylläistä NH_4Cl -liuosta ja 20 ml:lla suolavettä, kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsentroitiin vakuuissa. Tuote puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (80 prosenttia eetteriä petrolieet-

terissä), jolloin saatiin saannoksi 0,524 g (1,982 mmol) kytkettyä dioliyhdistettä 34 (saanto 53 prosenttia).

0,524 g:aan (1,982 mmol) sidottua dioliyhdistettä 34, joka
 5 oli 20 ml:ssa metyleenikloridia, lisättiin 6.0 g mangaanidi-
 oksidia nollassa °C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen
 lämpötilassa 4 tuntia. Reaktioseos suodatettiin, konsentroi-
 tiin vakuumissa ja puhdistettiin flash-kromatografiamenetel-
 mällä (40 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin
 10 saatiin saannoksi 0,385 g (1,468 mmol) aldehydialkoholiyh-
 distettä 35 (saanto 74 prosenttia).

0,385 g:aan aldehydialkoholiyhdistettä 35, joka oli 5 ml:ssa
 DMF:ää, lisättiin 0,200 g (2,938 mmol) imidatsolia ja 0,332
 g (2,204 mmol) tert-butyylidimetyylisilyylikloridia nollassa
 15 °C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 2
 tuntia. Reaktioseokseen lisättiin 20 ml vettä ja tuote
 uutettiin 60 ml:lla etyyliasetaattia, pestiin suolavedellä,
 kuivattiin MgSO_4 :lla ja konsentroitiin vakuumissa. Tuote
 puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (5 prosenttia
 20 eetteriä petrolieetterissä), jolloin saatiin saannoksi 0,437
 g (1,161 mmol) silyloitua alkoholialdehydiyhdistettä 35a
 (saanto 79 prosenttia).

0,025 g (0,066 mmol) silyloitua alkoholialdehydiyhdistettä
 25 35a, joka oli 70 ml:ssa THF:ää, lisättiin 0,160 ml (0,080
 mmol) $((\text{CH}_3)_3\text{Si})_2\text{NK}$:a -78°C:ssa. Reaktioseoksen lämpötilan
 annettiin nousta hitaasti huoneen lämpötilaan ja sen jälkeen
 lisättiin 10 ml kylläistä NH_4Cl -liuosta. Reaktioseosta uutet-
 tiin 50 ml:lla EtOAc:lla, pestiin suolavedellä, kuivattiin
 30 MgSO_4 :lla ja konsentroitiin vakuumissa. Tuote puhdistettiin
 flash-kromatografiamenetelmällä (10 prosenttia etyyliase-
 taattia petrolieetterissä), jolloin saatiin 0,010 g (0,026
 mmol) rengassuljettua alkoholiyhdistettä 36 (saanto 40
 prosenttia).

0,020 g:aan (0,054 mmol) alkoholiyhdistettä 36a, joka oli 5
 ml:ssa metyleenikloridia, lisättiin 0,200 g mangaanidioksi-

dia nollassa °C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 1 tuntia. Sitten reaktioseos suodatettiin, konsentroitiin vakuuissa ja puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (5 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin saatiin saannoksi 0,005 g (0,013 mmol) ketoniyhdistettä 36a (saanto 25 prosenttia).

0,005 g:aan (0,013 mmol) ketoniyhdistettä 36a, joka oli 1 ml:ssa asetonitriiliä, lisättiin 1,0 ml 0,55 M HF:a CH₃CN:ssä nollassa °C:ssa. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 12 tunnin ajan ja sitten lisättiin 5 ml kylläistä NaHCO₃-liuosta. Tuote uutettiin 20 ml:lla etyyliasetaattia, kuivattiin MgSO₄:lla ja konsentroitiin vakuuissa ja puhdistettiin flash-kromatografiamenetelmällä (50 prosenttia eetteriä petrolieetterissä), jolloin saatiin saannoksi 0,002 g (0,008 mmol) lopputuotetta naftyyliigolfomysiiniyhdistettä 37 (saanto 59 prosenttia).

Esimerkki 3: DNA:n halkaisututkimukset

Pieneen ampulliin, joka sisälsi 50 µmol/L emäspariliuosta kaksoissäikeistä DNA:ta (ΦX174 tyyppi I) 2,0 mikrolitrassa erilaisia puskureita, joiden pH-arvot on esitetty kuviossa 3, esimerkiksi pH 8,5 tris-HCl, lisättiin 6,0 mikrolitraa samaa puskuriliuosta ja 2,0 mikrolitraa yhdisteen 1 tai yhdisteen 37 etanoliliuosta.

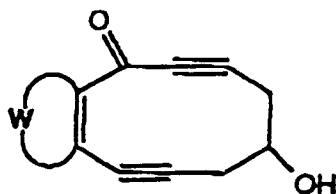
Ampullit laitettiin sen jälkeen 37°C:seen uuniin 20 tunniksi. Jokaiseen ampulliin lisättiin 2,0 mikrolitran annos glyserolipuskuriliuosta, joka sisälsi bromitymolisinistä indikaattorina. Jokaisesta ampullista otettiin 10 mikrolitran näyte. Näytteistä tehtiin geelielektroforeesianalyysi käyttämällä 1,0 prosenttista agarosigeeliä etidiumbromidin kanssa jännitteen ollessa 115 voltia 1 tunnin ajan. DNA-tyypin II muodostuminen osoitti DNA:n haljenneen. DNA-tyyppi II voitiin havaita tarkastelemalla geeliä visuaalisesti 310 nanometrin ultraviolettivalossa.

Esimerkki 4: 6-allas -sytotoksisuustutkimus

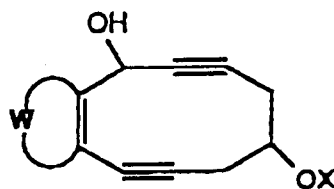
- MIA PaCa-2 -soluja tai MB49-soluja pantiin jokaiseen 6-
altaisen levyn altaaseen solutiheyden ollessa 100 000
solua/allas 3 ml:ssa elatusainetta. Niitä inkuboitiin 4
5 tuntia (37°C, CO₂-pitoisuus 7 prosenttia). Sen jälkeen
lisättiin 6 mikrolitraa yhdisteen 1 liuosta 3 ml:aan
elatusainetta (RPMI-1640, jossa oli 5 prosenttia naudan
sikiön seerumia ja 1 prosenttia glutamiinia) 500 kertaisesti
laimennettuna siten, että yhteen altaaseen, joka toimi
10 kontrollina, lisättiin etanolia pitoisuuteen 0,2 prosenttia.
Sen jälkeen levyjä inkuboitiin 4 päivää (37°C, CO₂-pitoisuus
7 prosenttia). Sitten elatusaine valutettiin pois ja säili-
öiden pohjalle lisättiin kideviolettiväriä (Hucker'in koos-
tumus). Seuraavaksi niitä huuhdeltiin vesijohtovedellä,
15 kunnes huuhtoutunut vesi oli kirkasta. Värjättyt solut liuo-
tettiin kvantifoimista varten lisäämällä 3 ml/allas sarko-
syylliliuosta (N-layryylisarkosiinia 1 prosentti vedessä).
Liuoksen absorbanssi luettiin 590-650 nm:ssä.
- 20 Vaikka tätä keksintöä on tässä yhteydessä kuvattu eräiden
edullisten suoritusmuotojen avulla esittäen niitä koskevia
esimerkkejä, voi alan asiantuntija havaita helposti, että
lukuisia modifikaatioita, muutoksia, poistoja tai lisäyksiä
voidaan tehdä, niiden hengestä poikkeamatta.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jonka yhdisteen rakennekaava on



jossa W yhdessä kuvattuun vinyleeniryhmään sitoutuneiden hiiliatomien kanssa on aromaattinen monosyklinen rengas tai kaksirenkainen fuusioitu rengassysteemi, joka sisältää kuusi atomia renkaassa, johon sisältyy kuvattu vinyleeniryhmä, joka menetelmä on tunnettu siitä, että siinä kaavan



mukainen yhdiste, jossa X on suojaava ryhmä, hapetetaan ja mainittu suojaava ryhmä poistetaan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, joka on tunnettu siitä, että kaikki renkaaseen W sisältyvät atomit ovat hiiliatomeja.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, joka on tunnettu siitä, että W on monosyklinen rengas.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, joka on t u n-
n e t t u siitä, että W on kaksirenkainen rengassysteemi,
joka sisältää kaksi fuusioitunutta kuusijäsenistä rengasta.

5 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, joka on t u n-
n e t t u siitä, että ainakin yksi W:n sisältämä atomi on
typpirengasatomi.

10 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, joka on t u n-
n e t t u siitä, että W sisältää yhden rengastyyppiatomin,
yhden rengashappiatomin ja jossa loput rengasatomit ovat
hiiliatomeja.

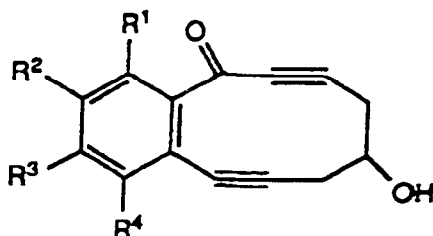
15 7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, joka on t u n-
n e t t u siitä, että W sisältää yhden rengastyyppiatomin ja
jossa loput rengasatomit ovat hiiliatomeja.

20 8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, joka on t u n-
n e t t u siitä, että W on monosyklinen rengas.

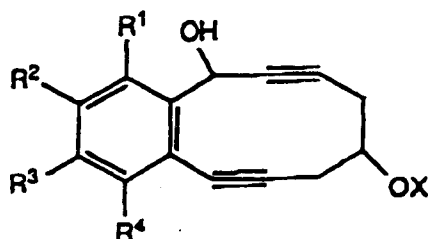
25 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, joka on t u n-
n e t t u siitä, että W sisältää yhden tai useamman substi-
tuenttiryhmän, jotka on sitoutuneet yhteen tai useampaan
rengasatomiin, kuvattuun vinyleeniryhmään sitoutuneiden
substituenttien lisäksi.

30 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, joka on t u n-
n e t t u siitä, että mainittu yksi tai useampi substitu-
entti valitaan ryhmästä, johon sisältyvät C₁-C₆-alkyyli, C₁-
C₆-alkoksi, perfluorimetyyli, perfluorimetoksi, hydroksyyli,
C₁-C₆-alkyloksi, bentsyloksi, nitro, halogeeni ja amino,
jonka kaava on NR⁵R⁶, jossa R⁵ valitaan vetyn, C₁-C₆-alkyylin,
bentsyylin, C₁-C₆-alkyylin ja bentsoyylin sisältävästä ryh-
mästä ja R⁶ valitaan vedyn, C₁-C₆-alkyylin ja bentsyylin
35 sisältävästä ryhmästä, tai jossa NR⁵R⁶ yhdessä muodostaa 5-
tai 6-jäsenisen renkaan.

11. Menetelmä yhdisteen valmistamiseksi, jonka yhdisteen rakennekaava on



jossa R^1 , R^2 , R^3 ja R^4 ovat samanlaiset tai erilaiset ja jossa ne valitaan ryhmästä, johon sisältyvät vety, C_1 - C_6 -alkyyli, C_1 - C_6 -alkoksi, perfluorimetyyli, perfluorimetoksi, hydroksyyli, C_1 - C_6 -alkyloksi, bentsyloksi, nitro, halogeeni ja amino, jonka kaava on NR^5R^6 , jossa R^5 valitaan vedyn, C_1 - C_6 -alkyylin, bentsyylin, C_1 - C_6 -alkyylin ja bentsyylin sisältävästä ryhmästä ja R^6 valitaan vedyn, C_1 - C_6 -alkyylin ja bentsyylin sisältävästä ryhmästä, tai jossa NR^5R^6 yhdessä muodostaa 5- tai 6-jäsenisen renkaan, joka menetelmä on tunnettu siitä, että siinä kaavan



mukainen yhdiste, jossa X on suojaava ryhmä, hapetetaan ja mainittu suojaava ryhmä poistetaan.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, joka on tunnettu siitä, että R^1 ja R^2 ovat vetyjä ja että R^3 ja R^4 muodostavat yhdessä kuvatun fenyyliarenkaan kanssa kaksirenkaisen aromaattisen rengassysteemin.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, joka on tunnettu siitä, että mainittu kaksirenkainen aromaattinen rengassysteemi on naftaleenirengassysteemi.

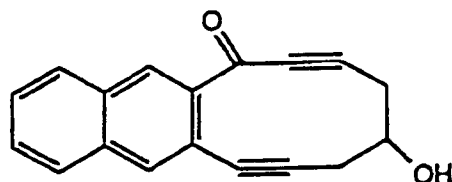
5 14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, joka on tunnettu siitä, että valmistettavan yhdisteen kaava on



15

15. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, joka on tunnettu siitä, että valmistettavan yhdisteen kaava on

20



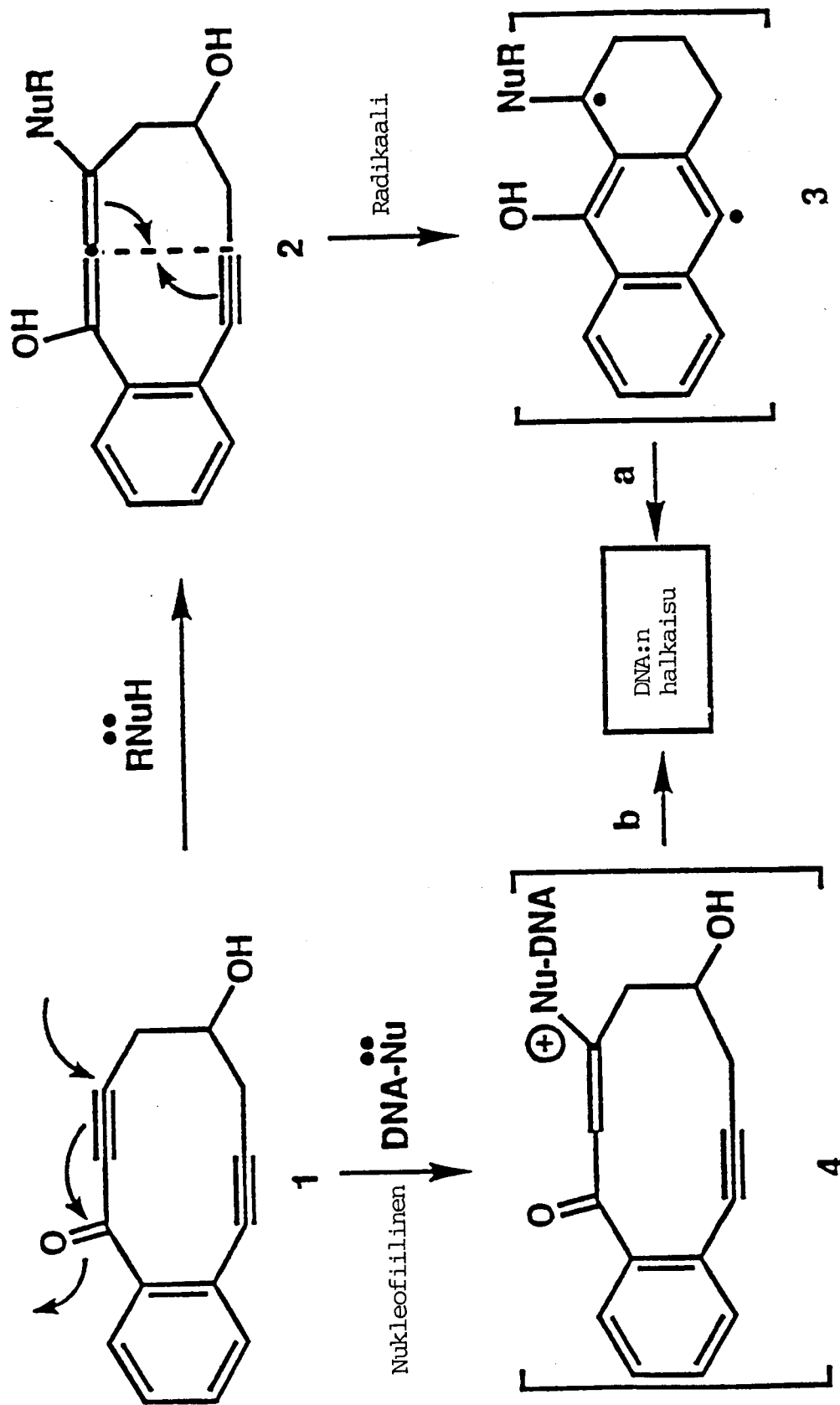
25

26
27
28
29
30
31
32
33

34
35
36
37
38
39
40

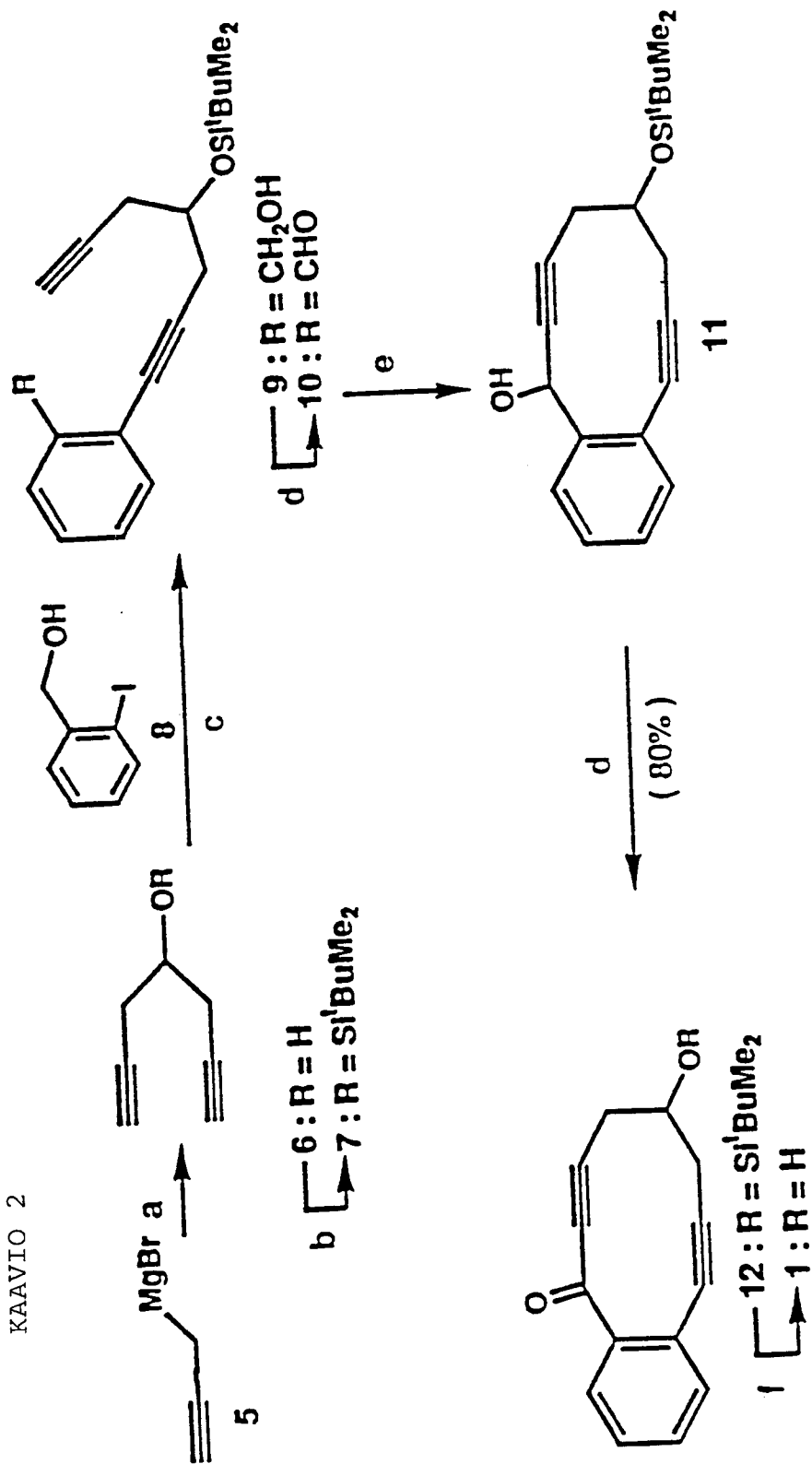
FIG. 1

KAAVIO 1



KAAVIO 2

FIG. 2



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Muoto II

Muoto III

Muoto II

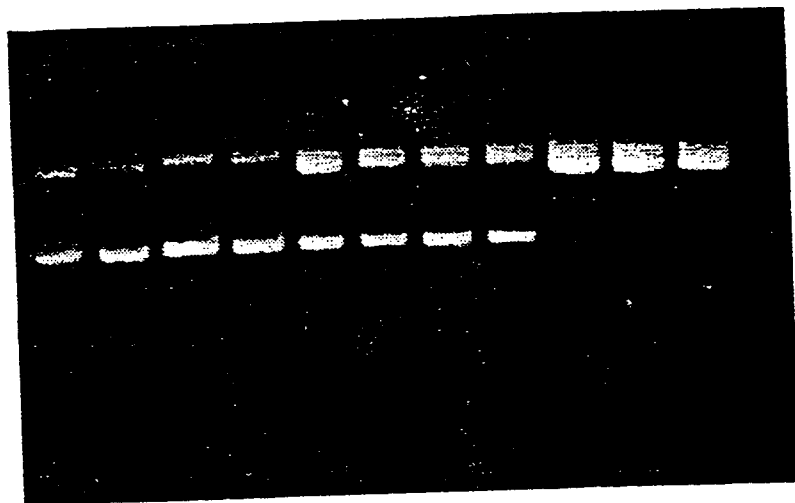


FIG. 3

FIG. 4

KAAVIO 3

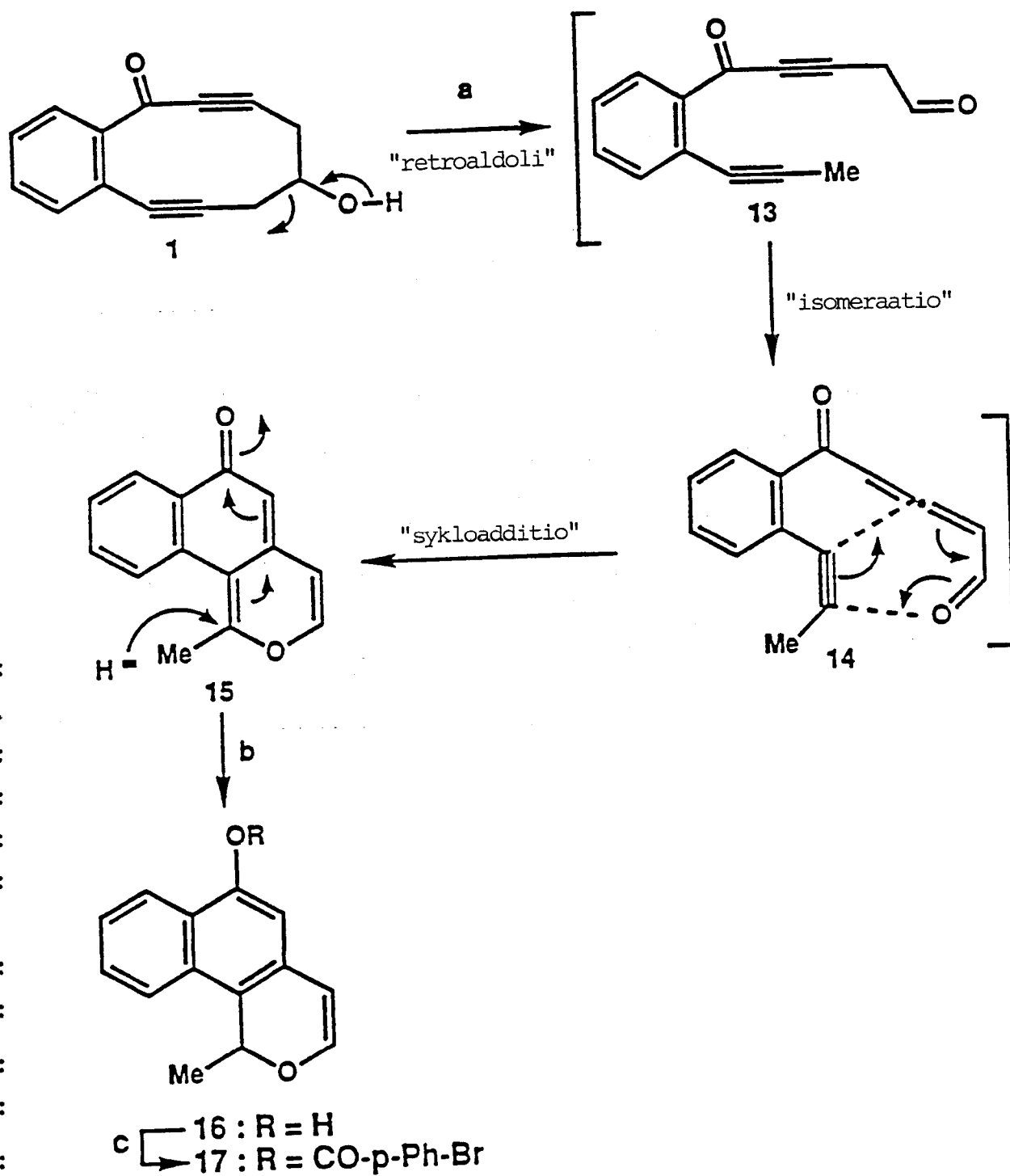


FIG. 5

KAATIO 4

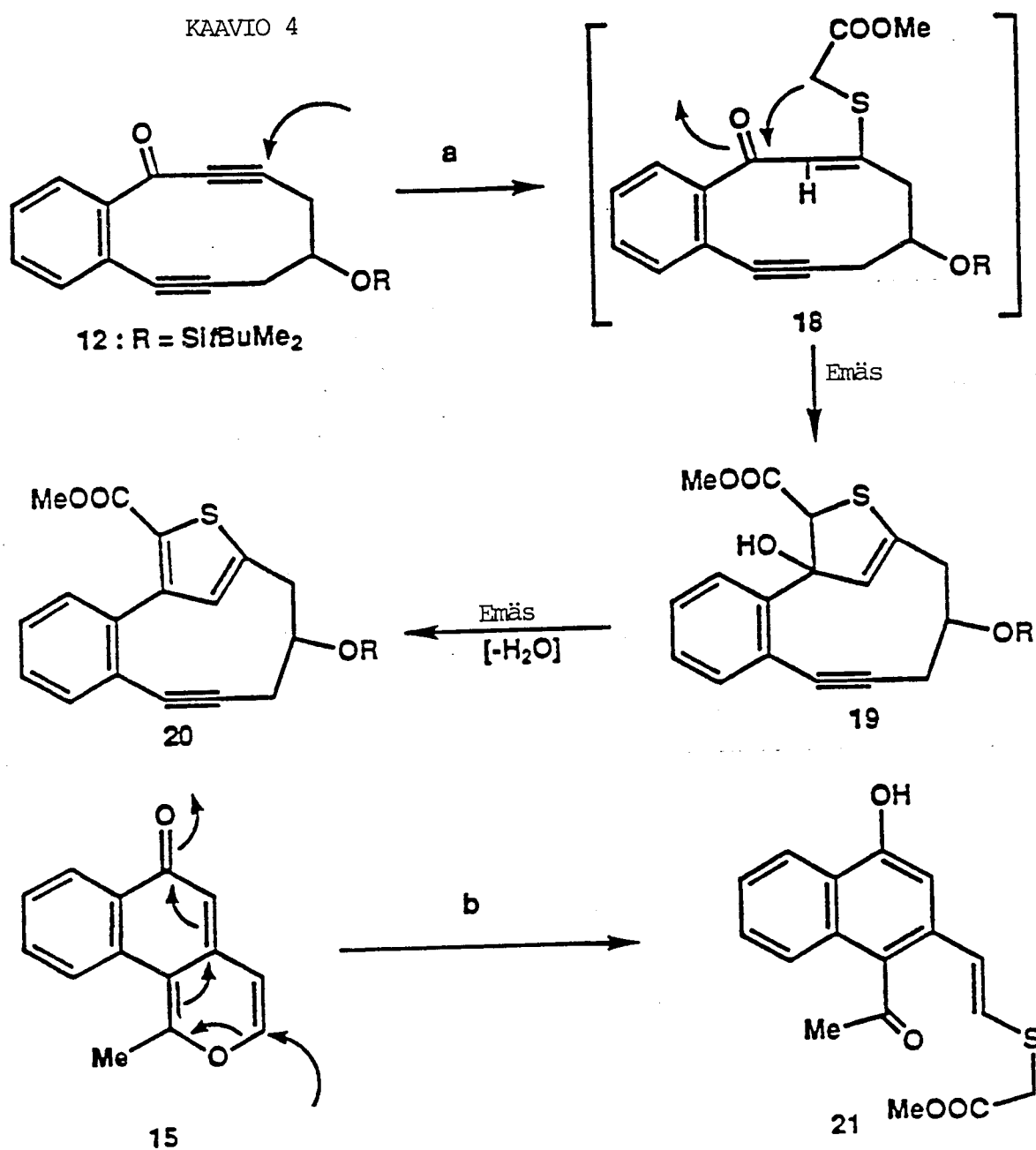


FIG. 6

KAATIO 5

