

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 912964 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentsökan - Patent application 912964

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07F 9/655
C07D307/12
C12P 17/04

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 18.06.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 18.06.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 20.12.1991

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

19.06.1990 US 540438 29.01.1991 US 647396

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Novartis AG, Schwarzwaldallee 215, 4058 BASEL, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Estermann, Heinrich, Switzerland, SVEITSI, (CH)
2 •Houlihan, William Joseph, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Kapa, Prasad Koteswara, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •Underwood, Russell Lee, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

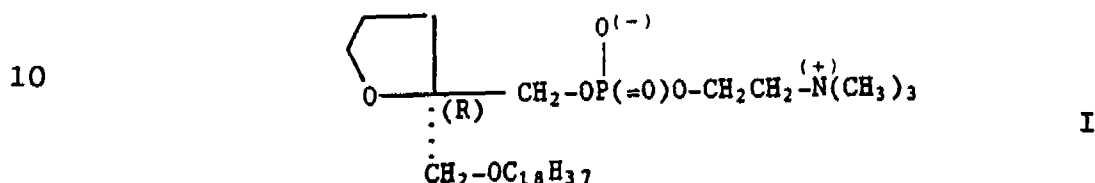
(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

2-tetrahydrofuraanin johdannaisten enantiomeerit, niiden välituotteet ja niiden valmistus
Enantiomerer av 2-tetrahydrofuranderivat, mellanprodukter därav och deras framställning

Menetelmä 2-tetrahydrofuraanijohdannaisen enantiomeerien valmistamiseksi

Tämä keksintö kohdistuu 2-tetrahydrofuraanijohdannaisen enantiomeerien valmistukseen.

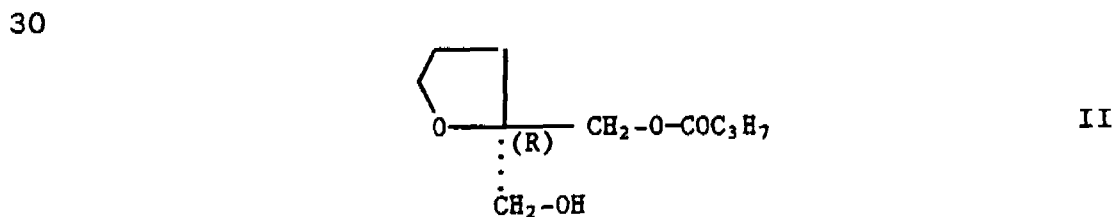
Keksinnön mukaisella menetelmällä on kaavan I mukainen yhdiste



nimittäin (R)-2-[(2-oktadekyylioksimetyylitetrahydrofuran-2-yyli-
 15 2-metoksi)hydroksifosfinyylioksi]-N,N,N-trimetyyli-
 etaaniaminiumhydroksidi-sisäinen suola-4-oksidi ja sen
 (S)-konfiguraation omaava enantiomeeri.

Kaavan I mukaisen yhdisteen rasemaatti on tunnettu.
 Se on kuvattu esimerkiksi US-patenttijulkaisussa 4 673 672
 20 esimerkissä 5 palstoilla 23 - 24; US-patenttijulkaisun yh-
 disteiden on kuvattu olevan käyttökelpoisia kasvainten
 vastaisia aineita.

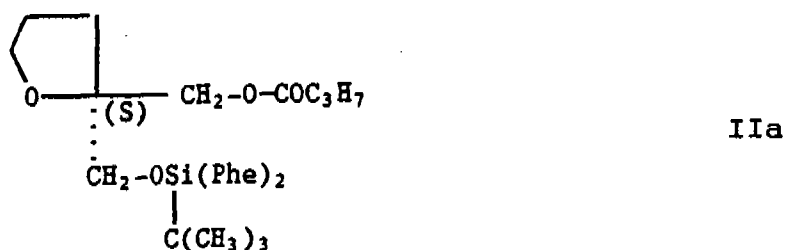
Nyttemmin on havaittu, että kaavan I mukaisilla
 spesifisellä (R) optisella isomeerillä ja sen enantiomee-
 25 rillä, joita ei oltu spesifisesti kuvattu ennen käsillä
 olevan keksinnön prioriteettipäivää, on yllättäviä ja hyö-
 dyllisiä farmakologisia ominaisuuksia, ja että ne voidaan
 saada lähtien kaavan II mukaisesta yhdisteestä, (R)-2,2-
 bis(hydroksimetyyli)tetrahydrofuraanimonobutyyraatista



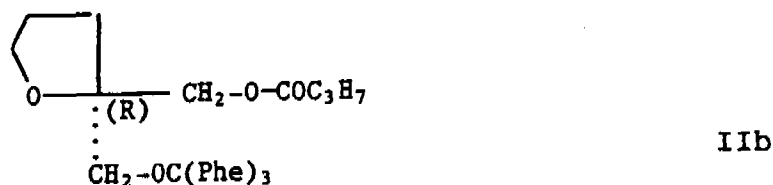
35 joka on suojatussa muodossa.

Täten keksintö kohdistuu menetelmään kaavan I mukaisen yhdisteen ja sen enantiomeerin valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää kaavan II mukaisen yhdisteen okta-
 5 dekyloimisen ja fosforyylikolinoimisen sekä menetelmässä välivaiheina suoritettavat tarkoituksenmukaiset suojaamis- ja suojauksen poistamisvaiheet.

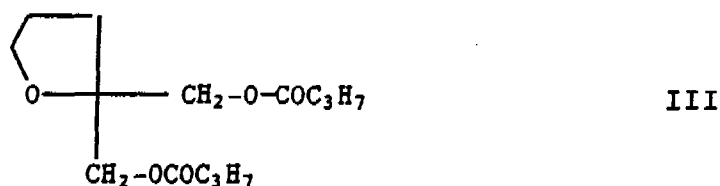
Esimerkkejä kaavan II mukaisesta yhdisteestä suoja-
 tussa muodossa ovat yhdisteet, joissa hydroksiryhmä on
 10 suojattu hydrolyyttisesti lohkeavalla ryhmällä, kuten kaavan IIa mukainen yhdiste



ja kaavan IIb mukainen yhdiste



25 Kaavan II mukainen yhdiste vapaassa tai suojatussa muodossa on sinällään uusi. Kaavan II mukaista yhdistettä vapaassa muodossa tai suojatussa muodossa voidaan valmis-
 30 taa uudella menetelmällä, jossa enantiospesifisesti monohydrolysoidaan kaavan III mukainen 2,2-bis(hydroksimetyyli)-tetrahydrofuraanidibutyyraatti



ja valinnaisesti suojataan vapaassa muodossa oleva kaavan II mukainen lopputuote.

Useat farmakologisesti aktiiviset yhdisteet esiin-
tyvät optisten isomeerien seoksena. Huolimatta siitä tosi-
5 asiasta, että haluttu farmakologinen aktiivisuus on usein
peräisin yhdestä isomeeristä, käytetään kuitenkin optisten
isomeerien seoksia, koska isomeerien erottaminen on erit-
tään kallista, mikä ylittää mahdollisen aktiivisuuden kas-
vun potentiaaalisen edun. Kuitenkin on melko ilmeistä, että
10 monet farmakologit ovat selvillä optisten isomeerien seok-
sena annon seurauksista, jolloin yhtä tai useampaa isomee-
riä voidaan pitää epäpuhtautena, jolla ei ole haluttua
terapeuttista tehoa ja joka myös lisää ei-toivottuja fy-
siologisia vaikutuksia, kuten toksisuutta.

Useat tutkimuspyrkimykset on suunnattu menetelmiin
farmakologisesti aktiivisten yhdisteiden spesifisten op-
tisten isomeerien tuottamiseksi ja tällaiset menetelmät on
dokumentoitu hyvin. Huomattavaa näissä prosesseissa on
entsyymien käyttö stereospesifisten muutosten aikaansaami-
20 seksi. Esimerkiksi julkaisussa Chemistry Letters (1988)
1717 - 1720 kuvataan entsyymien katalysoimaa cis-2,5-bis-
(hydroksimetyyli)-tetrahydrofuraanien asymmetrisaatiota.
Täsmällisemmin tässä viitteessä kuvataan useiden cis-2,5-
bis(hydroksimetyyli)-tetrahydrofuraanien diestereiden
25 asymmetristä hydrolyysiä, jota katalysoi porsaan maksan
esteraasi, porsaan haiman lipaasi tai Candida cylindracea
lipaasi. Esitettyjen tulosten perusteella voidaan nähdä,
että saannot ovat melko alhaisia muissa paitsi yhdessä
erityisessä tapauksessa, kohdassa 1 taulukossa 1, jonka
30 saanto oli 86 %.

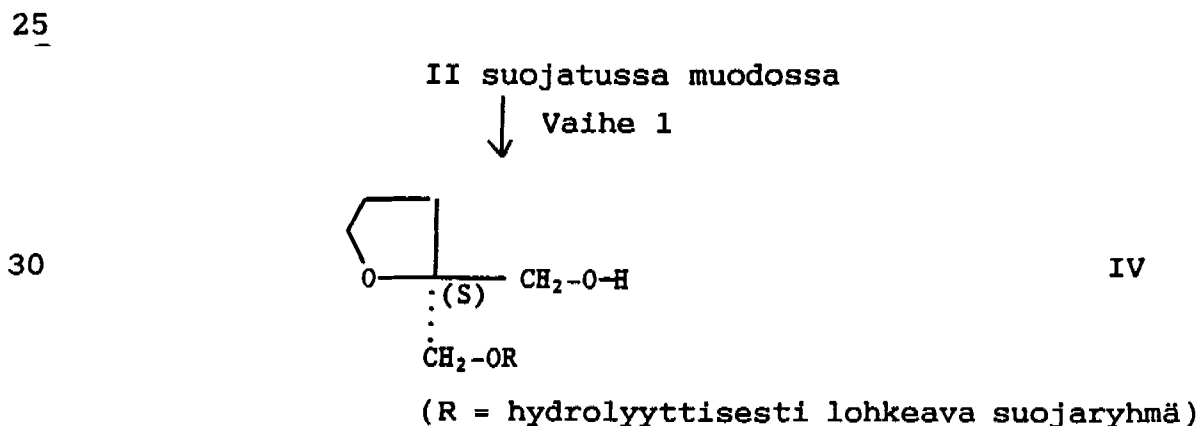
Käsillä olevan keksinnön yhteydessä haluttiin saada
optisesti puhtaita välituotteita, jotka on johdettu 2,2-
bis(hydroksimetyyli)-tetrahydrofuraanista. Koska entsy-
maattiset reaktiot ovat yleensä substraattispesifisiä, oli
35 tarve kehittää sopiva menetelmä 2,2-disubstituoitujen tet-

rahydrofuraanijohdannaisten asymmetrisoimiseksi. Vastakohtana 2,5-systeemille 2,2-systeemistä johdetut optisesti puhtaat monoasetaatit ovat taipuvaisia rasemoinnille molekyylin sisäisen asyyliiirron kautta. Edellä esitetty menetelmä, joka johtaa kaavan II mukaiseen yhdisteeseen ja sen enantiomeeriin, edustaa yksinkertaista ja taloudellista menetelmää spesifisen optisen isomeerin valmistamiseksi hyvällä saannolla käyttäen hyväksi suhteellisen pieniä entsyymimääriä ja mietoja reaktio-olosuhteita. Tällä tavoin saatu optinen puhtausaste on yli 96 %, esimerkiksi noin 99 %. Kemiallinen puhtaus on ≥ 99 %.

Kaavan II mukaista isomeeriä voidaan käyttää muidenkin yhdisteiden valmistamiseksi optisesti aktiivisessa muodossa kaavan I mukaisen yhdisteen ja sen enantiomeerin lisäksi; kaavan II mukainen yhdiste vapaassa muodossa ja sen suojatut muodot ovat täten arvokkaita välituotteita optisesti aktiivisessa muodossa olevien spesifisten farmakologisesti aktiivisten yhdisteiden valmistuksessa.

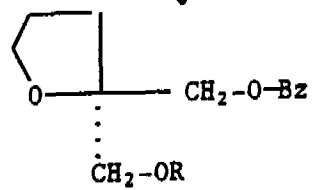
Käsillä olevan keksinnön mukainen menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen ja sen enantiomeerin valmistamiseksi toteutetaan käyttämällä tavanomaisia tekniikoita ja reaktiovaiheita.

Siten kaavan I mukainen yhdiste voidaan saada esimerkiksi seuraavan reaktiosarjan mukaisesti:



5

Vaihe 2

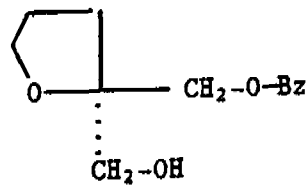


V

5

(Bz = hydrogenolyttisesti lohkeava suoja-ryhmä)

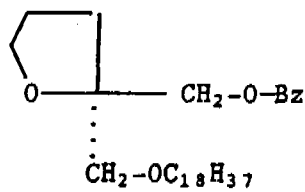
Vaihe 3



VI

10

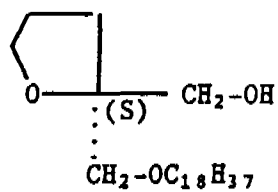
Vaihe 4



VII

15

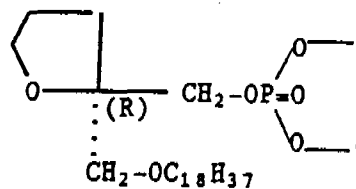
Vaihe 5



VIII

25

Vaihe 6



IX

30

Vaihe 7

I

35

5

10

15

20

25

30

35

Vaihe 4 käsittää alkyloinnin sopivalla oktadekaani-johdannaisella, kuten 1-halo-oktadekaanilla, esimerkiksi 1-bromioktadekaanilla, tai vastaavalla C_{18} -para-tolueeni-sulfonaatilla, emäksen, kuten natriumhydroksidin, läsnäollessa. Reaktio suoritetaan sopivasti, kun läsnä on inertti orgaaninen liuotin, esimerkiksi dialkyyliamidi, kuten dimetyyliformamidi tai dimetyyliasetamidi, aromaattinen hiilivety, kuten tolueeni, bentseeni tai ksyleeni, tai dialkyyliamidin ja aromaattisen hiilivedyn seos. Vaihtoehtoisesti käytettävä inertti orgaaninen liuotin voi olla dimetyylisulfoksidi, syklinen eetteri, kuten tetrahydrofuraani tai niiden seos. Lämpötila on noin 15 °C - noin 50 °C. Kun Bz-ryhmä on bentsyyli, on kaavan VII mukaisella yhdisteellä (R) konfiguraatio. Vaihtoehtoisesti voidaan alkylointiin vaikuttaa esimerkiksi 1-bromioktadekaanilla, kun läsnä on natriumhydridiä (60 % dispersio) ja tetrabutyyliammoniumjodidia. Reaktio suoritetaan sopivasti inertin orgaanisen liuottimen, esimerkiksi syklisen eetterin, kuten tetrahydrofuraanin, läsnäollessa lämpötilan ollessa noin 0 °C-liuottimen refluksilämpötila.

Vaihe 5 käsittää kaavan VII mukaisen yhdisteen hydrogenolyyttisen suojauksen poiston, edullisesti esimerkiksi, kun Bz on bentsyyli, liuottamalla alempaan alkanoliin ja veteen (noin 15 % asti) ja lisäämällä palladiumia hiilellä, haluttaessa pieni määrä etikkahappoa, ja viemällä tuloksena saatu seos paineenalaiseen vetykaasuun lämpötilassa noin 20 °C - noin 50 °C.

Vaiheessa 6 annetaan kaavan VIII mukaisen yhdisteen inerttiin orgaaniseen liuottimeen, esimerkiksi halogenoituun hiilivetyyn, kuten metyleenikloridiin tai kloroformiin, tai aromaattiseen hiilivetyyn, kuten bentseeniin tai tolueeniin liuottamisen jälkeen reagoida edullisesti 2-kloori-2-okso-1,3,2-dioksafosfolaanin kanssa, kun läsnä on tertiäärinen amiiniyhdiste, esimerkiksi C_{14} -trialkyyliamiini, kuten trietyyliamiini, ja valinnaisesti katalyyt-

ti, esimerkiksi katalyyttinen määrä 4-dimetyyliaminopyridiiniä. Reaktio suoritetaan tyypillisesti lämpötilavälillä noin 20 °C - noin 40 °C.

5 Vaiheessa 7 suoritetaan esullisesti reaktio tertiäärin alkyyliamiini-yhdisteen, kuten trimetyyliamiinin kanssa. Reaktio suoritetaan edullisesti, kun läsnä on inertti orgaaninen liuotin, esimerkiksi alempi alkanoli, kuten metanoli tai etanoli, aromaattinen hiilivety, kuten tolueeni tai bentseeni, dialkyyliamidi, kuten dimetyyli-
10 formamidi, tai asetonitriili. Vaikkakaan reaktiolämpötila ei ole ratkaiseva tekijä, suoritetaan reaktio tyypillisesti lämpötilavälillä noin 50 °C - noin 70 °C.

 Vaiheet 6 ja 7 voidaan edullisesti korvata vaiheella 6', jonka ensimmäinen osa käsittää kaavan VIII mukaisen
15 yhdisteen reaktion fosforioksikloridin kanssa, kun läsnä on amiiniemäs, kuten pyridiini tai trietyyliamiini. Reaktio suoritetaan sopivasti inertin orgaanisen liuottimen, esimerkiksi halogenoidun hiilivedyn, kuten metyleenikloridin, läsnäollessa. Lämpötila on noin 0 °C - noin 40 °C.
20 Vaiheen 6' toisessa osassa annetaan ensimmäisessä osassa tuotetun tuotteen reagoida koliini-reagenssin (eli etaani-aminium, 2-hydroksi, N,N,N-trimetyyli-4-metyyli-bentseeni-sulfonaatti) kanssa, kun läsnä on amiiniemäs, kuten pyridiini tai trietyyliamiini, ja katalyyttinen määrä 4-dime-
25 tyyliaminopyridiiniä. Reaktio suoritetaan edullisesti lämpötilassa noin 10 °C - noin 40 °C.

 Kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeerin valmistus voidaan suorittaa saman prosessin mukaisesti ja samankaltaisesti alkaen taas kaavan II mukaisesta yhdisteestä
30 suojatussa muodossa. Kuitenkin koska konfiguraatio asymmetrisesti substituoidussa hiiliatomissa täytyy olla päinvastoin, on substituution, suojauksen ja suojauksen poist-
 ton vaiheiden järjestys erilainen. Siten yksittäisiin reaktioihin vaikutetaan esimerkiksi seuraavan sarjan mu-
35 kaisesti: vaihe 1 (tämän jälkeen vaihe A); vaihe 4 (tämän

5

voidaan esittää seuraavalla reaktiosarjalla:

II suojatussa muodossa

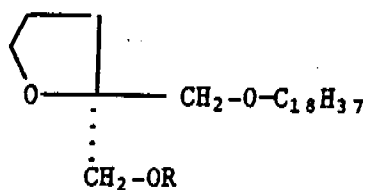
Vaihe A

(= Vaihe 1)

IV

Vaihe B

(= Vaihe 4)

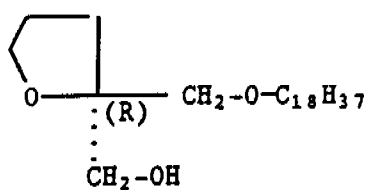


X

(R = hydrolyytisesti lohkeava suojarahmä)

Vaihe C

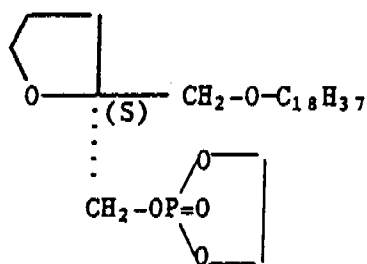
(= Vaihe 3)



XI

Vaihe D

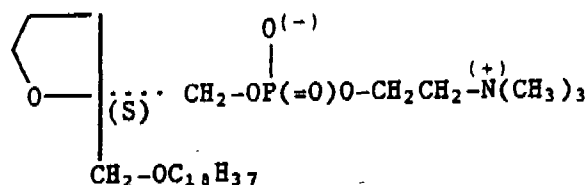
(= Vaihe 6)



XII

↓
Vaihe E
(= Vaihe 7)

5



kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeri.

10

Vaiheet A, B, C, D ja E suoritetaan analogisesti edellä kuvattujen vaiheiden 1, 4, 3, 6 ja 7 kanssa, tässä järjestyksessä; vaihe D' on analoginen edellä kuvatun vaiheen 6' kanssa. Kaavan X mukaisella yhdisteellä, jossa R on tert-butyylidifenyylisilyyli tai trityyli, on (S) konfiguraatio.

Edellä mainittu uusi menetelmä kaavan II mukaisen yhdisteen valmistamiseksi suoritetaan lisäämällä sopivaa entsyymiä kaavan III mukaisen yhdisteen puskuroituun vesisuspensioon. Lisätyn entsyymin määrä on edullisesti noin 1 mg - noin 40 mg per mmol kaavan III mukaista yhdistettä.

Sopiva entsyymi on esimerkiksi porsaanhaiman lipaasi tai mikrobiologinen *Candida lipolytica*sta valittu lipaasi, *Mucor javanicus* lipaasi ja *Pseudomonas fluorescens* lipaasi, jotka kaikki ovat kaupallisesti saatavissa. Edullisia entsyymejä ovat porsaanhaiman, *Mucor javanicus*-mikrobin ja *Pseudomonas fluorescens*-mikrobin lipaasi. Entsyymi lisätään edullisesti kaavan III mukaisen dibutyyliesterin puskuroituun vesisuspensioon, jonka pH on säädetty arvoon 7 (joko etikkahapolla tai laimealla natriumhydroksidilla). Edullisesti entsyymi lisätään dibutyyliesterin puskuroituun suspensioon lisäliuotinseoksessa, joka seos sisältää vettä ja n-C₅₋₇-alifaattista hiilivetyä, eli pentaania, heksaania tai heptaania, suhteessa 1:1, jolloin suspension pH on säädetty arvoon 7 ennen entsyymin lisäämistä.

Vaihtoehtoisesti kaavan III mukainen dibutyylimesteri lisätään entsyymien puskuroituun vesisuspensioon, jonka pH on säädetty arvoon 7 (esimerkiksi joko etikkahapolla tai laimealla natriumhydroksidilla). Edullisesti dibutyylimesteri lisätään lisäliuotinseoksessa olevan entsyymien puskuroituun suspensioon, joka lisäliuotinseos sisältää vettä ja n-C₅₋₇-alifaattista hiilivetyä, eli pentaania, heksaania tai heptaania, suhteessa 1:1, jolloin suspension pH on säädetty arvoon 7 ennen dibutyylimesterin lisäämistä.

10 Lämpötila on edullisesti noin 0 °C - noin 30 °C.

Koska kaavan II mukaisella yhdisteellä on rajattu pysyvyys, on edullista konvertoida tämä vapaassa muodossa oleva kaavan II mukainen yhdiste pysyvämpään muotoon, jossa hydroksi-ryhmä on suojattu. Edullisia suojaryhmiä ovat silyyliryhmät, kuten tert-butyylidifenyylisilyyli, ja ti-lavuudeltaan suuret aralkyyli-ryhmät, kuten trifenyylime-tyyli (trityyli).

Vapaan kaavan II mukaisen yhdisteen silylointi suoritetaan edullisesti esimerkiksi raa'assa muodossa sopivan silyylijohtannaisen, kuten t-butyylidiklorididifenyylisilaa-
 20 nin kanssa, kun läsnä on 2 ekvivalenttia imidatsolia, jolloin saadaan saannoksi vastaava suojattu yhdiste, esimerkiksi kaavan IIa mukaisen yhdisteen (S)-isomeeri. Silylointi suoritetaan sopivasti polaarissa, aprottisessa liuottimessa, esimerkiksi dialkyyliamidissa, kuten dime-
 25 tyyliformamidissa tai dimetyyliasetamidissa, tai alemmassa alkyylinitriilissä, kuten asetonitriilissä, lämpötilassa noin 0 °C - noin 30 °C.

Kun suojaus tapahtuu tilavuudeltaan suurella aralkyyli-ryhmällä, annetaan kaavan II mukaisen vapaan yhdisteen reagoida sopivan reaktiokykyisen aralkyylijohtannaisen kanssa, kuten trityloinnissa trifenyylikloorimetäänin kanssa, kun läsnä on orgaanista emästä, kuten trietyyliamiinia tai pyridiiniä, jotta saadaan vastaava suojattu
 30 yhdiste, esimerkiksi kaavan IIb mukainen (R)-isomeeri. Reaktio suoritetaan helposti inertissä orgaanisessa liuot-

timessa, esimerkiksi klooratussa, alifaattisessa hiillivedyissä, kuten metyleenikloridissa, lämpötilassa noin -30 °C - noin 30 °C.

On ymmärrettävä, että kaavan II mukaisen yhdisteen
 5 käytön lisäksi valmistettaessa kaavan I mukaista yhdistettä ja sen (S)-enantiomeeriä, kuten edellä on kuvattu, voidaan kaavan II mukaista yhdistettä ja sen suojattuja muotoja käyttää valmistettaessa muita farmakologisesti aktiivisia yhdisteitä, joilla on asymmetrisesti substituoitu
 10 hiiliatomi happiatomin vieressä tetrahydrofuraanirenkaassa, esimerkiksi valmistettaessa US-patenttijulkaisussa 4 673 672 kuvattuja tiettyjen kasvaintenvastaisten yhdisteiden optisia isomeerejä, kun tällaisia yhdisteitä halutaan valmistaa optisesti puhtaassa muodossa.

15 Kaavan I mukainen yhdiste ja sen enantiomeeri ja kaavan II mukainen yhdiste vapaassa tai suojatussa muodossa voidaan eristää vastaavista reaktioseoksista ja puhdistaa tavanomaisilla menetelmillä, kuten pylväskromatografiesti, preparatiivisella ohutlevykromatografialla tai
 20 fraktiotislauksella.

Lähtöaineena käytetty kaavan III mukainen yhdiste voidaan valmistaa kirjallisuudessa kuvatuilla menetelmillä, esimerkiksi antamalla 2,2-bis(hydroksimetyyli)tetrahydrofuraanin reagoida butyryylikloridin kanssa.

25 Seuraavat esimerkit kuvaavat käsillä olevaa keksintöä. Kaikki lämpötilat on esitetty Celsius-asteina.

Esimerkki 1

(R)-2-[(2-oktadekyylioksimetyylitetrahydrofuran-2-
 30 yylimetoksi)hydroksifosfinyylioksi]-N,N,N-trimetyylietani
 niaminiumhydroksidi-sisäinen suola-4-oksidi

[Kaavan I mukainen yhdiste]

[Menetelmä: kaavan II mukaisen yhdisteen oktadekyyli
 laatio ja fosforyylikolinaatio suojaamalla välituote ja
 sitten poistamalla sen suojaus]

35 a) Vaihe 1

48,82 g kaavan IIb mukaista yhdistettä (katso esimerkki 5), 3,2 g kaliumkarbonaattia ja 500 ml metanolia

sekoitetaan huoneenlämmössä yön yli, jonka jälkeen reaktioseos laimennetaan 400 ml:lla etyyliasetaatia ja pestään kyllästetyllä ammoniumkloridiliuoksella. Sitten vesikerros erotetaan ja sitä uutetaan kolme kertaa etyyliasetaatilla. Etyyliasetaattikerrokset yhdistetään ja ne pestään kaksi kertaa kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella, kuivataan natriumsulfaatilla ja suodatetaan. Sitten liuotin poistetaan ja raaka tuote kromatografoidaan silikageelillä käyttäen ensin eluenttiseosta, jossa on etyyliasetaatia ja heksaania 1:3, ja sitten eluenttiseosta, jossa on etyyliasetaatia ja heksaania 1:1. Tuloksena saadaan (S)-2-hydroksimetyyli-2-trityylioksimetyylitetrahydrofuraania (kaavan IV mukainen yhdiste, jossa R on trityyli-trifenyyylimetyyli), s.p. 75,2 - 77,6 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,85^\circ$ metanolissa.

b) Vaihe 2

Seosta, jossa on 9,857 g natriumhydridiä (60 % dispersio), 6,961 g tetrabutyyliammoniumjodidia ja 205 ml tetrahydrofuraania, jäähdytetään lämpötilaan 5 °C. Sitten jäähdytettyyn seokseen lisätään liuos, jossa on 54,284 g vaiheessa 1 valmistettua yhdistettä 205 ml:ssa tetrahydrofuraania, ja tuloksena saatu seos lämmitetään huoneenlämpöön ja sitä sekoitetaan 15 minuuttia. Sitten siihen lisätään liuos, jossa on 20,7 ml bentsyylibromidia 245 ml:ssa tetrahydrofuraania, ja reaktioseos kuumennetaan refluksilämpötilaan, jossa sitä pidetään samalla sekoittaen 2,5 tuntia. Sitten reaktioseos jäähdytetään 10 °C:een ja sammutetaan 45 ml:lla isopropyylialkoholia. Sitten lisätään 900 ml kyllästettyä ammoniumkloridiliuosta ja orgaaninen kerros erotetaan ja se pestään kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella, kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja konsentroidaan. Sitten raaka tuote kromatografoidaan silikageelillä käyttäen eluenttina heksaanin ja etyyliasetatin 95:5 seosta. Tuloksena saadaan (S)-2-bentsyylioksimetyyli-2-trityylioksimetyylitetrahydrofuraania (kaavan V mukainen yhdiste, jossa R on trityyli ja Bz on bentsyyli).

c) Vaihe 3

Sekoitettuun seokseen, jossa on 64,719 g vaiheessa 2 valmistettua yhdistettä ja 1 600 ml metyleenikloridia, lisätään esijäähdytettyä liuosta, jossa on 240 ml trifluorietikkahappoa 750 ml:ssa vettä, ja tuloksena saatua liuosta sekoitetaan huoneenlämmössä yön yli. Sitten orgaaninen kerros erotetaan, se pestään kaksi kertaa kyllästetyllä natriumbikarbonaattiliuoksella, se pestään kaksi kertaa kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella, kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja konsentroidaan. Sitten raaka tuote kromatografoidaan silikageelillä käyttäen ensin eluenttiseosta, jossa on etyyliasetaattia ja heksaania 1:2, ja sitten käyttäen eluenttiseosta, jossa on etyyliasetaattia ja heksaania 3:2, jolloin saadaan (R)-2-bentsyylioksimetyyli-2-hydroksimetyylitetrahydrofuraania (kaavan VI mukainen yhdiste, jossa Bz on bentsyyli).

d) Vaihe 4

Seosta, jossa on 6,764 g natriumhydridiä (60 % dispersio), 4,775 g tetrabutyyliammoniumjodidia ja 130 ml tetrahydrofuraania, jäähdytetään 5 °C:een typen ilmakehässä. Sitten jäähdytettyyn seokseen lisätään liuosta, jossa on 22,11 g vaiheessa 3 valmistettua yhdistettä 130 ml:ssa tetrahydrofuraania, ja tuloksena saatu seos lämmitetään huoneenlämpöiseksi ja sitä sekoitetaan 20 minuuttia. Siihen lisätään liuos, jossa on 39,79 g 1-bromioktadekaania 155 ml:ssa tetrahydrofuraania, ja reaktioseos kuumennetaan refluksilämpötilaan ja sitä sekoitetaan yön yli. Sitten reaktioseos jäähdytetään 5 °C:een ja sammutetaan 50 ml:lla isopropanolia, sitten lisätään 500 ml kyllästettyä ammoniumkloridiliuosta. Sitten orgaaninen kerros erotetaan ja se pestään kaksi kertaa kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella, kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja konsentroidaan liuottimen poistamiseksi. Sitten raaka tuote kromatografoidaan silikageelillä, ensin käyttäen heksaania eluenttina ja sitten käyttäen etyyliasetaatin ja heksaanin 1:6 eluenttiseosta, jolloin saadaan (R)-2-bentsyylioksime-

tyyli-2-oktadekyylioksimetyyllitetrahydrofuraania (kaavan VII mukainen yhdiste, jossa Bz on bentsyyli).

e) Vaihe 5

11,5 g 10 % palladiumia hiilellä lisätään Parr-pullossa liuokseen, jossa on 22,523 g vaiheessa 4 valmistettua yhdistettä 250 ml:ssa 95 % etanoli/vesi-seosta. Sitten lisätään 10 tippaa etikkahappoa ja seos hydrataan huoneenlämmössä paineen alla, kunnes yhteytys on täydellinen. Sitten katalyytti suodatetaan pois ja suodos konsentroidaan tyhjössä. Sitten sakka kromatografoidaan silikageelillä käyttäen etyyliasetaatin ja heksaanin 1:3 eluenttiseosta, ja näin saadaan (S)-2-hydroksimetyyli-2-oktadekyylioksimetyyllitetrahydrofuraania (kaavan VIII mukainen yhdiste).

f) Vaihe 6'

500 ml:n 4-kaulaiseen pyöreäpohjaiseen pulloon lisätään 10,042 g vaiheessa 5 valmistettua yhdistettä ja 200 ml metyleenikloridia ja näin saatu liuos jäähdytetään 3 °C:een typen ilmakehässä. Jäähdytettyyn liuokseen lisätään 2,57 ml fosforioksikloridia, sitten lisätään 4,57 ml trietyyliamiinia tipoittain, samalla kun lämpötila pidetään 5 °C:n alapuolella. Sitten tuloksena saatua seosta sekoitetaan huoneenlämmössä 20 tuntia ja se jäähdytetään 5 °C:een. Sitten jäähdytettyyn seokseen lisätään 22,8 ml pyridiiniä, 0,296 g 4-dimetyyliaminopyridiiniä ja 13,897 g koliini-reagenssia. Sitten reaktioseosta sekoitetaan huoneenlämmössä 72 tuntia, kiinteät osat poistetaan suodattamalla ja seos konsentroidaan liuottimien poistamiseksi. Sitten näin saatu sakka liuotetaan seokseen, jossa on 205 ml tetrahydrofuraania, 48 ml vettä ja 25 ml pyridiiniä, ja tätä liuosta kuumennetaan refluksilämpötilaan, jossa sitä pidetään 5 tuntia. Sitten liuos jäähdytetään huoneenlämpöön, suodatetaan pylvään läpi, jossa on 685 g Amberlite MB-3 ioninvaihtohartsia, ja eluoidaan seoksella, jossa on 10 % vettä tetrahydrofuraanissa. Sitten otetaan talteen ne fraktiot, jotka sisältävät haluttua tuotetta,

ne yhdistetään ja konsentroidaan ja näin saatu jäännös
 jäähdytetään 0 °C:een. Sitten lisätään 170 ml asetonia ti-
 poittain ja tuloksena saatua suspensiota sekoitetaan
 0 °C:ssa 30 minuuttia, jonka ajan jälkeen saadaan suodat-
 5 tamalla keltaista vahamaista kiinteää ainetta. Sitten
 kiinteä aine kromatografoidaan silikageelillä, ensin käyt-
 täen metyleenikloridin, metanolin ja veden 79:19:2 eluent-
 tiseosta ja sitten metyleenikloridin, metanolin ja veden
 10 10:5:1 eluenttiseosta. Sitten fraktiot yhdistetään, kon-
 sentroidaan 40 ml:n tilavuuteen ja jäähdytetään 5 °C:een.
 Sitten lisätään 160 ml asetonia tipoittain ja valkoinen
 sakka muodostuu. Sitten seosta sekoitetaan 5 °C:ssa 30 mi-
 nuuttia ja kiinteä aine otetaan talteen suodattamalla ja
 sitten se liuotetaan 250 ml:aan absoluuttista etanolia.
 15 Sen jälkeen, kun 200 ml liuotinta on poistettu, jäännös
 lisätään tipoittain 260 ml:aan asetonia. Sitten lisätään
 1,2 ml vettä ja seos jäähdytetään 5 °C:een ja pidetään
 tässä lämpötilassa yön yli. Näin saatu kiinteä aine ote-
 taan talteen suodattamalla, se pestään kylmällä asetonilla
 20 ja kuivataan korkeatyhjöpumpussa huoneenlämmössä ja näin
 saadaan otsikon mukaista tuotetta, s.p. 193 °C; $[\alpha]_D^{25} =$
 +1,9° etanolissa.

Esimerkki 2

(S)-2-[(2-oktadekyylioksimetyyli-tetrahydrofuran-2-
 25 yylimetoksi)hydroksifosfinyylioksi]-N,N,N-trimetyylietaa-
 niaminiumhydroksidi-sisäinen suola-4-oksidi

[Kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeri]

[Menetelmä: kuten esimerkissä 1]

a) Vaihe A

30 Katso esimerkki 1, vaihe 1.

b) Vaihe B

Yhdenmukainen esimerkin 1 vaiheen 4 kanssa paitsi,
 että käytetään yllä esitetyn vaiheen A mukaista yhdistettä
 vaiheen 3 mukaisen yhdisteen sijasta, jolloin saadaan (S)-
 35 2-oktadekyylioksimetyyli-2-trityylioksimetyyli-tetrahydro-
 furaania (kaavan X mukainen yhdiste, jossa R on trityyli).

c) Vaihe C

Yhdenmukainen esimerkin 1 vaiheen 3 kanssa paitsi, että käytetään yllä esitetyn vaiheen B mukaista yhdistettä vaiheen 2 mukaisen yhdisteen sijasta, jolloin saadaan (R)-
 5 2-hydroksimetyyli-2-oktadekyylioksimetyylitetrahydrofuraania (kaavan XI mukainen yhdiste).

d) Vaihe D'

Yhdenmukainen esimerkin 1 vaiheen 6' kanssa paitsi, että käytetään yllä esitetyn vaiheen C mukaista yhdistettä
 10 vaiheen 5 mukaisen yhdisteen sijasta, jolloin saadaan ot-sikon mukaista tuotetta, s.p. 188 °C; $[\alpha]_D^{25} = -1,9^\circ$ etanolissa.

Esimerkki 3

(R)-2,2-bis(hydroksimetyyli)tetrahydrofuraanimono-
 15 butyraatti

[Kaavan II mukainen yhdiste]

[Menetelmä: enantiospesifinen monohydrolyysi]

a) PPL

1,36 g (5 mmol) 2,2-bis(hydroksimetyyli)tetrahydro-
 20 furaanidibutyraattia (kaavan III mukainen yhdiste) suspendoidaan puskuroituun seokseen, jossa on 50 ml vettä ja 50 ml heksaania, ja tuloksena saadun suspension pH säädetään arvoon 7 lisäämällä etikkahappoa ja/tai 2N natriumhydroksidia. Näin saatuun puskuroituun suspensioon lisä-
 25 tään samalla sekoittaen 100 mg porsaan haiman lipaasia (PPL) (yhtiöstä Sigma Chem. Corp.; 42 U/mg), joka saa aikaan välittömän reaktion. Reaktion annetaan jatkua ja samalla pH pidetään jatkuvasti säädettyinä arvoon 7 lisäämällä 2 N natriumhydroksidia. Sen jälkeen, kun reaktio hidastuu (noin 45 minuuttia), faasit erotetaan ja vesifaasia
 30 uutetaan kolme kertaa etyyliasetaatilla. Sitten orgaaniset faasit yhdistetään, kuivataan magnesiumsulfaatilla, suodattetaan ja konsentroidaan tyhjössä, jonka jälkeen saadaan raaka tuote. Sen jälkeen, kun on suoritettu liekkikromatografointi silikageelillä käyttäen eluenttina heksaanin ja etyyliasetaatin 1:1 seosta ja Kugelrohr tislau-
 35 sta, saadaan

otsikon mukaista tuotetta (öljy; saanto 89 %; kemiallinen puhtaus 99 %; $[\alpha]_D^{25} = +19,5^\circ$ tolueenissa).

b) PPL

3 litran pulloon, jossa on sekoittaja, pH-mittari ja auto-byretti, lisätään 1 litra pH 7 puskuria, 1 litra heksaania ja 2,2 g lipaasia PPL, sitten näin saadun suspension pH säädetään arvoon 7 lisäämällä etikkahappoa. Näin saatuun suspensioon lisätään samalla sekoittaen 27,2 g 2,2-bis(hydroksimetyyli)tetrahydrofuraanidibutyraattia (laimennettu minimimäärällä heksaania). Reaktion annetaan edetä ja samalla pH pidetään jatkuvasti säädettyinä arvoon 7 lisäämällä 2 N natriumhydroksidia. Sen jälkeen, kun reaktio on noin 98 % täydellinen, kaadetaan reaktioseos 1 litraan etyyliasetaattia ja uutetaan. Orgaaninen kerros erotetaan, kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan silikageelin läpi ja haihdutetaan, jolloin saadaan otsikon mukaista tuotetta raa'assa muodossa (öljy; kemiallinen puhtaus > 99 %; $[\alpha]_D^{25} = +19,5^\circ$ tolueenissa; k.p. 125 °C paineessa 0,5 mmHg käyttäen bulb-to-bulb tislautusta).

c) LMJ

Yhdenmukainen esimerkin 2 vaiheen a) kanssa paitsi, että käytetään yllä esitetyn entsyymin PPL sijasta 19 mg mikrobista lipaasia *Mucor javanicus*ista (LMJ) (yhtiöstä Fluka Chemical Co.; 5 U/g), ja annetaan reaktion jatkua 5,5 tuntia 45 minuutin sijasta, jolloin saadaan otsikon mukaista tuotetta (öljy: saanto 64 %; $[\alpha]_D^{25} = +14,3^\circ$ tolueenissa).

Lähtöaine saadaan seuraavasti:

Kaksi-kaulaiseen, pyöreäpohjaiseen pulloon (varustettu lisäyssuppilolla, refluksilauhduttimella ja poistaukolla HCl erottimeen), joka sisältää 101,6 g 2,2-bis(hydroksimetyyli)tetrahydrofuraania 800 ml:ssa dikloorimetaania, lisätään 176 ml butyryylikloridia (heikosti eksoterminen) 40 minuutin aikana. Tuloksena saatua liuosta (vetykloridikaasu on sammutettu) sekoitetaan 21 tuntia,

minkä jälkeen lisätään 1 200 ml vesipitoista natriumbikarbonaattiliuosta 30 minuutin aikana. Faasit erotetaan ja vesifaasia uutetaan kolme kertaa dikloorimetaanilla. Orgaaniset faasit yhdistetään, kuivataan magnesiumsulfaattilla, suodatetaan ja konsentroidaan tyhjössä. Tuloksena saatu keltainen jäännös tislataan, jonka jälkeen saadaan 2,2-bis(hydroksimetyyli)tetrahydrofuraanidibutyraattia (väritön neste; k.p. 127 - 128 °C paineessa 0,4 mmHg).

Esimerkki 4

10 (S)-2-difenyylisilyylioksimetyyli-2-hydroksimetyyllitetrahydrofuraanibutyraatti

[Kaavan IIa mukainen yhdiste]

[Menetelmä: kaavan II mukaisen yhdisteen suojaus]

6,06 g raa'assa muodossa olevaa esimerkin 3a) mukaista yhdistettä liuotetaan 75 ml:aan dimetyyliformamidia ja liuokseen lisätään 4,08 g imidatsolia ja 12,38 g t-butyliklooridifenyylisilaania. Sitten tätä liuosta sekoitetaan huoneenlämmössä, kunnes lähtöainetta ei ole enää havaittavissa (noin 3 - 12 tuntia). Sitten lisätään 75 ml vettä ja näin saatua seosta uutetaan neljä kertaa dietyylieetterillä. Sitten orgaaniset faasit yhdistetään, pestään 100 ml:lla vettä, kuivataan magnesiumsulfaattilla, suodatetaan ja konsentroidaan tyhjössä. Sen jälkeen, kun on suoritettu keskipainenestekromatografia silikageelillä käyttäen heksaanin ja etyyliasetaatin 9:1 seosta eluenttina, saadaan otsikon mukainen tuote (öljy).

Esimerkki 5

(R)-2-hydroksimetyyli-2-trifenyylimetoksimetyyllitetrahydrofuraanibutyraatti

30 [Kaavan IIb mukainen yhdiste]

[Menetelmä: kaavan II mukaisen yhdisteen suojaus]

21,5 g edellä kuvatun esimerkin 3b) mukaista yhdistettä liuotetaan 400 ml:aan metyleenikloridia ja näin saatu liuos jäädytetään -30 °C:een. Jäädytettyyn liuokseen lisätään 10,51 ml pyridiiniä ja liuos, jossa on 33,454 g

trifenyylikloorimetaania 100 ml:ssa metyleenikloridia, samalla kun lämpötila pidetään -30 °C:ssa. Sitten reaktio-seoksen annetaan lämmitä hitaasti yön aikana huoneenlämpöön, sitten se laimennetaan 400 ml:lla etyyliasetaatia, 5 pestään kaksi kertaa 2 N suolahapolla, ja pestään kaksi kertaa kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella. Sitten orgaaninen kerros kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan ja liuottimet poistetaan, jolloin saadaan otsikon mukainen tuote raaka-ainemuodossa.

10 Lisäksi on havaittu, että kaavan I mukaisella yhdisteellä ja sen enantiomeerilla on yllättäviä ja edullisia farmakologisia ominaisuuksia.

Kuten jo edellä on esitetty, on vastaava rasemaatti tunnettu esimerkiksi US-patenttijulkaisun 4 673 672 esimerkistä 5 kasvainten vastaisena aineena. Nyt on havaittu, että kasvaimen vastaiset ominaisuudet ovat peräisin pääasiallisesti (S)-isomeeristä, kun (R)-isomeerin, eli kaavan I mukaisen yhdisteen, on havaittu olevan tehoton tuossa indikaatiossa.

20 Vielä yllättävämpää on se, että on havaittu, että kaavan I mukainen yhdiste toisaalta, eli (R)-isomeeri, on indikoitu käytettäväksi multippeliskleroosissa. Tämä uusi aktiivisuus on peräisin pääasiallisesti (R)-isomeeristä, kun taas (S)-isomeeri on tehoton. Tätä aktiivisuutta tätä 25 käyttöä varten ei ole esitetty missään tälle rasemaatille käsillä olevan keksinnön prioriteettipäivänä.

Keksinnön mukaisella menetelmällä saadaan siten kaksi enantiomeerista yhdistettä, joista kummallakin on hyödyllistä farmakologista aktiivisuutta, jota toisella isomeerilla ei ole. Tämä havainto korostaa kummankin puh- 30 taan isomeerin saamisen toivottavuutta ja edullisuutta, joihin edellä on yleisesti viitattu.

Kaavan I mukaisen yhdisteen aktiivisuus käsitel- 35 täessä multippeliskleroosia (keskushermoston pesäkekovetumatauti) voidaan osoittaa käyttämällä seuraavia testimenetelmiä:

1. Kokeellinen allerginen enkefalomyeliitti (=aivo-selkäydintulehdus) (EAE testi) rotassa; ehkäisevä hoito: [Levine et al., Am.J.Path. 47 (1965) 61; McFarlin et al., J.Immunol. 113 (1974) 712; Borel, Transplant. & Clin. Immunol. 13 (1981) 3]:

Urospuolisten Wistar rottien takakäpäliin injektoidaan 0,1 ml naudan selkäydintä ja puhdasta Freundin adjuvanttia. Testiyhdistettä annetaan annoksilla 5 - 50 mg/kg/päivä suun kautta 5 päivänä viikossa aloittaen herkistyspäivänä ja jatkaen 2 viikkoa. EAE:n puhkeaminen kontrolliryhmässä, jotka eivät saa lääkitystä, tapahtuu yleensä 9 - 16 päivää herkistyksen jälkeen ja se havaitaan takaraajojen ja hännän halvaantumisoireina. Koe-eläimet tarkastetaan päivittäin taudin oireiden havaitsemiseksi ja taudin ilmenemistä arvioidaan oireiden vakavuuden mukaan. Totaalinen halvaantuminen tarkoittaa molempien takajalkojen ja hännän täydellistä lamaantumista. Koe-eläimiä tarkkaillaan yhteensä 50 päivän ajan.

Annettaessa kaavan I mukaista yhdistettä yllä kuvatuilla annoksilla, tarkkaillaan kliinisten oireiden ilmenemisen todellista vähenemistä koeajalla verrattuna placeboa saaviin kontrolliryhmiin.

2. Kokeellinen allerginen enkefalomyeliitti (EEA testi) rotassa; terapeutinen hoito:

Testaus suoritetaan yhdenmukaisesti yllä kuvatun testin kanssa paitsi, että koe yhdistettä aletaan antaa seitsemäntenä päivänä herkistyksen jälkeen (eli välittömästi ennen taudin oireiden ilmenemistä) annoksilla 5 - 50 mg/kg/päivä oraalisesti joko joka päivä tai joka toinen päivä jatkuen yhden viikon ajan. Tämän koejakson aikana eläimet tarkastetaan joka päivä taudin oireiden havaitsemiseksi ja taudin ilmenemistä arvioidaan samoin kuin edellisessä testimenetelmässä.

Annettaessa kaavan I mukaista yhdistettä edellä kuvatuilla annoksilla, havaitaan merkittävä EAE-taudin

oireiden väheneminen koeaikana verrattuna placeboa saaviin kontrolliryhmiin.

Seuraavat tulokset saatiin, kun rasemaattia, eli US-patenttijulkaisun 4 673 672 esimerkin 5 mukaista yhdistettä, kaavan I mukaista yhdistettä ja sen enantiomeeriä annettiin 25 mg/kg/päivä:

EAE-testi

10	Yhdiste	Ehkäisevä hoito		Terapeuttinen hoito	
		Eläimillä tot. halvaus) ¹ No/kok.m. %		Eläimillä EAE) ¹ No/kok.m. %	
15	Kontrolli	33/40	83	40/40	100
	US 4 673 672 esimerkki 5	3/7	43	2/7	29
	Kaavan I yhdiste	5/14	36		
	Kaavan I yhdisteen enantiomeeri	12/14	86		

¹⁾ Eläinten lukumäärä, joilla on tot. halvaus tai vastavasti taudin oireita per hoidettujen rottien kokonaismäärä.

Kuten yllä olevista tuloksista voidaan nähdä, näyttää siltä, että kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeristä ei ole hyötyä hoidettaessa multippeliskleroosia annoksella 25 mg/kg/päivä yllä kuvatulla menetelmällä. Lisäksi voidaan nähdä, että kaavan I mukainen yhdiste on selvästi tehokkaampi hoidettaessa multippeliskleroosia kuin raseeminen seos, eli US-patenttijulkaisun 4 673 672 esimerkin 5 mukainen yhdiste.

3. Kokeellinen allergisen enkefalomyeliitin krooninen uusiutuminen (CR-EAE testi) rotassa; terapeuttinen hoito:

Testaus suoritetaan yhdenmukaisesti yllä kuvatun menetelmän kanssa paitsi, että antigeeninen seos koostuu marsun selkäytimestä, joka on emulgoitu Freundin adjuvant-

tiin, johon on lisätty *Mycobacterium tuberculosis*. Koe-
yhdistettä annetaan annoksilla 5 - 50 mg/kg/päivä suun
kautta 16 päivän ajan, alkaen päivänä 16, joka vastaa en-
simmäisen spontaanin remission (taudin lieveneminen) alka-
5 mista. Koeajan aikana eläimet tarkastetaan päivittäin tau-
din oireiden havaitsemiseksi ja ne arvioidaan kuten edellä
on kuvattu.

Sekä kaavan I mukainen yhdiste että US-patenttijul-
kaisun 4 673 672 esimerkissä 5 esitetty yhdiste ovat te-
10 hokkaita inhiboitaessa lievistä vakavien kliinisten oirei-
den ilmaantumista hoitoajan. Kuitenkin vielä huomattavam-
paa on se, että kun lääkkeet lopetetaan päivänä 32, tätä
ei seuraa pahentunut uudelleen sairastuminen hoidetuissa
eläimissä: hoito ehkäisee uudelleen sairastumisen ilmene-
15 mistä lääkkeen lopettamisen jälkeenkin, eli rotat parane-
vat. On myös ilmeistä, että kaavan I mukainen yhdiste on
tehokas suojaamaan täysin kaikkia eläimiä sekä hoidon ai-
kana että lääkkeen lopettamisen jälkeen. Kaavan I mukaisen
yhdisteen enantiomeerillä on paljon vähemmän tehokasta
20 suojaavaa vaikutusta hoidon aikana, koska useat eläimet
osoittavat merkkejä EAE:sta. Kontrolliryhmän eläimet sai-
rastuvat uudelleen helposti hoitoajan aikana sekä 35 päi-
vän jälkeen useat rotat menevät kolmanteen ja pitkälliseen
sairastumisfaasiin.

25 4. Hidastetun tyyppinen yliherkkyys (DTH testi)
hiireissä:

DTH:n epäsuoraa keskeytystä kloonatuilla auttaja
T-soluilla testataan hiirillä, joita on injektoitu subku-
taanisesti kloonatuilla auttaja T-soluilla yhdessä sopivan
30 antigeenin, nimittäin lampaan erytrosyyttien, kanssa yh-
dessä takajalan käpälässä ja sama kloonin plus siitä riip-
pumaton antigeeni kontrollina toisessa käpälässä. Lääkkeet
annetaan oraalisesti kaksi kertaa, ensimmäinen päivää en-
nen ja taas soluinjektion antamisaikana. 24 tunnin jälkeen

käpälän paksuuden kasvu mitataan. Turvonnut käpälä ilmaistaan prosentteina verrattuna kontrolliryhmään (placebo).

Seuraavat tulokset saatiin:

5

DTH testi

Yhdiste	DHT:n suppressio (%) annoksella	
	2 x 40 mg/kg	2 x 80 mg/kg
Kontrolli	0	0
US 4 673 672 esimerkki 5	31	88
Kaavan I yhdiste	73	88
Kaavan I yhdisteen enantiomeeri	16	40

10

15

DTH reaktion keskeytymistä havaitaan sekä kaavan I mukaisella yhdisteellä että US-patenttijulkaisun 4 673 672 esimerkissä 5 kuvatulla yhdisteellä. Sitä vastoin kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeri osoittaa suhteellisen heikkoa inhiboivaa vaikutusta kummallakin annoksella.

20

Kaavan I mukaisen yhdisteen tarkka annos käytettäessä sitä multippeliskleroosin hoidossa riippuu useista tekijöistä, kuten isännästä, hoidettavan tilan luonteesta ja vakavuudesta ja antamisen tavasta. Kuitenkin yleensä multippeliskleroosin oireiden tyydyttävä inhibointi saavutetaan, kun yhdiste annetaan oraalisesti päiväannoksen ollessa noin 0,5 mg - noin 30 mg painokiloa kohden, edullisesti noin 1 mg/kg - 20 mg/kg. Päivän kokonaisannos on normaalisti noin 100 mg - 600 mg. Edullinen päivittäinen annos on 100 mg - 300 mg.

25

30

Kaavan I mukainen yhdiste voidaan yhdistää yhden tai useamman farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa ja valinnaisesti yhden tai useamman tavanomaisen farmaseuttisen adjuvantin kanssa ja se voidaan antaa oraalisesti tablettien, dispergoituvien jauheiden, rakeiden,

35

kapseleiden, eliksiirien, suspensioiden ja vastaavien muodossa. Koostumukset voidaan valmistaa tavanomaisilla menetelmillä.

5 Kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeerin aktiivisuus hoidettaessa kasvaimia voidaan osoittaa käyttämällä seuraavia koemenetelmiä:

1. Kasvainsolun sytotoksinen testi (TCC testi):

Tasapohjaisille mikrotiitterilevyille (nunc Roskide, Tanska) laitetaan Abelson 8.1 lymfoomaa, YAC-1-,
 10 L1210- tai P815 kasvainsoluja Dulbecon modifioidussa Eagle-alustassa (DMEM) + 10 % vasikan sikiöseerumia ja kasvainsoluja sisältäviä levyjä inkuboidaan yhdessä 1, 3 ja 5 µg testiyhdistettä 6 - 72 tunnin ajan. Elävien kasvainsolujen määrä läsnä Abelson 8.1, Yac-1, L1210 ja P815
 15 määrittelyksissä määritetään mittaamalla alkalinen fosfataasi seuraavalla tavalla: kasvainsolulevyjä sentrifugoidaan (500 x g) 10 minuutin ajan ja supernatantti heitetään pois. Ilman lisäpesuja lisätään 100 µl puskuria, joka sisältää 20 µl dietanoliamiinia, 2 µM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2,5 µM
 20 p-nitrofenyyli fosfaattia ja 10 mg Triton X-100:a. Näytteitä inkuboidaan 60 minuuttia huoneenlämmössä ja entsymaattinen reaktio lopetetaan lisäämällä 100 µl 0,5 N NaOH:a. Sitten mitataan absorbanssi 405 nm käyttäen Titertek Multiskan laitetta.

25 72 tunnin inkubointijaksona saatiin seuraavat tulokset:

TCC testi

	Yhdiste	pitoisuus (µg/ml)	Inhibitio kasvainsoluilla (%)			
			Abelson 8.1	YAC-1	L1210	P815
5	US 4 673 672 esimerkki 5	1	68	19	0	40
		3	97	74	80	87
		5	98	91	91	95
	Kaavan I yhdisteen enantio- meeri	1	91	40	45	84
		3	98	78	92	93
		5	98	91	97	97
10	Kaavan I yhdiste	1	29	8	16	32
		3	93	86	76	80
		5	95	96	87	97

15 Kuten yllä olevista tuloksista voidaan nähdä kaavan I mukaisen yhdisteen (S)-enantioomeeri on selvästi tehokkaampi hoidettaessa kasvaimia kuin raseeminen seos, eli US-patenttijulkaisun 4 673 672 esimerkin 5 mukainen yhdiste ja kaavan I mukainen yhdiste. Erityisemmin (S)-isomeeri on tehokkaampi inhiboitaessa erityyppisiä kasvaimia kuin kumpikaan raseemisista seoksista tai (R)-isomeeri, erityisesti alhaisemmissa pitoisuuksissa.

2. ET-18-OCH₃ testin vaikutus sytotoksisuuteen (IC-ET testi):

25 [BALB/CX57/BL₆]F1 hiiristä saatuja luuytimen solumakrofaageja (10⁵/kaivo) inkuboidaan yhdessä 10 µg (±)-1-oktadekyyli-2-metoksi-3-fosforyylikoliinin(ET-18-CH₃) kanssa 24 tuntia tasapohjaisilla mikrotiitterilevyillä (Nunc Roskilde, Tanska), sitten ne sentrifugoidaan ja pestään kerran. Sitten levyille, joissa on Abelson 8.1 lymfoomaa, YAC-1, L1210 tai P815 kasvainsoluja DMEM + 10 % vasikan luuydinseerumissa, lisätään 1 µg, 3 µg ja 5 µg koeyhdistettä. Kun ET-18-OCH₃ (10 µg) sytotoksisuus on asetettu 100 %:ksi, määritetään sytotoksisen tehon inhibitio tai

lisäys mitattuna alkalisella fosfataasi-määrityksellä, ja arvot merkitään ylös 72 tunnin jälkeen testiaineille.

Seuraavat tulokset saatiin:

5

IC-ET testi

	Yhdiste	pitoisuus (µg/ml)	Inhibitio kasvainsoluilla (%)			
			Abelson 8.1	YAC-1	L1210	P815
10	US 4 673 672 esimerkki 5	1	99,6	84	90,6	96,6
		3	99,8	97,5	98,4	99,3
		5	99,9	98,8	99,1	99,4
	Kaavan I yhdisteen enantio- meeri	1	99,5	89	96,6	97,6
		3	99,7	97,7	99,4	98,9
		5	99,8	99,1	99,8	99,7
15	Kaavan I yhdiste	1	99,2	89	94,7	96,9
		3	99,7	98,4	98,6	98,2
		5	99,6	99,1	98,9	98,7

20 Kuten yllä olevista tuloksista voidaan nähdä on kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeri tehokkaampi ET-18-OCH₃ sytotoksisen tehon lisäämisessä erityyppisissä kasvaimissa kuin raseeminen seos eli US-patenttijulkaisun 4 673 672 esimerkin 5 mukainen yhdiste ja kaavan I mukainen yhdiste.

25 3. In vivo Meth A fibrosarkooma testi hiireissä:

Meth A fibrosarkoomasoluja indusoidaan BALB/C hiirissä antamalla metyylikolantreeniä Old et al. kuvaaman menetelmän mukaisesti (Ann.N.Y.Acad.Sci., 101 (1962) 80). Nämä kasvainsolut otetaan talteen vatsakalvon ontelosta 30 10 - 12 päivää metyylikolantreenin annon jälkeen. Kymmenen 10 - 12 viikon ikäistä CBF₁ hiirtä kukin implantoidaan 7,3 x 10⁶ Meth A sarkoomasoluilla ja nämä toimivat kontrollina. Toinen kymmenen CBF₁ hiiren ryhmä implantoidaan 7,3 x 10⁶ Meth A sarkoomasoluilla ja implantoimisen jälkei- 35 senä päivänä kutakin hiirtä käsitellään p.o. 5 - 50 µg:lla

koeyhdistettä per päivä ja kokonaishoitoaika on 20 tai 27 päivää. Kasvaimen kasvu ja eloonjääneet määritetään päivinä 7, 14, 21 ja 28 kasvaimen implantoinnin jälkeen.

Seuraavat tulokset saatiin:

5

In vivo Meth A fibrosarkoomatesti hiiressä

Yhdiste	pitoisuus (µg)hiiri)	Kasvaimen tilavuus (% kontrollista)				Eloons- jääneet (ei kasv.)
		pv 7	pv 14	pv 21	pv 28	
10 US 4 673 672 esimerkki 5	5	82	47	20	32	3/10
	50	76	38	14	21	6/10
Kaavan I yhdisteen enantio- meeri	5	66	19	6	11	8/10
	50	70	28	8	13	8/10
15 Kaavan I yhdiste	5	90	52	21	37	2/10
	50	85	53	21	32	3/10

Kuten yllä olevista tuloksista voidaan nähdä, on kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeri paljon tehokkaampi hoidettaessa kasvaimia kuin raseeminen seos eli US-patenttijulkaisun 4 673 672 esimerkin 5 mukainen yhdiste ja kaavan I mukainen yhdiste, erityisesti pienemmällä annoksella. Lisäksi kun yksikään kontrolliryhmän eläimistä ei jäänyt henkiin 8 kymmenestä eläimestä, joille annettiin 5 µg (S)-isomeeriä jäivät henkiin.

Sen tosiasian perusteella, että kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeri on tehokkaampi hoidettaessa kasvaimia kuin sen raseeminen seos, eli US-patenttijulkaisun 4 673 672 esimerkissä 5 esitetty seos, voidaan sanoa, että farmaseuttisilla koostumuksilla, jotka sisältävät kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeriä aktiivisena ainesosana, on terapeuttisia etuja verrattuna raseemisen seoksen sisältäviin farmaseuttisiin koostumuksiin.

Kuten multippeliskleroosissa käytettävän kaavan I mukaisen yhdisteen kohdalla todettiin, riippuu kaavan I

mukaisen yhdisteen enantiomeerin tarkka annos käytettäessä
 sitä kasvainten, esimerkiksi useiden lymfoomien, sarkoo-
 mien, myeloomien ja leukemioiden, inhiboinnissa useista
 tekijöistä, kuten isännästä, hoidettavan tilan luonteesta
 5 ja vakavuudesta, antamisen tavasta ja käytetystä yhdis-
 teestä. Kuitenkin yleensä tyydyttävä kasvainten inhibitio
 saavutetaan, kun yhdistettä annetaan enteraalisesti, edul-
 lisesti oraalisesti tai parenteraalisesti päiväannoksen
 ollessa noin 1 mg - noin 100 mg painokiloa kohden, edulli-
 10 sesti noin 2 mg/kg - 50 mg/kg. Päivän kokonaisannos on
 normaalisti noin 50 mg - 1 000 mg, edullisesti noin
 100 mg - noin 700 mg. Tyypillinen päivittäinen annos on
 400 mg tai 10 mg/kg intravenoosisesti 24 tunnin aikana.
 Tyypillinen annosyksikkö oraalisessa annossa 2 - 4 kertaa
 15 päivässä kasvainten inhiboinnissa voi sisältää noin
 75 mg - noin 300 mg yhdistettä. Edulliset oraaliset annos-
 yksiköt kasvainten inhiboimiseksi sisältävät noin 75 mg -
 noin 250 mg, edullisesti noin 100 mg - noin 200 mg yhdis-
 tettä. Kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeri voidaan
 20 yhdistää yhden tai useamman farmaseuttisesti hyväksyttävän
 kantajan kanssa ja sitä voidaan antaa oraalisesti tablet-
 tien, dispergoituvien jauheiden, rakeiden, kapseleiden,
 eliksiirien ja suspensioiden muodossa.

Kaavan I mukainen yhdiste ja vastaavasti sen enan-
 tiomeeri voidaan formuloida sellaisiin farmaseuttisiin
 25 koostumuksiin, jotka sisältävät mainittua ortisesti aktii-
 vista yhdistettä sellaisen määrän, joka on tehokas hoidet-
 taessa multippeliskleroosia tai, vastaavasti, kasvaimia,
 jolloin mainitut koostumukset ovat yksikköannosmuodoissa
 30 ja sisältävät kiinteän farmaseuttisesti hyväksyttävän kan-
 tajan.

Tabletit ja kapselit, jotka sisältävät alla esitet-
 tyjä ainesosia, voidaan valmistaa tavanomaisilla menetel-
 millä ja ne ovat hyödyllisiä hoidettaessa multippeliskle-
 35 roosia tai vastaavasti inhiboitaessa kasvaimia:

	Ainesosa	Tabletti	Kapseli
		paino (mg)	
5	Kaavan I yhdiste tai sen enantiomeeri	150	150
	Tragantti	10	-
	Laktoosi (spray-kuivattu)	197,5	250
	Maissitärkkelys	25	-
	Talkki	15	-
	Magnesiumstearaatti	2,5	-
		kokonaismäärä: 400	400

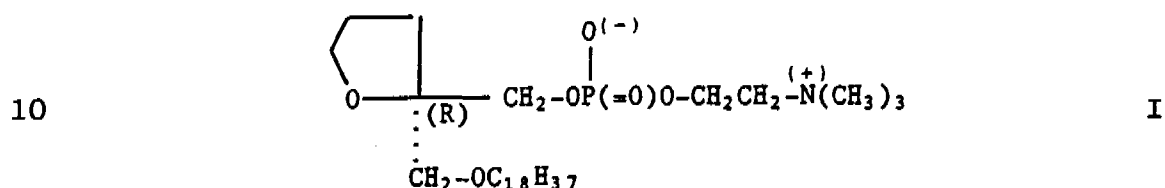
10

Valmistuksen ja antamisen helppouden kannalta edullisia farmaseuttisia koostumuksia ovat kiinteät koostumukset, erityisesti nesteet tai kovatäytetyt kapselit ja tabletit, jotka sisältävät noin 100 mg - noin 300 mg kaavan I mukaista yhdistettä tai vastaavasti noin 100 mg - noin 200 mg sen enantiomeeriä.

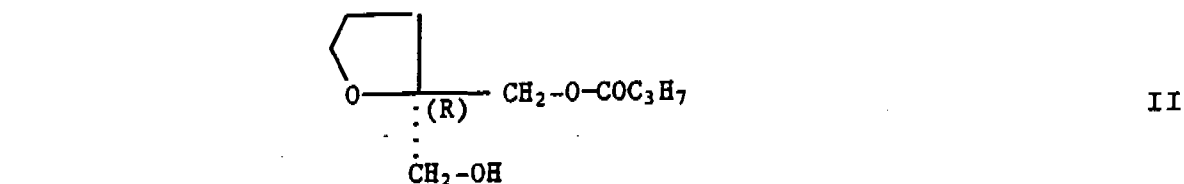
15

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen, nimittäin
(R)-2-[(2-oktadekyylioksimetyylitetrahydrofuran-2-yylime-
toksi)hydroksifosfinyylioksi]-N,N,N-trimetyylietaaniami-
niumhydroksidi-sisäinen suola-4-oksidin, ja sen enantio-
meerin valmistamiseksi,

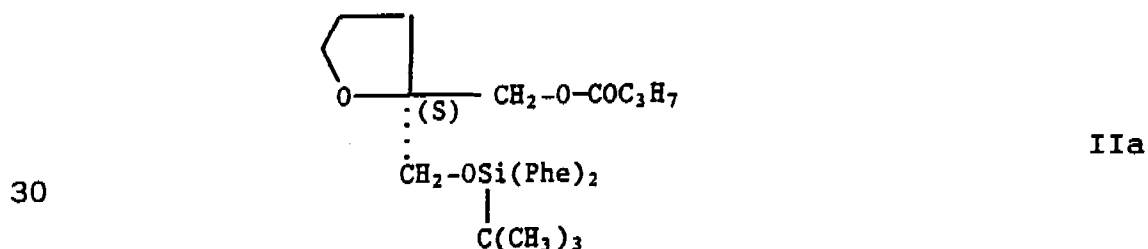


t u n n e t t u siitä, että oktadekylöidään ja fosforyy-
likolinoidaan kaavan II mukainen (R)-2,2-bis(hydroksime-
tyyli)tetrahydrofuraanimonobutyraatti



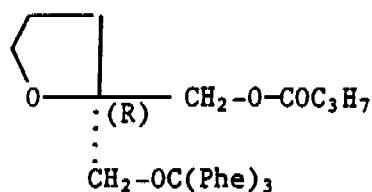
ja käytetään sopivasti välivaiheina suojausta ja suojauk-
sen poistoa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kaavan II mukainen yhdiste on
suojatussa muodossa ja se on kaavan IIa mukainen yhdiste



3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kaavan II mukainen yhdiste on
suojatussa muodossa ja se on kaavan IIb mukainen yhdiste

35



IIb

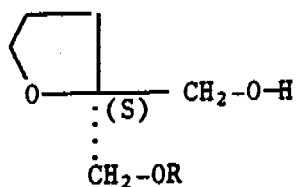
5

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se suoritetaan seuraavan reaktiosarjan mukaisesti:

10

II suojatussa muodossa

Vaihe 1

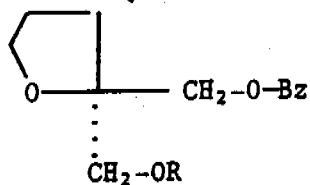


IV

15

(R = hydrolyyttisesti lohkeava suojaryhmä)

Vaihe 2

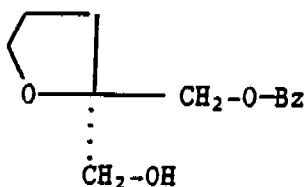


V

20

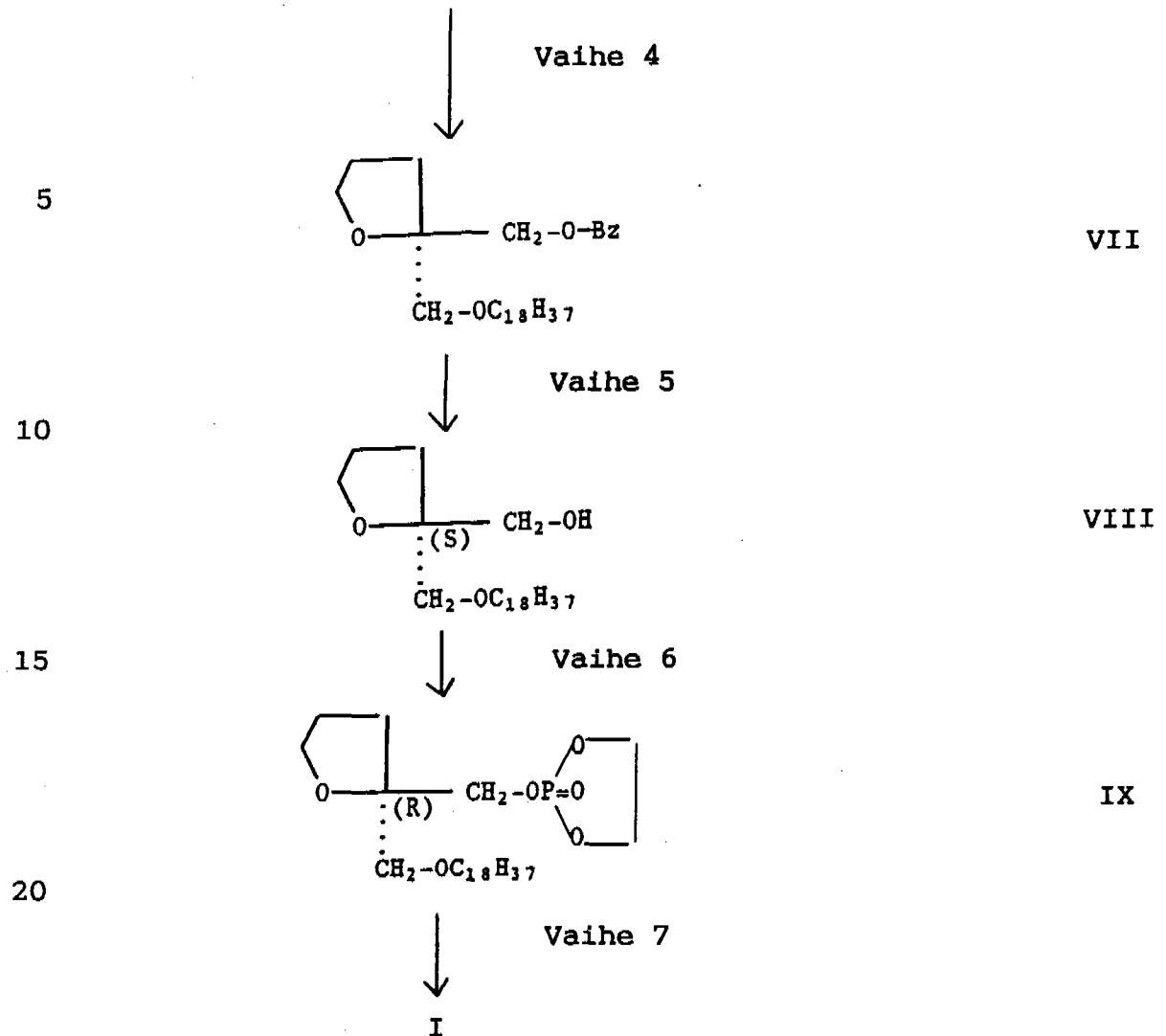
(Bz = hydrogenolyttisesti lohkeava suojaryhmä)

Vaihe 3



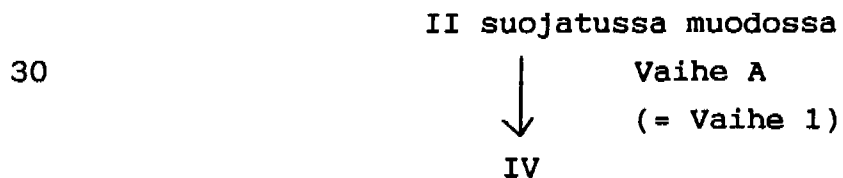
VI

30



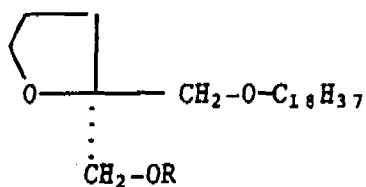
25

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeerin valmistamiseksi, tunnettu siitä, että se suoritetaan seuraavan reaktiosarjan mukaisesti:



Vaihe B
(= Vaihe 4)

5

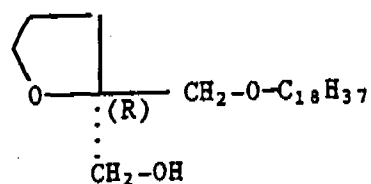


10

(R = hydrolyyttisesti lohkeava suojaryhmä)

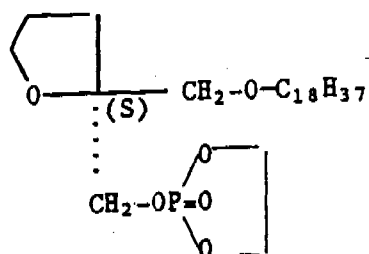
Vaihe C
(= Vaihe 3)

15



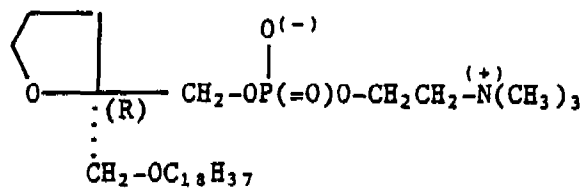
Vaihe D
(= Vaihe 6)

20



Vaihe E
(= Vaihe 7)

30

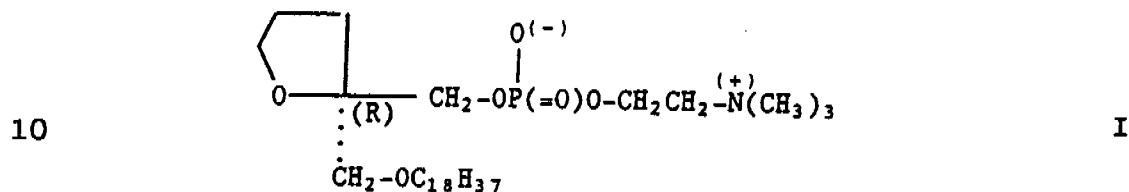


35

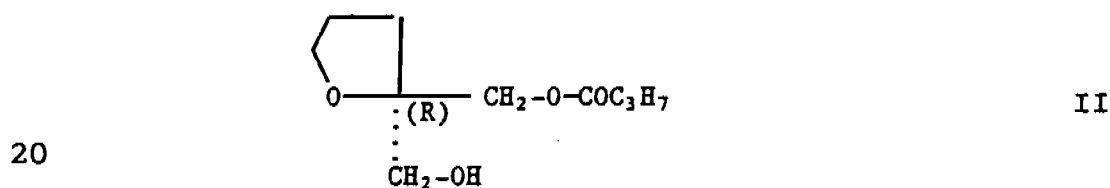
kaavan I mukaisen yhdisteen enantiomeeri.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en förening med
formeln I, nämligen (R)-2-[(2-oktadecyloximetyltetrahydro-
furan-2-ylmetoxi)hydroxifosfinyloxi]-N,N,N-trimetyletan-
aminiumhydroxid-inre salt-4-oxid, och dess enantiomer,

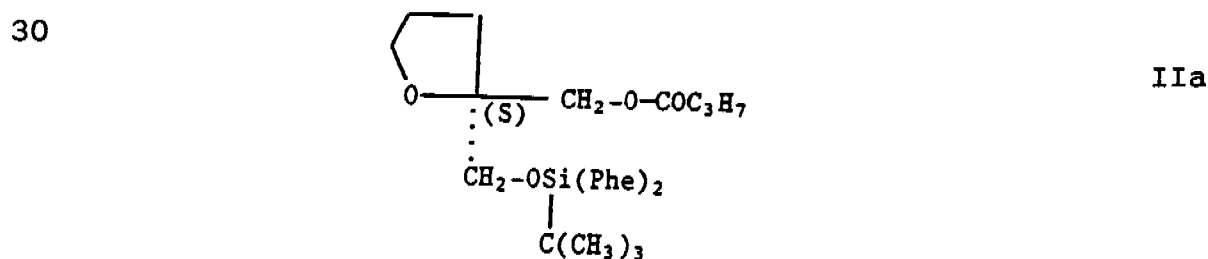


k ä n n e t e c k n a t av att man oktadecylerar och fos-
forylkolinerar (R)-2,2-bis(hydroximetyl)tetrahydrofuran-
monobutyrat med formeln II



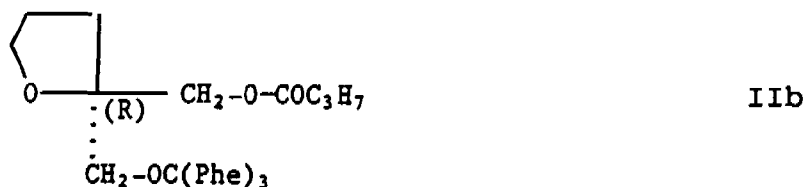
och använder lämpligt som mellansteg blockering och de-
blockering.

25 2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att föreningen med formeln II föreligger
i blockerad form och är en förening med formeln IIa



3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att föreningen med formeln II föreligger
i skyddad form och är en förening med formeln IIb

5



10

4. Förfarande enligt patentkrav 1 för framställning
av föreningen med formeln I, k ä n n e t e c k n a t av
att det utförs enligt följande reaktionssekvens:

15

II i blockerad form

↓ Steg 1



20

CH₂-OR

(R = en hydrolytiskt spjälkbar skyddsgrupp)

↓ Steg 2

25



(Bz = en hydrogenolytiskt spjälkbar skydds-
grupp)

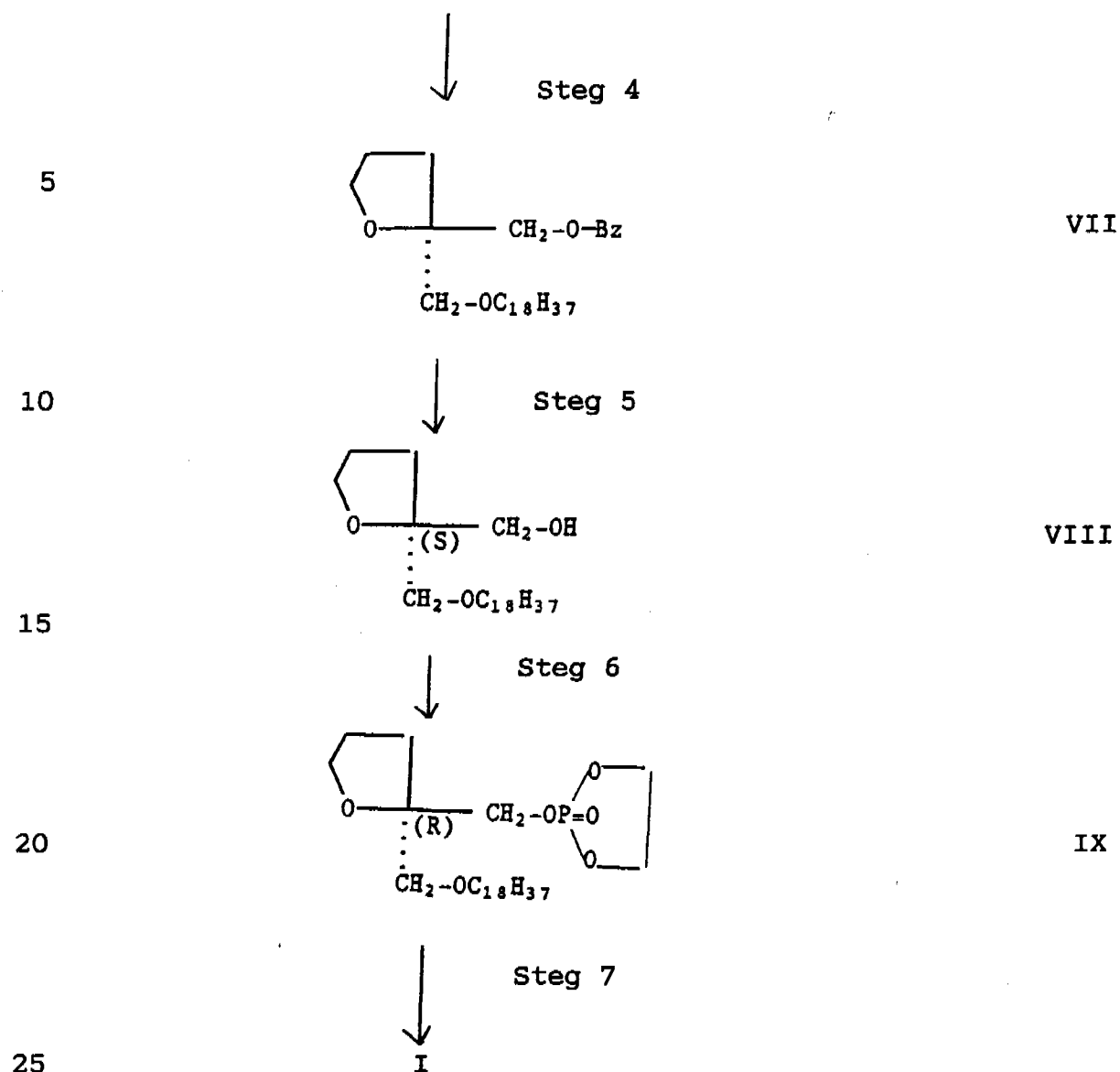
↓ Steg 3

30

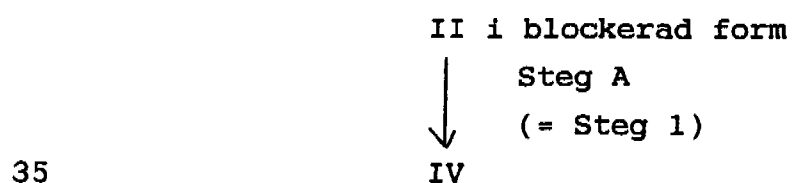


35

CH₂-OH

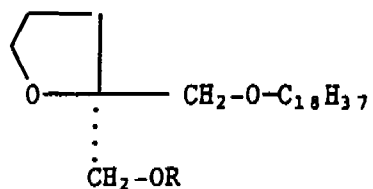


5. Förfarande enligt patentkrav 1 för framställning av enantiomeren av föreningen med formeln I, k ä n n e - t e c k n a t av att det utförs enligt följande reaktionssekvens:



Steg B
(= Steg 4)

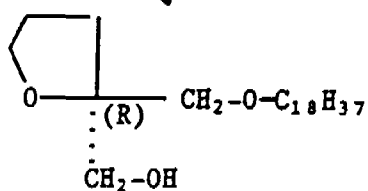
5



(R = en hydrolytiskt spjälkbar skyddsgrupp)

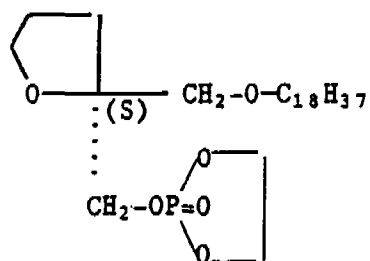
10

Steg C
(= Steg 3)



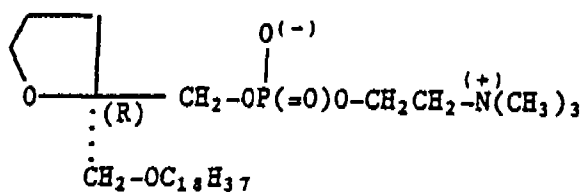
15

Steg D
(= Steg 6)



20

Steg E
(= Steg 7)



25

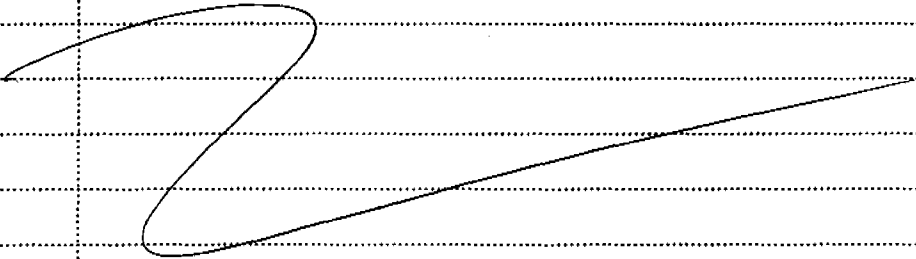
30

35

enantiomer av föreningen med formeln I.

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
912964	
	☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO	
Patenttivirastojen julkaisut FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US	
COFF 9/10, 9/655	
☐ jatkuu kääntöpuolella	
Muu aineisto	
EP, US - viitejulkaisut	
☐ jatkuu kääntöpuolella	

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
		
☐ jatkuu kääntöpuolella		
*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys	Tutkija NH	