

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 831746 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **831746**

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **18.05.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **18.05.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.11.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

21.05.1982 US 380498

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Debono, Manuel, Indianapolis, IN 46208, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Parannuksia A-21978C syklisten peptidien johdannaisissa ja niiden valmistuksessa tai niihin liittyen.

Förbättringar i och rörande derivat av A-21978C cykliska peptider och framställning av dem.

Parannuksia A-21978C syklisten peptidien johdannaisissa ja niiden valmistuksessa tai niihin liittyen

5 Tämä keksintö koskee uusia syklisten peptidien johdannaisia, joilla on antibioottivaikutus, sekä menetelmää näiden antibioottisten johdannaisten valmistamiseksi puolisynteettisesti.

10 On olemassa huomattava tarve kehittää uusia antibiootteja, koska on varsin mahdollista ja jatkuvana uhkana, että patogeeniset mikro-organismit muodostavat antibioottispesifisiä, resistenttejä kantoja. Erityisesti patogeenit, jotka kuuluvat grampositiivisiin sukuihin Staphylococcus ja Streptococcus, ovat usein resistenttejä yleisesti käytetyille antibiooteille kuten
15 penisilliinille ja erytromysiinille, ks. esim. W.O.Faye, Principles of Medicinal Chemistry, s. 684-686 (1974).

Keksinnönmukaisesti on havaittu, että uudet A-21978C syklisten peptidien johdannaiset ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat ovat tehokkaita anti-
20 biootteja.

Nämä uudet johdannaiset voidaan valmistaa antamalla A-21978C-ytimen, joka on valmistettu deasyloimalla asianmukaisesti estetty A-21978C-kompleksi tai jokin sen asianmukaisesti estetyistä yksittäisistä tekijöistä
25 C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 tai C_5 , reagoida halutun asyloimisaineen tai sen aktivoidun johdannaisten kanssa.

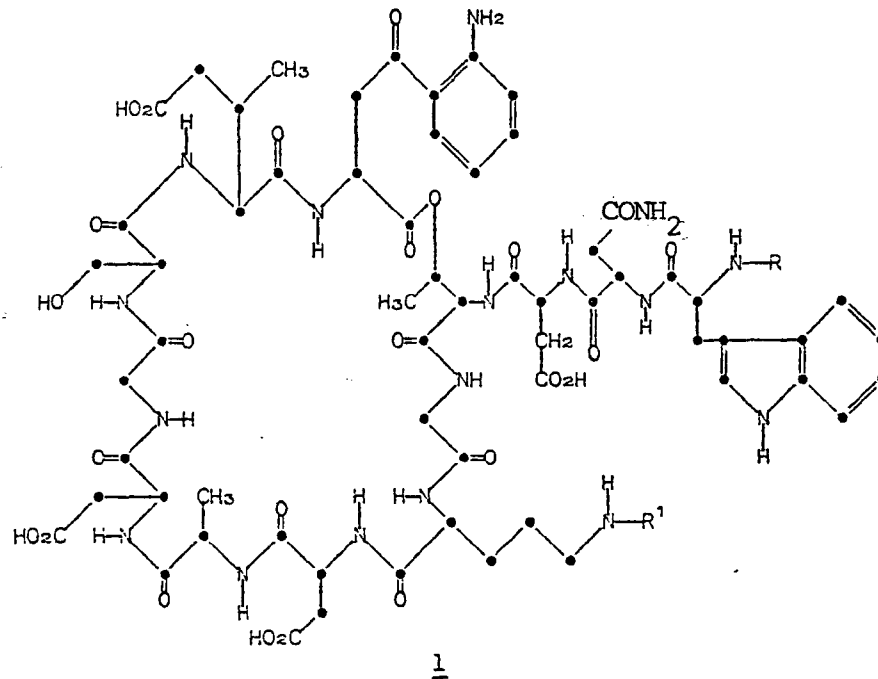
Keksinnönmukaisesti on havaittu, että A-21978C syklisten peptidien johdannaiset, jotka ovat kaava 1

5

10

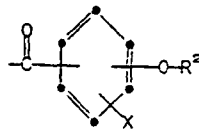
15

20



jossa R on kaavaa

25



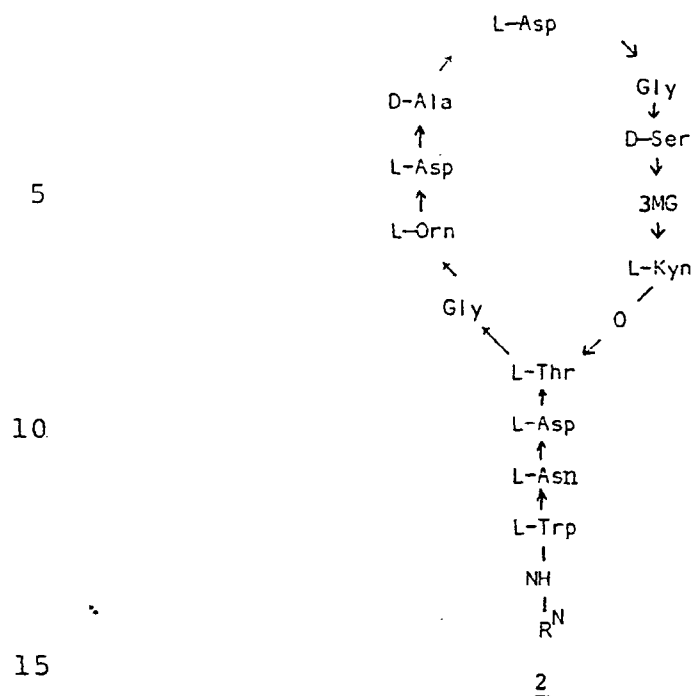
30

oleva substituoitu bentsoyyliryhmä, R^2 on C_8-C_{15} -alkyyli;
 X on vety, kloori, bromi, jodi, nitro, C_1-C_3 -alkyyli,
 hydroksi, C_1-C_3 -alkoksi tai C_1-C_3 -alkyyli- ja R^1 on
 vety tai aminonsuojaryhmä, sekä näiden peptidien suolat
 35 ovat käyttökelpoisia, puolisynteettisiä bakteerilääk-

keitä tai tällaisten lääkkeiden välituotteita.

Tässä patenttijulkaisussa käytetään seuraavia lyhenteitä, joista useimmat ovat yleisesti tunnettuja tekniikan tasolla:

- Ala: alaniini
- 5 Asp: asparigiinihappo
- Gly: glysiini
- Kyn: kynureniini
- Orn: ornitiini
- Ser: seriini
- 10 Thr: treoniini
- Trip: tryptofaani
- t-BOC :tert.-butoksikarbonyyli
- Cbz: bentsyylioksikarbonyyli
- DMF: dimetyyliformamidi
- 15 THF: tetrahydrofuraani
- HPLC: suuren suorituskyvyn nestekromatografia
- NMR: ^1H ydinmagneettinen resonanssi
- TLC: ohutkerroskromatografia
- UV: ultravioletti
- 20 A-21978C antibiootit ovat keskenään läheisesti sukua olevia, happamia peptidiantibiootteja.
- A-21978C antibiootit on kuvattu US-patentissa n:o 4 208 403, joka on liitetty tähän viitteenä. Kuten US-patentissa 4 208,403 kuvataan A-21978 antibioottien
- 25 kompleksi muodostuu pääkomponentista eli tekijästä C, joka itse muodostuu läheisesti sukua olevien tekijöiden kompleksista. A-21978 tekijä C, joka kutsutaan A-21978C-kompleksiksi, muodostuu yksittäisistä tekijöistä C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 ja C_5 . Tekijät C_1 , C_2 ja C_3 ovat päätekijöitä
- 30 ja tekijät C_0 , C_4 ja C_5 ovat pienempiä tekijöitä.
- A-21978C-tekijöiden rakenne ilmenee kaavasta 2



20 jossa 3MG on L-treo-3-metyyliglutamiinihappo ja R^N on määrätty rasvahappo-osa. Tekijöiden määrättyt R^N -ryhmät ovat:

<u>A-21978C-tekijä</u>	<u>R^N-osa</u>
C_1	8-metyylidekanoyyli
C_2	10-metyyliundekanoyyli
25 C_3	10-metyylidodekanoyyli
C_0	C_{10} -alkanoyyli x
C_4	C_{12} -alkanoyyli x
C_5	C_{12} -alkanoyyli x

30 x ei vielä identifioitu

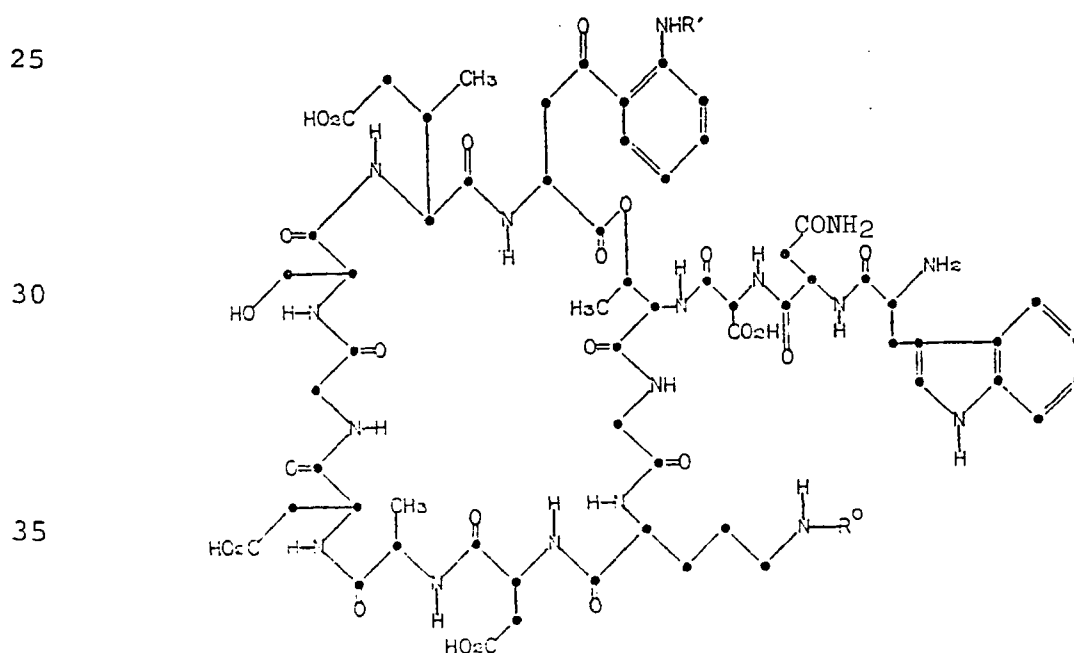
Jouduttaessa deasyloimaan peptidiantibiootti on äärimmäisen vaikeaa tietää, löytyykö tähän tarkoitukseen sopiva entsyymi. Substraattiantibiootin sisältäessä syklisen peptidiytimen tällaisen entsyymin löytäminen on vieläkin vaikeampaa. Koska entsyymit ovat erittäin spesifi-

35

siä, erot peptidiosassa ja substraatin sivuketjussa vaikuttavat deasyloinnin onnistumiseen. Lisäksi monet mikro-organismit tuottavat lukuisia peptidaaseja, joiden vaikutus kohdistuu peptidiosan eri kohtiin. Tämä johtaa usein vaikeasti käsiteltäviin tuoteseoksiin.

5 Entsyymien, jota käytetään α -aminoryhmän deasyloimiseksi rasvahapon sivuketjun tryptofaanista, muodostaa heimoon Actinoplanaceae kuuluva mikro-organismi, mieluiten mikro-organismi *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 tai sen variantti. Deasylointi suoritetaan lisäämällä mikro-
10 organismin viljelmään antibiootti, joka kuuluu ryhmään A-21978C-kompleksi. A-21978C tekijät C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 ja C_5 , estetty A-21978C-kompleksi ja estetyt A-21978C tekijät C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 ja C_5 . Sanonnat "estetyt A-21978C-tekijät" ja "estetty A-21978C-kompleksi" tarkoittavat yksittäisiä A-21978C-tekijöitä tai tekijöiden
15 seoksia (kompleksia), joissa aminosuojaryhmä sijaitsee yksittäisen tekijän tai tekijöiden seoksen ornitiinin δ -aminoryhmässä. Substraattia sisältävää viljelmää inkuboidaan deasyloinnin olennaiseen päättymiseen saakka. Näin
20 saatu vastaava A-21978C syklinen peptidi erotetaan fermentointiliemestä tekniikan tasolla tunnetuin menetelmin.

Näissä entsyymaattisissa deasyloinneissa saadaan syklisiä peptidejä, jotka ovat kaavaa 3



jossa R' ja R^O ovat toisistaan riippumatta vety tai amino-suojaryhmä, sekä niiden suoloja.

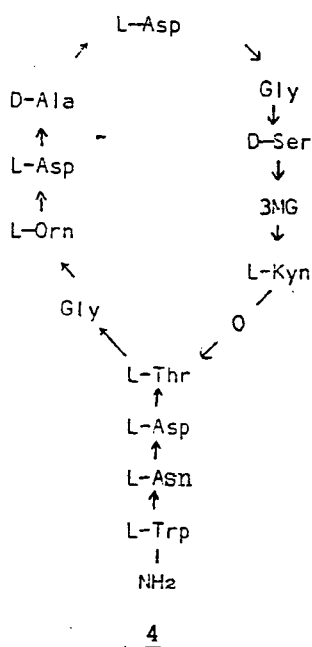
Poistamalla asyyliosia A-12978C-kompleksista tai A-12978C yksittäisistä tekijöistä C_0 , C_1 , C_3 , C_4 ja C_5 saadaan kaavan 3 yhdiste, jossa R^O ja R' ovat kumpikin vety. Deasyloitu molekyyli on syklinen peptidi, joka on yhteinen antibioottien kaikissa A-21978C-tekijöissä. Yksinretkaisuuden vuoksi tätä yhdistettä kutsutaan A-21978C-ytimeksi. Tämä yhdiste on myös esitettävissä kaavan 4 avulla.

10

15

20

25



jossa 3MG on L-treo-3-metyyliglutamiinihappo.

30

Kaavan 3 yhdisteet, joissa R^O tai R' on muu kuin vety, voidaan valmistaa deasyloimalla asianmukaisesti estetyt antibioottiset A-21978C tekijät C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , ja C_4 ja C_5 . Yksinkertaisuuden vuoksi näitä yhdisteitä kutsutaan tässä estetyiksi A-21978C-ytimiksi. Nämä estetyt yhdisteet ovat käyttökelpoisia välituotteita

35

määrättyjen kaavan 1 peptidien saamiseksi, so. yhdisteiden, joissa R^1 on aminosuojaryhmä.

Kuten ammattimies havaitsee A-12978C-ydin ja es-tetyt A21978C-ytimet voidaan saada joko vapaiden amiinien tai happoadditiosuolojen muodossa. Joskin voidaan käyt-tää mitä tahansa sopivaa happoadditiosuolaa, suositelta-via ovat farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat. "Farma-seuttisesti hyväksyttävät" suolat ovat suoloja, joita voidaan käyttää tasalämpöisten eläinten kemoterapiassa.

Menetelmä kaavan 3 A-21978C-ytimen valmistamiseksi erilaisten mikro-organismien avulla on perusteelli-sesti kuvattu samanaikaisesti jätetyssä patenttihakemuksessamme 83 17 48. Suositeltava deasylointientsyymi A. utahensis NRRL 12052 on julkisesti saatavissa Agri-cultural Research Culture Collection'ista (NRRL), Northern Regional Research Center, U.S: Department of Agriculture, 1815 North University St., Peoria, Illinois USA saantinumeroilla NRRL 12052. Tämän hakemusjulkaisun valmistuksessa 1 kuvataan A-21978C-ytimen valmistusta fermentoimalla, jolloin substraattina on A-21978C-kompleksi ja mikro-organismina Actinoplanes utahensis NRRL 12052.

Muut kaavan 3 A-21978C-ytimien valmistuksessa käyttökelpoiset Actinoplanaceae-viljelmät ovat julkisesti saatavissa Northern Regional Research Laboratorysta seuraavilla saantinumeroilla:

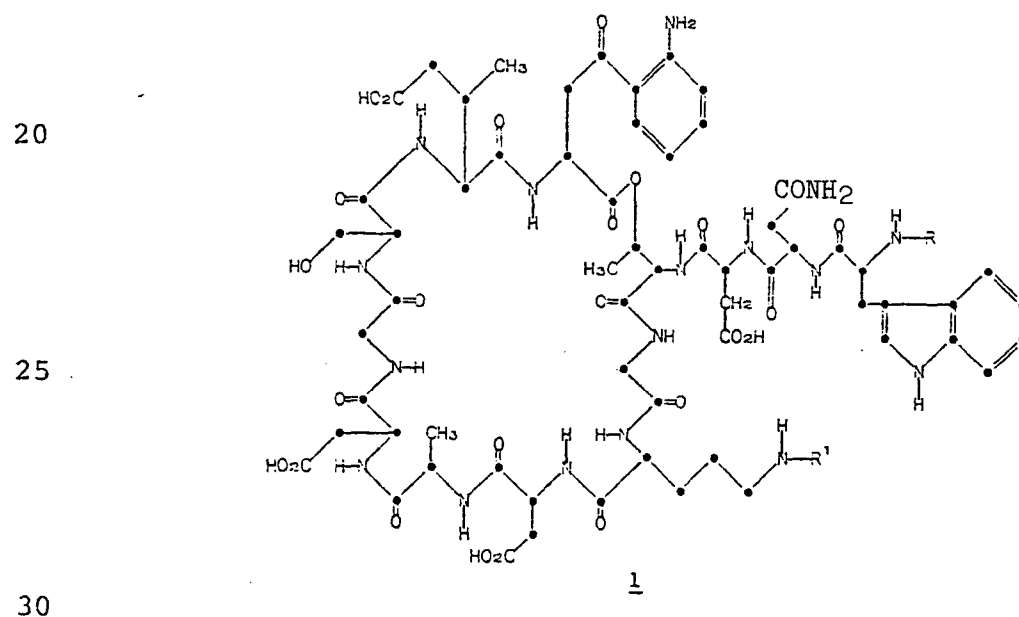
Actinoplanes missouriensis	NRRL 12053
Actinoplanes sp.	NRRL 8122
Actionoplanes sp.	NRRL 12065

Streptosporangium soseum	
var. hollandensis	NRRL 12064

Actinoplanaceae-heimon jokaisen mikro-organismin kannan desylointikyky on määritettävissä seuraavan menetelmän avulla. Sopiva elatusalusta inokuloidaan mikro-organismilla. Viljelmää inkuboidaan n. 28°C :ssa kaksi tai

kolme vuorokautta pyörivässä ravistelulaitteessa. Sitten viljelmään lisätään jotakin substraattianti-bioottia ja fermentointialustan pH pidetään arvossa n. 6,5. Viljelmässä syntyvää aktiivisuutta tarkkailaan *Micrococcus luteus*-määrittelyksen avulla. Anti-
 5 bioottiaktiivisuuden väheneminen osoittaa, että mikro-organismi muodostaa tarvittavaa deasylointi-entyyymiä. Tämä on kuitenkin varmistettava jonkun seuraavista menetelmistä avulla: 1) HPLC-analyysi koskemattoman ytimen toteamiseksi tai 2) uudelleen-
 10 asylointi asianmukaisella sivuketjulla (esim. lauroyyli, n-dekanoyyli tai n-dodekanoyyli) aktiivisuuden palauttamiseksi.

Käsiteltävänä oleva keksintö koskee uusia yhdisteitä, jotka saadaan asyloimalla A-12978C-ydin
 15 (kaavan 3 yhdiste) yhdisteiksi, joiden kemiallinen rakenne on kaavan 1 mukainen



jossa R on kaavaa



oleva substituoitu bentsoyyliryhmä; R^2 on C_8-C_{15} -alkyyli; X on vety, kloori, bromi, jodi, nitro, C_1-C_3 -alkyyli, hydroksi, C_1-C_3 -alkoksi tai C_1-C_3 -alkyyli- ja R^1 on vety tai aminosuojaryhmä, tai niiden suoloiksi.

5 Kuten ammattimies havaitsee substituoidussa bentsoyyliryhmässä, $\overset{O}{-C-}$ -funktio ja $-OR^2$ -funktio voivat bentseenirenkaassa olla toistensa suhteen orto-, meta- tai para-asemassa. Näiden ryhmien para-asema on suositeltava. Substituentti X voi olla missä tahansa bentseenirenkaan
10 kohdassa, joka jää vapaaksi näiltä kahdelta ryhmältä.

Tässä käytettynä sanonta "alkyyli" tarkoittaa sekä suoria että haarautuneita hiilivetyketjuja.

Sanonta "aminosuojaryhmä" tarkoittaa tunnettua aminosuojaryhmää, joka sopii yhteen A-12978C-molekyylin mui-
15 den funktioryhmien kanssa. Aminosuojaryhmät ovat mieluiten sellaisia, jotka ovat helposti poistettavissa myöhemmässä vaiheessa asyloidusta yhdisteestä. Esimerkkejä sopivista suojaryhmistä löytyy teoksesta Theodora W. Greene, "protective Groups in Organic Synthesis". John Wiley and
20 Sóns, New York, 1981, luku 7. Erityisen suositeltavia aminosuojaryhmiä ovat tert.-butoksikarbonyyli- ja bent-syylioksikarbonyyliryhmät.

Tässä keksinnössä suositeltavia radikaaleja R^2 ovat havainnollistavat C_8-C_{15} -alkyyli- ja radikaalit

25 a) $-(CH_2)_nCH_3$, jossa n on kokonaisluku 7 - 14, ja

b) $-(CH_2)_r\overset{CH_3}{\underset{|}{CH}}(CH_2)_sCH_3$, jossa r ja s ovat toisistaan riippumatta kokonaisluku 0 - 12 sillä edellytyksellä, että
r+s ei voi olla suurempi kuin 12 eikä pienempi kuin 5.

30 Kaavan 1 yhdisteet pystyvät muodostamaan suoloja, jotka myös muodostavat osan tästä keksinnöstä. Tällaisia suoloja voidaan esim. käyttää yhdisteiden eristämiseksi ja puhdistamiseksi. Erityisen käyttökelpoisia ovat farma-
35 seuttisesti hyväksyttävät alkalimetalli-, maa-alkalime-

talli-, amiini- ja happoadditiosuolat.

Kaavan 1 yhdisteissä on esim. neljä vapaata karboksyyliiryhmää, jotka pystyvät muodostamaan suoloja. Siten näiden karboksyyliiryhmien osa-, seka- ja täys-
 5 suolat muodostavat osan tästä keksinnöstä. Näiden suolojen valmistuksessa on vältettävä pH-arvoja yli 10, joissa yhdisteet ovat pysymättömiä.

Kaavan 1 yhdisteiden edustavia ja sopivia alkali-
 metalli- ja maa-alkalimetallisuoloja ovat natruum-
 10 kalium-, litium-, cesium-, rubidium-, barium-, kalsium- ja magnesiumsuolat. Kaavan 1 yhdisteiden sopivia amiini-suoloja ovat ammonium- ja primaariset, sekundaariset ja tertiaariset C_1 - C_4 -alkyyliammonium- ja hydroksi- C_2 - C_4 -alkyyliammoniusuolat. Havainnollistavia amiinisuoloja
 15 ovat sellaiset, jotka muodostuvat kaavan 1 yhdisteen reagoidessa ammoniumhydroksidin, metyyliamiinin, sek.-butyyliamiinin, isopropyliamiinin, dietyyliamiini, di-isopropyliamiinin, sykloheksyyliamiinin, etanoliamiinin, trietyyliamiinin tai 3-amino-1-propanolin kanssa.

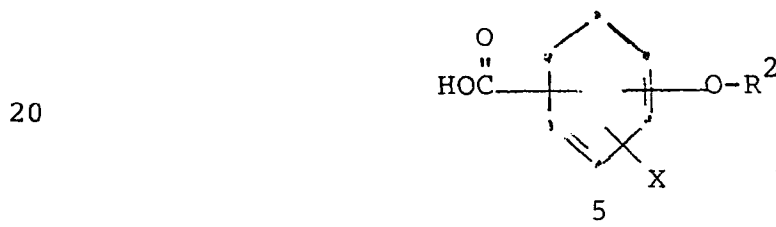
20 Kaavan 1 yhdisteiden alkalimetalli- ja maa-alkalimetallikationisuolat valmistetaan tavanomaisten kationisuolojen valmistusmenetelmien avulla. Esim. kaavan 1 yhdisteen vapaa happomuoto liuotetaan sopivaan liuottimeen kuten lämpimään metanoliin tai etanoliin ja sitten lisätään liuos, joka sisältää stoikiometrisen määrän haluttua
 25 epäorgaanista emästä vesipitoisessa metanolissa. Näin muodostunut suola voidaan eristää rutiinimenetelmien esim. suodattamalla tai haihduttamalla liuotin.

Orgaanisten amiinien kanssa muodostuvat suolat voidaan valmistaa samalla tavoin. Voidaan esim. lisätä kaasu- tai nesteen muodossa oleva amiini kaavan 1 yhdisteen liuokseen sopivassa liuottimessa kuten metanolissa. Liuotin ja amiinin ylimäärä voidaan poistaa haihduttamalla.
 30

35 Tämän keksinnön yhdisteissä on myös vapaita amino-

ryhmiä ja siten ne voivat muodostaa happoadditiosuoloja, jotka myös muodostavat osan tästä keksinnöstä. Kaavan 1 yhdisteiden edustavia ja sopivia happoadditiosuoloja ovat suolat, jotka muodostavat vakioreaktioiden avulla sekä orgaanisten että epäorgaanisten happojen kuten kloorivety-,
 5 rikki-, fosfori-, etikka-, meripihka-, sitruuna-, maito-, maleiini-, fumaari-, palmitiini-, kooli-, pamoini-, lima-, D-glutamiini-, d-kamferi-, glutaari-, glykoli-, ftaali-, viini-, lauriini-, steariini-, salisyyl-, metaanisulfony-, bentseenisulfony-, sorbiini-, pikriini-,
 10 bentsoe- tai kanelihapon kanssa.

Kaavan 1 yhdisteet valmistetaan asyloimalla kaavan 3 yhdiste menetelmin, joita tavallisesti käytetään amidisidoksen muodostamiseksi. Yleensä asylointi suoritetaan antamalla valitun yhdisteen reagoida substituoidun bentsoehapon aktivoitun johdannaisen (kaava 5) kanssa, joka vastaa
 15 haluttua asyyliiryhmää (R)



25 (X ja R^2 merkitsevät kuten yllä).

Kaavan 5 havainnollistavia yhdisteitä ovat:
 p-(n-oktyylioksi)-bentsoehappo, p-(n-dekyylioksi)
 bentsoehappo, p-(n-dodekyylioksi)-bentsoehappo,
 p-(n-pentadekyylioksi)bentsoehappo, m-kloori-p-
 30 (n-dodekyylioksi)bentsoehappo, p-kloori-m-(n-dekyylioksi)bentsoehappo, m-(n-dodekyylioksi)-p-metyyli-
 bentsoehappo, m-metoksi-p-(n-oktyylioksi)bentsoehappo
 ja m-hydroksi-p-(n-pentyylioksi)-bentsoehappo.

35 Sanonta "aktivoitu johdannainen" tarkoittaa johdan-

naista, joka tekee asylointiaineen karboksyylifunktion reaktiokykyiseksi kytkeytymään primaarisen aminoryhmän kanssa amidisidokseksi, joka yhdistää sivuketjun ytimeen. Ammattimies tuntee sopivia aktivoituja johdannaisia, niiden valmistusmenetelmiä ja niiden käytön

5 primaarisen amiinin asylointiaineina. Suositeltavia aktivoituja johdannaisia ovat

a) happohalogenidi (esim. happokloridi), b) happoanhydridi (esim. alkoksimuuraishaishappoanhydridi tai aryylioksimuuraishaishappoanhydridi) tai c) aktivoitu

10 esteri (esim. 2,4,5-trikloorifenyyliesteri, N-hydroksibentstriatsoliesteri tai N-hydroksisuksiini-imidiesteri). Muita menetelmiä karboksyylifunktion aktivoimiseksi on karboksyylihapon ja karbonyyli-imidin (esim. N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidin tai N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidin)

15 din) reaktio reaktiokykyiseksi välituotteeksi, jota pysymättömyytensä vuoksi ei eristetä. Tällainen reaktio primaarisen amiinin kanssa suoritetaan in situ.

Amattimies havaitsee, että kaavan 1 yhdisteet valmistetaan käyttäen selektiivisiä asylointimenetelmiä

20 ja aminosuojaryhmien avulla. Kun lähtöaineena on kaavan 3 yhdiste, jossa R' ja R^O ovat vety, asyloituminen voi tapahtua sekä tryptofaanin α -aminoryhmässä että oriniitiinin δ -aminoryhmässä ja saadaan N_{Trp}, N_{Orn}-diasyyli johdannaisia. Johdannaisten saamiseksi, joiden tryptofaanin α -aminoryhmä on monoasyloitu, on siis suositeltavaa asyloida kaavan 3 yhdiste, jossa ornitiinin δ -aminoryhmä (R^O-asemassa) on estetty aminosuojaryhmällä. Tällaiset lähtöaineet saadaan mieluiten estämällä

25 A-21978C-tekijä tässä asemassa ennen deasylointia. A-21978C-ytimen kolmesta vapaasta aminoryhmästä kynureniinin aromaattinen aminoryhmä (R'-asema kaavassa 3) on vähiten reaktiokykyinen. Niinpä asylointi kaavan 1 R-asemassa ei tavallisesti edellytä kynureniinin aminoryhmän estämistä.

Kaavan 1 yhdisteiden valmistusmenetelmät ilmenevät

35 pääpiirteittäin kaaviosta I. Tässä kaaviossa käytetään

seuraavia symboleja:

$\sqrt{x}$ = A-21978C:n tähde

N_T = tryptofaanin α -aminoryhmä

N_O = ornitiinin δ -aminoryhmä

5 N_K = kynureniinin aromaattinen aminoryhmä

R = kaavan 1 määritellyt substituentit

R_N = luonnontekijän asyyli-ryhmä

B = aminosuojaryhmä

Asyyli = asylointivaihe

10 Deasyyli = deasylointivaihe

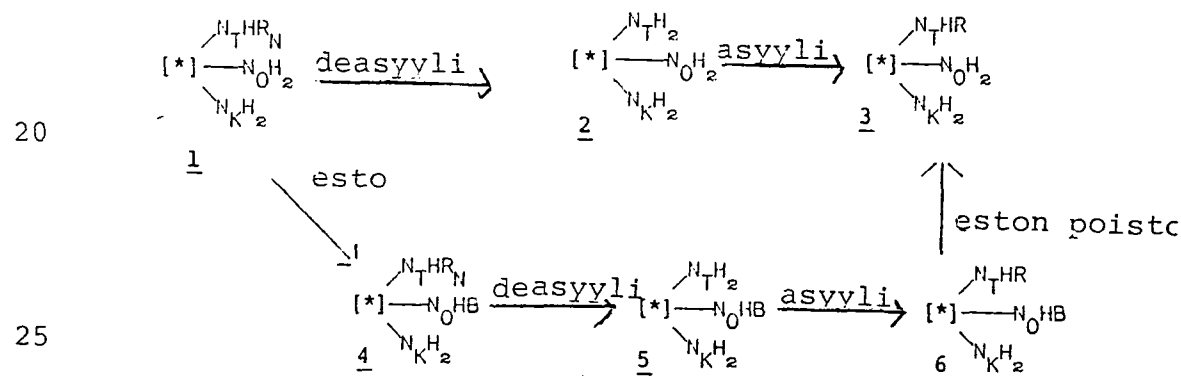
Esto = asylointi aminosuojaryhmällä

Eston poisto = aminosuojaryhmän poisto

Kaavoissa I A-12978C:n N_{Trp} -monoasyylijohdannaiset ovat yleistä kaavaa 3.

15

Kaavio I: N_{Trp} -monoasyyli-A21978C-johdannaisten valmistus



Aktiiviesterimenetelmä on suositeltava menetelmä kaavan 1 yhdisteiden valmistamiseksi. Suositeltavinta on 30 käyttää asylointiaineena halutun sivuketjuhapon (kaava 5) 2,4,5-trikloorifenylyliesteriä. Tässä menetelmässä annetaan aktiiviesterin ylimäärän reagoida ytimen kanssa huoneen- 35 lämpötilassa inertissä orgaanisessa liuottimessa kuten DMF:ssä, THF:ssä, dietyylieetterissä tai dikloorimetäänissa. Reaktioaika ei ole kriittinen, mutta aika n. 24 - n. 120 tuntia on suositeltava. Reaktion päättyessä liuotin

poistetaan ja jäännös puhdistetaan kromatografian, esim. käänteisfaasi-HPLC:n avulla, jossa stationaarisena faasina käytetään silikageeli- C_{18} -käänteisfaasihartsia ja liuotinsysteeminä seosta $H_2O-CH_3OH-CH_3CN$.

2,4,5-trikloorifenyyliesterit valmistetaan käsittelemällä sivuketjuhappoa (kaava 5) 2,4,5-trikloorifenolilla kytkemisaineen kuten N,N'-disykloheksyylikarbodiimidin läsnäollessa. Muut menetelmät aktiiviesterien valmistamiseksi ovat ammattimiehelle ilmeisiä.

Kaavan 5 substituoidut hapot ja niiden aktivoidut johdannaiset ovat joko tunnettuja yhdisteitä tai ne voidaan valmistaa tunnetuista yhdisteistä entuudestaan tunnettujen menetelmien avulla. Alkoksibentsoehapot voidaan valmistaa mukavasti asianmukaisesta hydroksibentsoehaposta antamalla asianmukaisen alkyylihalogenidin reagoida asianmukaisen hydroksibentsoehapon dinatriumsuolan kanssa. Kuvatuissa menetelmissä lähtöaineina käytetyt hydroksibentsoehapot ja niiden substituoidut johdannaiset ovat joko tunnettuja yhdisteitä tai ne voidaan valmistaa tavanomaisin menetelmin.

Käytettäessä tämän keksinnön A-12978C syklistä peptidiä bakteerilääkkeinä se voidaan antaa joko suun kautta tai parenteraalisesti. Kuten ammattimies havaitsee A-12978C-yhdistettä annetaan tavallisesti farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimentimen kera.

Yhdisteitä voidaan antaa ruiskuttamalla laskimoon tai lihakseen steriilin vesiliuoksen tai -suspension muodossa, johon haluttaessa voidaan lisätä erilaisia tavallisia farmaseuttisesti hyväksyttäviä säilöntä-, puskuroimis-, liuotus- tai suspendoimisaineita. Voidaan lisätä muita lisäaineita kuten ruokasuolaa tai glukoosia liuosten tekemiseksi isotonisiksi. Tällaisten lisäaineiden määrät ja luonne ovat ilmeisiä ammattimiehelle.

Suun kautta yhdisteitä voidaan antaa farmaseuttisesti hyväksyttävien kantajien tai lisäaineiden kera kapselien, tablettien tai jauheiden muodossa. Tällaisten kantajien tai lisäaineiden määrät ja luonne ovat ilmeisiä ammattimiehelle.

A-21978C-yhdisteen annostus riippuu erilaisista sekoista kuten käytettävästä yhdisteestä ja hoidettavan infektion luonteesta ja vakavuudesta. Ammattimies havaitsee, että asianmukaisen annostuksen tai anto-

- 5 yksikköjen perustana voidaan käyttää MIC- ja ED₅₀-arvoja, saatavissa olevia myrkyllisyysarvoja sekä farmakokineettisiä tietoja ja potilaaseen tai isäntäeläimeen ja infektoivaan mikro-organismiin liittyviä tietoja.

- 10 Seuraavat ei-rajoittavat esimerkit antavat tarkemman kuvan keksinnöstä.

Valmistus 1

A-21978C-ytimen valmistus

A. Actinoplanes utahensiksen fermentointi

- 15 Valmistettiin ja kasvatettiin Actinoplanes utahensiksen perusviljelmä agarivinoalustalla. Vinoalustan valmistuksessa käytettiin jotakin seuraavista elatusaineista:

Elatusaine A

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
20	esikypsytettyjä kaurajauhoja	60,0 g
	hiivaa	2,5 g
	K ₂ HPO ₄	1,0 g
	Czapekin kivennäisperusliuosta ^x	5,0 ml
25	agaria	25,0 g
	deionisoitua vettä	q.s. 1 litraksi
	Ennen autoklavointia pH on n. 5.9. pH säädetään arvoon 7,2 NaOH:lla, autoklavoinnin jälkeen pH on n. 6,7.	
	^x Czapekin kivennäisperusliuoksen koostumus on seuraava:	
30	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
	FeSO ₄ · 7H ₂ O (liuotettuna)	
	2 ml:aan väkevää HCl:ää)	2 g
	KCl	100 g
35	MgSO ₄ · 7H ₂ O	100 g
	deionisoitua vettä	q.s. 1 litraksi

Elatusaine B

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
perunadekstriiniä	5,0 g
hiivauutetta	0,5 g
5 kaseiinin entsymaattista hydrolysaattia ^x	3,0 g
häränlihauutetta	0,5 g
glukoosia	12,5 g
maissitärkkelystä	5,0 g
lihapeptonia	5,0 g
10 raakamelassia	2,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
CaCO ₃	1,0 g
Czapeksin kivennäisperusliuosta	2,0 ml
15 agaria	20,0 g
deionisoitua vettä	q.s. 1 litraksi

x NpZ-Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, NJ.

Vinoalusta inokuloitiin Actinoplanes utahensis NRRL 12052:lla ja inokuloitua vinoalustaa inkuboitiin 20 30°C:ssa n. 8-10 crk. Noin puolelle vinoalustakasvustoista inokuloitiin 50 ml kasvuelatusainetta, jonka koostumus oli:

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä</u>
25 esikypsytettyjä kaurajauhoja	20,0 g
sakkaroosia	20,0 g
hiivaa	2,5 g
Distiller's Dried Grain'ia ^x	5,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapekin kivennäisperusliuosta	5,0 ml
30 deionisoitua vettä	q.s. 1 litraksi

pH säädetään arvoon 7,4 NaOH:lla, autoklavoinnin jälkeen pH on n. 6,8.

^x National Distillers Products Co., 99 Park Ave., New York, 35 NY.

Inokuloitu kasvulatusaine inkuboitiin 250 ml laajasuisessa erlenmeyerkolvissa 30°C:ssa n. 72 tuntia pyörivässä rasvaistelulaitteessa, jonka kaaren halkaisija oli 5,2 cm, 250 kierr/min.

Tätä inkuboitua kasvuelatusainetta voidaan suoraan käyttää toisen vaiheen kasvuelatusaineen inokuloimiseksi, Vaihtoehtoisesti ja mieluummin se varastoidaan myöhempää käyttöä varten nestetypen höyryfaasissa. Viljelmä valmistetaan tällaista varastointia varten useihin pieniin pulloihin seuraavasti: Jokaiseen pulloon lisättiin 2 ml inkuboitua kasvuelatusainetta 2 ja ml glyseroli-laktoosiliuosta (yksityiskohdat löytyvät artikkelista W.A. Dailey ja C.E. Higgins, "Preservation and Storage of Microorganisms in the Gas Phase of Liquid Nitrogen", Gryobil, 10, 364-367 (1973)). Preparoidut suspensiot varastoidaan nestetypen höyryfaasissa.

Inokuloitiin 1 ml:lla näin valmistettua varastoitua suspensiota 50 ml ensimmäisen vaiheen kasvuelatusainetta (koostumus yllä). Inkuloitu ensimmäisen vaiheen kasvuelatusaine inkuboitiin kuten yllä on kuvattu.

Suuremman inokulaattitilavuuden saamiseksi inokuloitiin 10 ml:lla inkuboitua ensimmäisen vaiheen kasvuelatusainetta 400 ml toisen vaiheen kasvuelatusainetta, jonka koostumus oli sama kuin ensimmäisen vaiheen kasvuelatusaineella. Toisen vaiheen kasvuelatusaine inkuboitiin kahden litran laajasuisessa erlenmeyerkolvissa 30°C:ssa n. 48 tuntia pyörivässä rasvaistelulaitteessa, jonka kaaren halkaisija 10 5,2 cm, 250 kierr/min.

Inkuloitiin 80 ml:lla yllä kuvatulla tavalla valmistettua inkuboitua toisen vaiheen kasvuelatusainetta 10 litraa steriiliä tuotantoelatusainetta, jona käytettiin joitakin seuraavista:

Elatusaine I

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (g/l)</u>
35 maapähkinäjauhoa	10,0

	liukenevaa lihapeptonia	5,0
	sakkaroosia	20,0
	KH_2PO_4	0,5
	K_2HPO_4	1,2
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
5	vesijohtovettä	q.s. 1 litraksi

Autoklavoimalla steriloinnin jälkeen 45 minuuttia
 121°C n. 1,1-1,3 kg/cm^2 pH on n. 6.9.

Elatusaine II

10	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (g/l)</u>
	sakkaroosia	30,0
	peptonia	5,0
	K_2HPO_4	1,0
	KCl	0,5
15	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002
	deionisoitua vettä	q.s. 1 litraksi
	pH säädetään arvoon 7,0 HCl:llä, autoklavoinnin jälkeen	
20	ph on n. 7,0.	

Elatusaine III

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (g/l)</u>
	glukoosia	20,0
	NH_4Cl	3,0
25	Na_2SO_4	2,0
	ZnCl_2	0,019
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,304
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,062
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,035
30	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,005
	CaCO_3	6,0
	KH_2PO_4^x	0,67
	vesijohtovettä	q.s. 1 litraksi
	^x Steriloitu erikseen ja lisätty aspetisesti. Lopullinen	
35	pH n. 6.6.	

Inokuloitua tuotantoelatusainetta fermentoitiin 14 litran fermentointiastiassa n. 30°C:ssa n. 66 tuntia. Fermentointielatusainetta sekoitettiin tavanomaisilla sekoittimilla n. 600 kierr/min ja ilmastettiin steriilillä
 5 ilmalla. Tällä tavoin ylläpidettiin liuenneen hapen pitoisuus joka ylitti n. 30 %:lla ilmakyllästyksen normaali-paineessa.

B. A-21978C:n deasylointi

A. utahensista fermentoitiin osassa A kuvatulla
 10 tavalla käyttäen vinoalustaa A ja tuotantoelatusainetta I ja inkuboiden tuotantoelatusainetta n. 67 tuntia. Fermentointielatusaineeseen lisättiin 100 g epäpuhdasta A-21978C-kompleksia, joka oli valmistettu US-patentissa 4 208 403 kuvatulla tavalla.

15 A-21978C-kompleksin desylointia tarkkailtiin määrittämällä Micrococcus luteuksen suhteen. Fermentoinnin annettiin jatkua deasyloinnin päättymiseen saakka. Päättymisen merkkinä oli aktiivisuuden loppuminen M. luteuksen suhteen n. 24 tunnin kuluttua.

20 C. A-21978C-ytimen eristäminen

Osassa B kuvatulla tavalla saatu koko fermentointiliemi (20 litraa) suodatettiin suodatusapuaaineen kera (Hyflo Super-Cel, Johns Manville Corp.). Myseelikakku
 heitettiin pois. Näin saatu suodos valutettiin pylvään läpi,
 25 jossa oli 1,5 litraa HP-20 hartsia (DIAION High Porous Polymer, HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokio, Japani). Näin saatu effluentti heitettiin pois. Sitten pylvästä pestiin 10 litralla deionisoitua vettä suodatetun liemen tähteiden poistamiseksi. Tämä pesuvesi
 30 tettiin pois. Sitten pylväs eluoitiin veden ja asetoni-triilin seoksilla (95:5, 9:1 ja 4:1, kutakin 10 litraa) ja otettiin talteen 1 litran fraktioita.

Eluointia tarkkailtiin paperikromatografisesti. Liuotinsysteeminä käytettiin n-bitanolin, pyridiinin,
 35 etikkahapon ja veden seosta (15:10:3:12) ja yhdisteet

tunnistettiin UV-fluorens sillä. Tässä systeemissä A-21978C-tekijöiden R_f -arvo oli n.0,56 ja A-21978C-ytimen R_f -arvo n. 0,32. Tuote voidaan myös todentaa analyyttisen HPLC:n avulla käyttäen silikageeli/ C_{18} :a ja liuotinsysteemiä vesi-metanoli (3:1), jossa on 0,1 % ammoniumasettaattia. Ydin tunnistetaan UV-tarkkaimella kohdassa 254 nm:

Ydintä sisältävät fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin vakuuissa asetonitriilin poistamiseksi, kylmäkuivattiin ja saatiin 40,6 g puolipuhdasta A-21978C-ydintä.

10 D.A-21978C-ytimen puhdistus

Liuotettiin 15 g puolipuhdasta, osassa C kuvatulla tavalla saatua A-21978C-ydintä 75 ml"aan veden, metanolin ja asetonitriilin seosta (82,10:8), jossa oli 0,2 % etikkahappoa ja 0,8 % pyridiiniä. Tämä liuos pumpattiin 4,7 x 15 192 cm pylvääseen, jossa oli 3,33 litraa silikageeli/ C_{18} :a (Quantum LP-1, Quantum Industries, 341 Kaplan Drive, Fairfield, N.J. 07006). Pylväs kehitettiin samalla liuotinsysteemillä. Otettiin talteen fraktioita, joiden tilavuus oli 350 ml. Erottumista tarkkailtiin UV-tarkkaimella 20 kohdassa 280 m. Ydintä sisältävät fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin vakuuissa liuottimien poistamiseksi, kylmäkuivattiin ja saatiin 5,2 g puhdistettua A-21978C-ydintä.

E.A-21978C-ytimen tunnusarvot

25 A-21978C-ytimen tunnusarvot olivat:

a) Muoto: valkoinen, amorfki kiintoaine, joka fluoresoi lyhytaaltoisen UV-valon alla.

b) Empiirinen kaava: $C_{62}H_{83}N_{17}O_{25}$

c) Molekyyllipaino: 1465

30 d) Liukoisuus: liukenee veteen

e) IR-absorptiospektrin (KBr) absorptiomaksimit kohdissa 3300-(leveä), 3042 (heikko), 2909 (heikko), 1655 (voimakas), 1530 (voimakas), 1451 (heikko), 1399 (keskinkertainen), 1222 (keskinkertainen), 1165 (heikko), 1063 35 (heikko) ja 758 (keskinkertainen-heikko) cm^{-1} .

f) UV-absorptiospektrin (metanoli) maksimit kohdassa 223 nm

($\xi = 41\ 482$) ja $260\ \text{nm} = (\xi = 8678)$.

g) Elektrometrinen titraus 66 %:ssa dimetyyliformamidivesiliuoksessa osoitti neljä titrautuvaa ryhmää, joiden pK_a -arvot olivat n. 5,2, 6,7, 8,5 ja 11,1 (alku-pH 6,12).

Valmistus 2

5 A-21978C-ytimen vaihtoehtoinen valmistus

A-21978C-ydin valmistettiin valmituksen 1 menetelmän mukaan, jonka osassa B tehtiin eräitä muutoksia. A. utahensis-viljelmää inkuboitiin aluksi n. 48 tuntia, substraattina oli 50 g puolipuhdasta A-21978C-kompleksia ja substraatin lisäämisen jälkeen inkuboitiin n. 16 tuntia. Liemestä saatu suodos valutettiin pylvään läpi, jossa oli 3,1 litraa HP-20 hartsia. Pylvästä pestiin 10 tilavuudella vettä ja sitten se eluoitiin veden ja asetonitriilin seoksella (95:5). Eluoitumista tarkkailtiin kuten valmistuksessa 1. Kun oli otettu talteen 24 litraa eluointiliuokseksi vaihdettiin veden ja asetonitriilin seos (9:1). Ydintä sisältävät fraktiot eluoitiin tällä liuottimella. Nämä fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin vakuuissa asetonitriilin poistamiseksi, kylmäkuivattiin ja saatiin 24,3 g puolipuhdasta A-21978C-ydintä.

20 Liuotettiin 24,3 g tätä puolipuhdasta A-21978C-ydintä 400 ml:aan vettä. Liuos pumpattiin $4,7 \times 192\ \text{cm}$ teräspylvääseen, jossa oli 3,33 litraa silikageeli (Quantum LP-1)/ C_{18} :a preparoituna veden, metanolin ja asetonitriilin seokseen (8:1:1), jossa oli 0,2 % etikkahappoa ja 0,8 % pyridiiniä. Pylväs kehitettiin samalla liuottimella paineessa n. $140\ \text{kg/cm}^2$ ja otettiin talteen 350 ml:an fraktioita. Eluoitumista tarkkailtiin UV:lla kohdassa 280 nm. Ydintä sisältävät fraktiot yhdistettiin, konsentroitiin vakuuissa liuottimien poistamiseksi, kylmäkuivattiin ja saatiin 14 g erittäin puhdasta A-21978C-ydintä.

Valmistus 3

N_{Orn} -t-BOC-A-21978C-tekijöiden C_2 ja C_3 valmistus

35 10 g A-21978C-tekijöiden C_2 ja C_3 seosta, joka oli

valmistettu US-patentissa 4 208 403 kuvatulla tavalla, liuotettiin 50 ml:aan vettä ultraäänikäsittelyn avulla (200 mg/ml). Liuoksen pH säädettiin arvosta 4,05 arvoon 9,5 3,6 Ml:lla 5-n NaOH:ta. Lisättiin 3,0 ml di-tert.-butyylidikarbonaattia ja reaktioseosta sekoitettiin kaksi tuntia huoneenlämpötilassa. Reaktioseoksen pH pidettiin arvossa 9,5 lisäämällä käsin 5-n NaOH:ta (6,5 ml kahdessa tunnissa).

Reaktiota tarkkailtiin ajoittain TLC:n avulla käyttäen silikageeliä ja liuotinsysteemiä $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (7:3 ja 8:2). Tunnistaminen suoritettiin UV:lla.

Noin kymmenen minuutin kuluttua reaktioliuos sameni nopeasti ja emäksen kulutus kasvoi. Kolmenkymmenen minuutin kuluttua samenenemisnopeuden kasvu ja emäksen kulutusnopeus kääntyivät laskuun, mikä osoitti reaktion päättyneen. Reaktiota jatkettiin kuitenkin vielä 90 minuuttia täydellisen reaktion varmistamiseksi. Kaksituntisen reaktion päätyttyä reaktioaines kylmäkuivattiin välittömästi ja saatiin 12,7 g N_{Orn} -t-BOC-A-21978-tekijöitä C_2 ja C_3 .

Samojen menetelmien avulla suoritettiin kaksi reaktiota 10 g:lla ja yksi reaktio 30 g:lla. Kaikissa tapauksissa reaktioaika oli vain 40 minuuttia. Kahdessa 10 g:n kokeessa saatiin vastaavasti 11,9 g ja 12,1 g tuotetta. 30 g:n reaktiossa saatiin 35,4 g tuotetta.

25 Valmistus 4

A-21978C- N_{Orn} -t-BOC-ytimen valmistus

A.A. utahensiksen fermentointi

A. utahensista fermentoitiin valmistukseen 1 osassa A kuvatulla tavalla käyttäen vinoalustaa A ja tuotantoelatusainetta I ja inkuboiden tuotantoelatusainetta n. 66 tuntia.

B. N_{Orn} -t-BOC-kompleksin deasylointi

A-21978- N_{Orn} -t-BOC-kompleksi (1185 g epäpuhdasta substraattia, joka sisälsi n. 176 g A-21978C-kompleksia) lisättiin fermentointielatusaineeseen. Deasylointi suori-

tettiin valmistuksen 1 osassa B kuvatulla tavalla.

HPLC:n mukaan deasylointi päättyi n. 24 tunnissa.

C. A-21978C-N_{Orn}-t-BOC-ytimen eristäminen

100 litraa osassa B saatua fermentointiliientä

- 5 suodatettiin suodatusapuaaineen avulla (Hyflo Super-cel).
 Suodos valutettiin pylvään läpi, jossa oli 7,5 litraa
 HP-20 hartsia (DIAION) ja pylvästä pestiin 38 litralla
 vettä. Eluotumista tarkkailtiin silikageeli/C₁₈-
 HPCL:llä ja tunnistaminen tapahtui UV:lla kohdassa 254 nm.
 10 Pesuveteen eluotui hieman ydintä. Sitten ydin eluoi-
 tiin veden ja asetonitriilin sekoksilla seuraavasti:
 (95:5) - 40 litraa, (9:1) - 40 litraa ja (85:15) -
 100 litraa. Ydintä sisältävät fraktiot yhdistettiin,
 konsentroitiin vakuuissa liuottimen poistamiseksi,
 15 kylmäkuivattiin ja saatiin 298,5 g puolipuhdasta
 A-21978C-N_{Orn}-t-BOC-ydintä.

D.A-21978C-N_{Orn}-t-BOC-ytimen puhdistus

30 g puolipuhdasta osassa C kuvatulla tavalla

- saatua A-21978C-N_{Orn}-t-BOC-ydintä liuotettiin 75 ml:aan
 20 veden ja asetonitriilin seosta (9:1), jossa oli 0,2 %
 etikkahappoa ja 0,8 % pyridiiniä. Tämä liuos valutettiin
 4,7 x 192 cm teräspylvään läpi, jossa oli 3,33 litraa
 silikageeli (Quantum LP-1)/C₁₈:a, ja tasapainotettiin
 samassa liuotinsysteemissä. Pylväs kehitettiin paineessa
 25 veden, asetonitriilin ja metanolin seoksella (80:15:5),
 jossa oli 0,2 % etikkahappoa ja 0,8 % pyridiiniä. Otettiin
 talteen 350 ml:n fraktioita ja tuote tunnistettiin UV:lla
 kohdassa 280 nm. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin,
 konsentroitiin vakuuissa liuottimien poistamiseksi,
 30 kylmäkuivattiin ja saatiin 18,4 g puhdasta A-21978C-N_{Orn}-
 t-BOC-ydintä.

A.21978C-N_{Orn}-t-BOC-ytimen tunnusarvot olivat:

- a) Muoto: valkoinen, amorfki kiintoaine, joka fluoresoi
 lyhytaaltoisen UV-valon alla.
 35 b) Empiirinen kaava: C₆₇H₉₁N₁₇O₂₇
 c) Molekyylipaino: 1565
 d) Liukoisuus: liukenee veteen
 e) IR-absorptiospektrin (KBr) absorptiomaksimit kohdissa
 3345 (leveä), 3065 (heikko), 2975 (heikko), 2936 (heikko),

- n. 1710 (olkapää), 1660 (voimakas), 1530 (voimakas), 1452 (heikko), 1395 (keskinkertainen), 1368 (heikko), 1341 (heikko), 1250 (keskinkertainen), 1228 (keskinkertainen), 1166 (keskinkertainen-heikko) ja 1063 (heikko) cm^{-1} . f) UV-absorptiospektrin (90 %:isessa etanolissa) maksimit kohdissa 220 nm ($\epsilon = 42\ 000$) ja 260 nm ($\epsilon = 10\ 600$). g) HPLC-retentioaika = 6 min 4,6 x 300 mm silikageeli /C₁₈-pylväessä, liuotin H₂O/CH₃CN/CH₃OH (80:15:5), jossa oli 0,2 % NH₄OAc virtausnopeudella 2 ml/min, UV-tunnistus.

Valmistus 5

- A-21978C-N_{Orn}-t-BOC-ytimen vaihtoehtoinen puhdistus
10,8 g puolipuhdasta valmistuksen 4 osassa C kuvattulla tavalla saatua A-21978C-N_{Orn}-t-BOC-ydintä liuotettiin veteen ja valutettiin pylvään läpi, jossa oli 80 ml Amberlite IRA-68 hartsia (Rohm & Haas, Philadelphia, PA, asetaattisykli). Pylvästä pestiin vedellä ja eluoitiin virtausnopeudella 5 ml/min peräkkäin 1080 ml:lla 0,05-n etikkahappoa, 840 ml:lla 0,1-n etikkahappoa ja 3120 ml:lla 0,2-n etikkahappoa ja otettiin talteen 120 ml:n fraktioita. Pylvästä tarkkailtiin analyttisen HPLC:n avulla käyttäen silikageeli/C₁₈:a ja systeemiä vesi-asetonitriili-metanoli (80:15:5), jossa oli 0,2 % ammoniumasetattia. Tuote tunnistettiin UV:lla kohdassa 254 nm. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin, liuoksen pH säädettiin arvoon 5,8 pyridiinillä ja muodostunut liuos konsentroitiin vakuuissa tilavuuteen n. 200 ml. Konsentraattiin lisättiin vettä ja muodostunut liuos konsentroitiin uudelleen pyridiinin poistamiseksi. Tämä konsentraatti kylmäkuivattiin ja saatiin 3,46 g puhdasta A-21978-N_{Orn}-t-BOC-ydintä.

Esimerkki 1

- N_{Trp}-p-(n-dodekyylioksi)bentsoyyli-N_{Orn}-t-BOC-A-12978C-ytimen valmistus
Liuosta, jossa oli 0,9 g 2,4,5-trikloorifenyyli-p-(n-dodekyylioksi)bentsoaattia ja 0,9 g A-21978C-t-BOC-ydintä 400 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia, sekoitettiin 120 tuntia huoneenlämpötilassa typpisuojaissa. Liuotin pois-

tettiin haihduttamalla vakuuissa. Jäännöstä ja seosta, jossa oli 400 ml dietyylieetteriä ja 400 ml kloroformia, sekoitettiin kaksi tuntia, Tuote eristettiin suodattamalla, kuivattiin ja saatiin 0,962 g vaalenaruskeata jauhetta, Osa tästä aineksesta (0,78 g) liuotettiin
 5 200 ml:aan metanolia ja puhdistettiin preparatiivisen HPLC:n avulla käyttäen "Prep LC/System 500"-yksikköä (Waters Associates, Inc., Milford MA) ja Prep Pak-500/C₁₈-pylvästä (Waters Associates) stationaarisena faasina. Pylvästä käytettiin isokriittisesti liuotinsysteeminä
 10 vesi-metanoli-asetonitriili (+:1:2). Otettiin talteen 250 ml:n fraktioita (1 fraktio/min). Haluttu yhdiste euluoitui fraktioissa 2-6.

Fraktiot yhdistettiin TLC:n perusteella (käänteis-faasi/C₁₈-silikageeli, kehitettiin veden, metanolin ja
 15 asetonitriilin seoksella (3:3:4) ja toteaminen suoritettiin van Urkin sumutuksella). Yhdistettyjen fraktioiden bio-autografia, jossa käytettiin silikageeli-TLC:tä, asetonitriilin, asetonin ja veden seosta (2:2:1) liuottimena ja Staphylococcus aureusta toteamisorganismina, ositti,
 20 että tuote muodostui yhdestä bioaktiivisesta komponentista. Tästä tuotteesta saatiin 0,421 g N_{Trp}-p-(n-dodekyylioksi)bentsoyyli-N_{Orn}-t-BOC-A-21978C-ydintä.

Esimerkki 2

N_{Trp}-p-(n-dodekyylioksi)bentsoyyli-A-21978C-ytimen valmistus
 25 Liuotettiin 230 mg N_{Trp}-p-(n-dodekyylioksi)bentsoyyli-N_{Orn}-t-BOC-A-21978C-ydintä 5 ml:aan trifluorietikkahappoa, jossa oli 2 % anisolia, ja sekoitettiin viisi minuuttia 0°C:ssa. Liuos konsentroitiin vakuuissa öljyksi ja öljyä hierrettiin 100 ml:ssa Et₂O:ta. Kiintoainne eristettiin,
 30 kuivattiin ilmassa ja otettiin 10 ml:aan vettä. Tämän liuoksen pH säädettiin arvosta 3,25 arvoon 7 lisäämällä pyridiiniä. Muodostunut liuos kylmäkuivattiin ja saatiin 179 mg valkosta amorfia N_{Trp}-p-(n-dodekyylioksi)bentsoyyli-A-21978C-ydintä. Silikageeli-TCL:ssä tämän yhdisteen R_f-arvo
 35 oli n. 0,78, jolloin liuotinsysteeminä oli asetonitriili-

asetoni-vesi (2:2:1) ja toteaminen suoritettiin van Urkin sumutuksella.

Esimerkki 3

5 Kaavan 1 yhdisteiden antibakteerinen teho voidaan osoittaa in vitro. Tulokset eräiden kaavan 1 edustavien
yhdisteiden antibakteeritestauksesta, jossa käytettiin
10 agarimalja-kiekko-diffuusioon perustuvia vakiomenetelmiä. ilmenevät taulukosta I. Taulukossa I aktiivisuus on ilmaistu testiyhdisteen aiheuttaman mikro-organismin kasvun estona, jonka mittana on estorenkään halkaisija millimetreinä.

Taulukko I

Kaavan 1 yhdisteiden antibakteeriteho agarimalja-kiekko-diffuusiotestissä

		Estorenkaan koko (mm) ^a				
R	Yhdiste	¹ R	Staphylococcus aureus ATCC 6738P	Bacillus subtilis ATCC 6633	Micrococcus luteus ATCC 9341	B. subtilis ATCC 6633 ^b
p-(n-dodekyylioksi)bentsoyyl	H		20	13	18	20
p-(n-dodekyylioksi)bentsoyyl	t-BOC		20	10	15	22

^aYhdisteet suspendoitiin veteen konsentraationa 1 mg/ml, 7 mm kiekko kastettiin suspensioon ja asetettiin agarin pinnalle, inkubointi 24-48 tuntia 25-37°C:ssa.

^bKasvu minimiravintoagarilla.

Tulokset kaavan 1 edustavan yhdisteen anti-bakteeritestauksesta, jossa käytettiin agarilaimennus-vakiomenetelmää, ilmenevät taulukosta II. Taulukossa II aktiivisuus on ilmaistu minimiestokonsentraationa (MIC), joka on yhdisteen pienin konsentraatio, joka
 5 pysyy esteämään mikro-organismin kasvun.

Taulukko II

N_{Trp}-p-(n-dodekyylioksi)bentsyyli-A-21978C:n antibioottiteho

10	<u>Testiorganismi</u>	<u>MIC-arvot^a</u>
	Staphylococcus aureus X1.1	1
	" " V41 ^b	1
	" " X400 ^c	2
	" " S13E	1
15	Staphylococcus epidermis EPI1	4
	" " EPI2	2
	Streptococcus pyogenes C203	0,25
	" pneumoniae Park I	0,015
20	" ryhmä D X66	2
	" " 9960	1

^aMIC mikrogrammaa/ml

^bPensilliiniresistentti kanta

25 ^cMetisilliiniresistentti kanta

Kaavan 1 edustavalla A-21978C sykklisellä peptidillä on in vivo osoittautunut olevan antibakteeriteho kokeellisiin bakteeri-infektioihin. Hiirille, jotka sairastivat tyypillisiä infektioita, annettiin kaksi annosta testiyhdistettä
 30 ja havaittu aktiivisuus mitattiin ED₅₀-arvona (tehoannos mg/kg, joka suojaa 50 %:a koe-eläimistä, ks. Warren Wick et al., J, Bacteriol. 81, 233-235 (1961)). Havaitut ED₅₀-arvot ilmenevät taulukosta III.

Taulukko III

N_{Trp} -p-(n-dodekyylioksi)bentsoyyli-A-21978C:n teho
in vitro

5 Kaavan 1 yhdiste^a

	<u>R</u>	Staphylococcus aureus	Streptococcus pyogenes
		Ihon alle	Ihon alle Suun kautta
10 N_{Trp} -p-(n-dodekyylioksi)- bentsyyli		3,35	0,31 yli 200

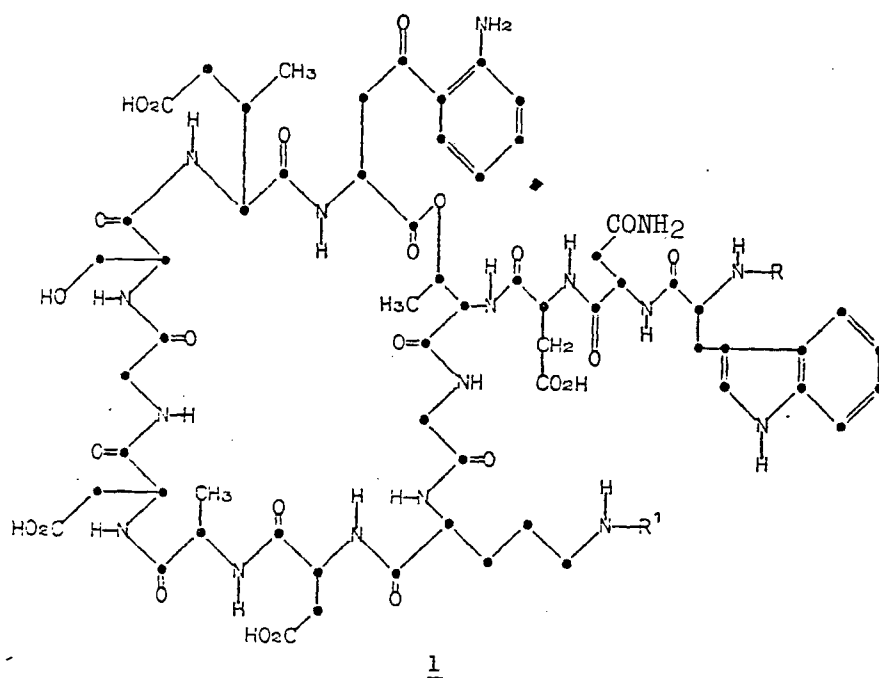
$a_{\text{R}}^1 = H$

15 $b_{\text{mg/kg} \times 2}$

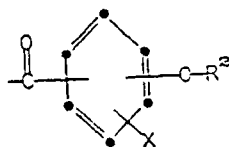
Annettaessa hiiren laskimoon N_{Trp} -p-(n-dodekyylioksi) bentsoyyli-A-21978C:n akuutti toksisuus oli ilmaistuna LD_{50} -arvona 67,5 mg/kg.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä A-21978C syklisen peptidin johdannaisen valmistamiseksi, joka on kaavaa (1)



jossa R on kaavaa



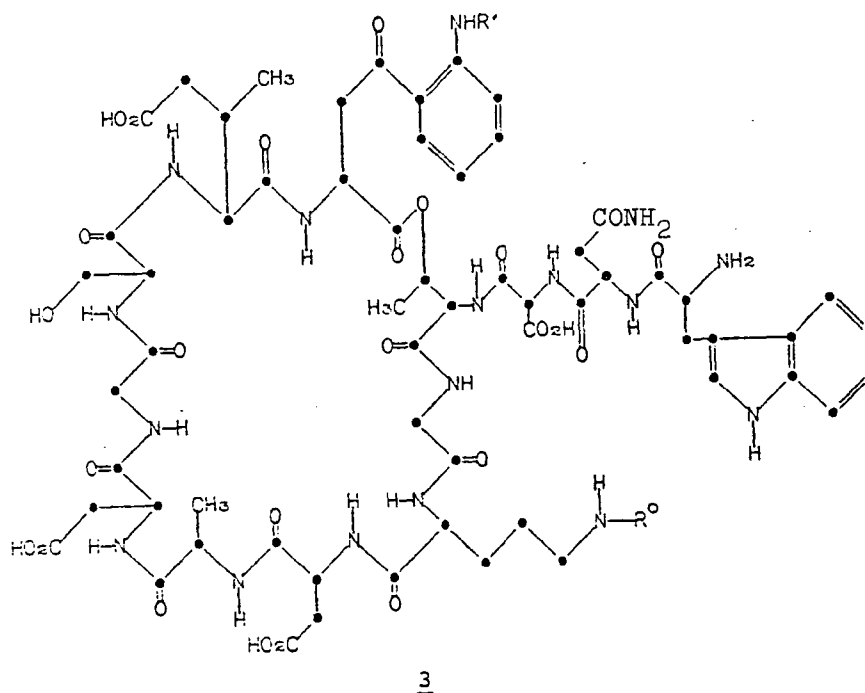
oleva substituoitu bentsoyyliryhmä, jossa R^2 on C_8-C_{15} -alkyyli; X on vety, kloori, bromi, jodi, nitro, C_1-C_3 -al-

kyyli, hydroksi, C_1-C_3 -alkoksi tai C_1-C_3 -alkyyli- ja R^1 on vety tai aminosuojaryhmä, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että annetaan A-21978C-ytimen, joka on kaavaa (3)

5

10

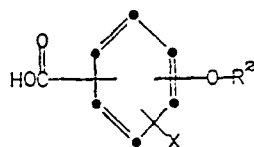
15



20

tai sen asianmukaisesti suojatun johdannaisen, jossa R^1 ja R^0 ovat toisistaan riippumatta vety tai aminosuojaryhmä, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan reagoida asylointiaineen kanssa, joka on kaavaa (5)

25



30

tai sen aktivoituneen johdannaisen kanssa, jossa kaavassa X ja R^2 merkitsevät kuten yll.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^2 on $C_{10}-C_{13}$ -alkyyli ja sen suolaja.

35

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että R^2-O- on dodekyylioksi ja
sen suoloja.

5 4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että X on vety ja sen
suoloja.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että R^2-O- on p-(n-dodekyyli-
oksi)ja X on vety ja sen suoloja.

10 6. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että X on kloori, bromi
tai jodi ja niiden suoloja.

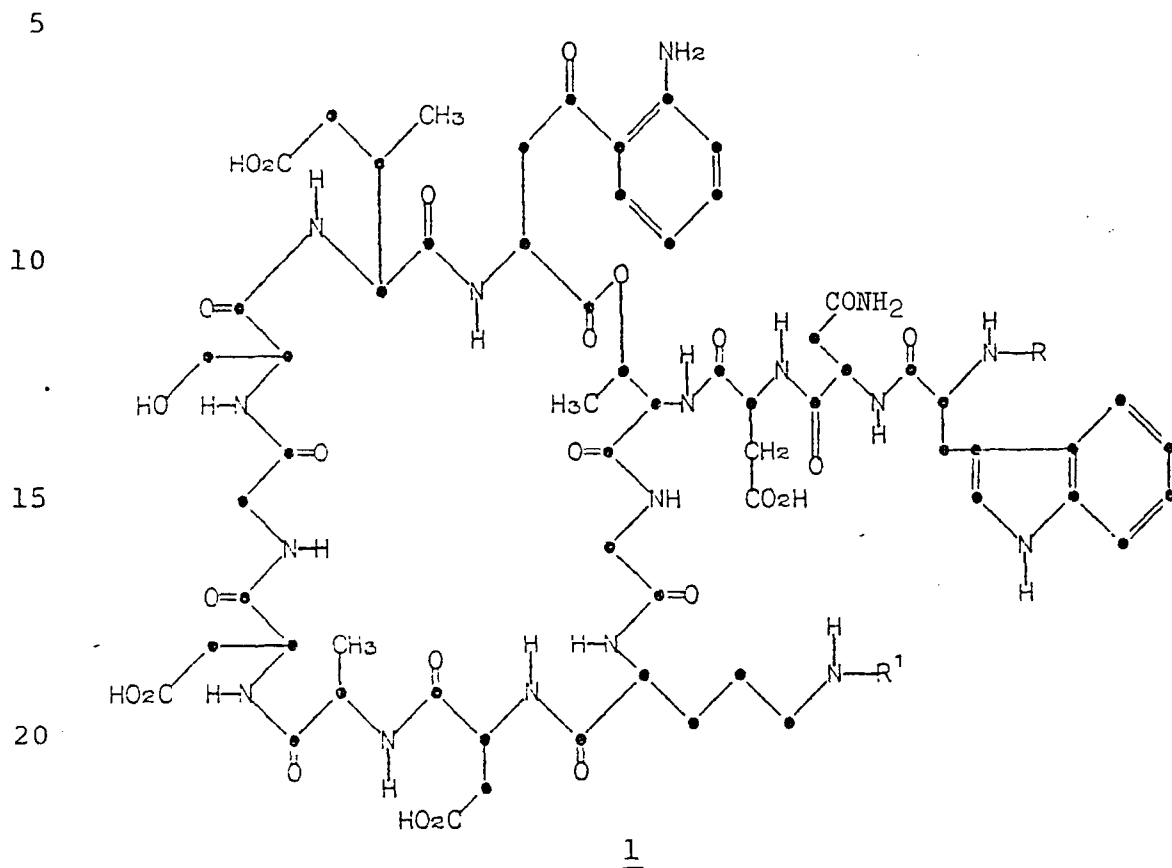
7. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3 tai 5 mukainen
menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R^1 on amino-
15 ryhmä ja sen suoloja.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että aminosuojaryhmä on tert.
-butoksikarbonyyli ja sen suoloja.

9. Kaavaa (1) oleva A-21978C-johdannainen tai sen
20 farmaseuttisesti hyväksyttävä suola valmistettuina
jonkun patenttivaatimuksen 1-8 menetelmän mukaan.

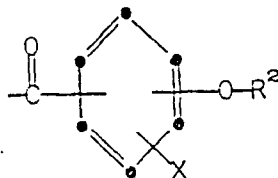
Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av ett cykliskt
 A-21978C-peptidderivat med formeln (1)



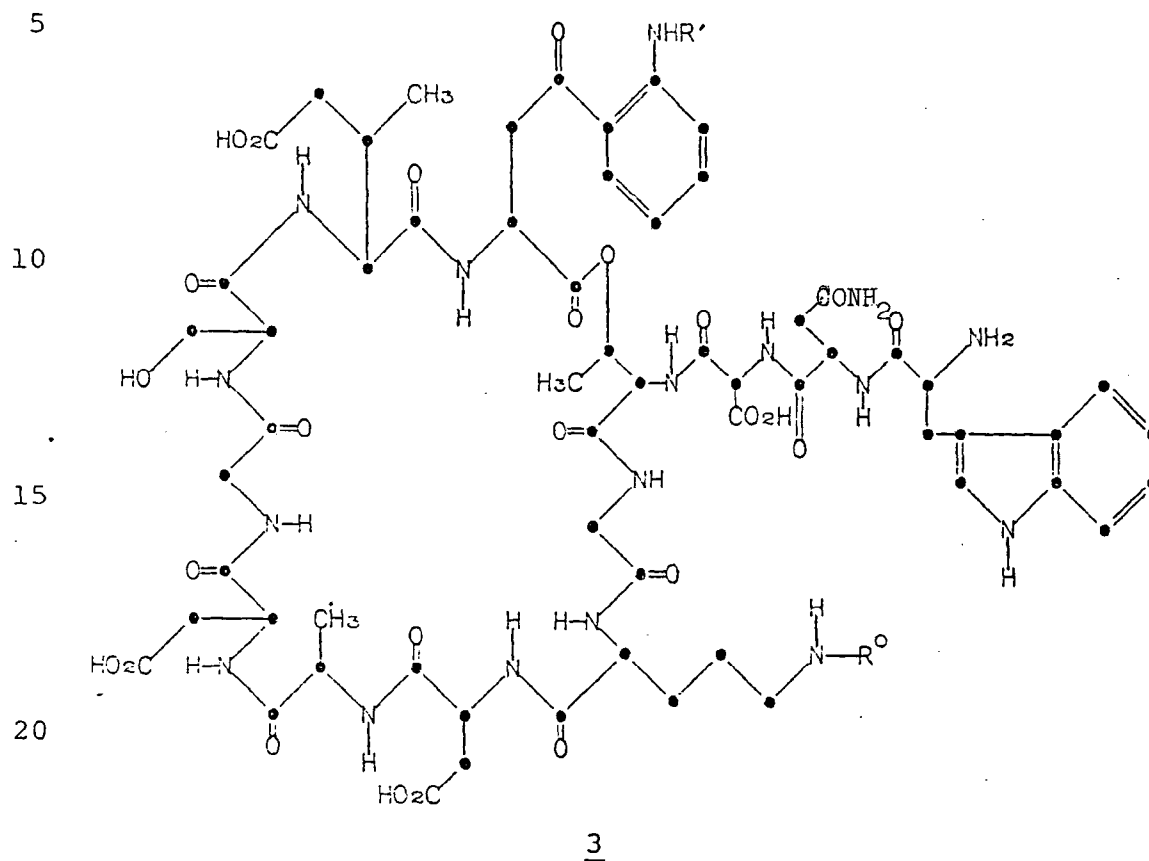
vari R är en substituerad bensoylgrupp med formeln

25



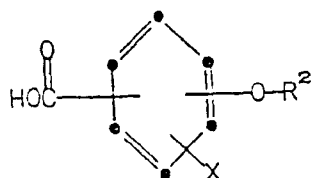
30 vari R^2 är C_8 - C_{15} -alkyl; X är väte, klor, brom, jöd, nitro,
 C_1 - C_3 -alkyl, hydroxi, C_1 - C_3 -alkoxi eller C_1 - C_3 -alkyltio;
 och R^1 är väte eller en aminoskyddande grupp; eller av ett
 farmaceutiskt godtagbart salt därav, k ä n n e t e c k -

n a t därav, att det omfattar reagerande av A-21978C-kärnan med formeln (3)



25 eller ett lämpligt skyddat derivat därav, vari R' och R⁰ oberoende av varandra är väte eller en aminoskyddande grupp, eller av ett farmaceutiskt godtagbart salt därav, med ett acyleringsmedel med formeln (5)

30



35 eller ett aktiverat derivat därav, vari X och R² är som ovan definierats.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att R^2 är C_{10} - C_{13} -alkyl och salt
därav.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e -
5 t e c k n a t därav, att R^2 -O- är dodecyloxi och dess
salt.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, 2 eller 3,
k ä n n e t e c k n a t därav, att X är väte och salter-
na därav.

10 5. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att R^2 -O- är p-(n-dodecyloxi) och
X är väte och dess salt.

6. Förfarande enligt patentkravet 1, 2 eller 3,
k ä n n e t e c k n a t därav, att X valts bland klor,
15 brom eller jod, och salterna därav.

7. Förfarande enligt patentkravet 1, 2, 3 eller 5,
k ä n n e t e c k n a t därav, att R^1 är en aminoskyddan-
de grupp och salten därav.

8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att den aminoskyddande gruppen är
tert.-butoxikarbonyl och salten därav.

9. A-21978C-derivat med formeln (1) eller ett far-
maceutiskt godtagbart salt därav, närhelst de framställts
genom ett förfarande enligt något av patentkraven 1-8.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökninga

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

USP 4293484

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP -A1 - 3/22/ (A61K37/02)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Anna Linder

Allekirjoitus