



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) 173733

(13) B

(51) Int Cl<sup>5</sup> C 07 D 209/18

Styret for det industrielle rettsvern

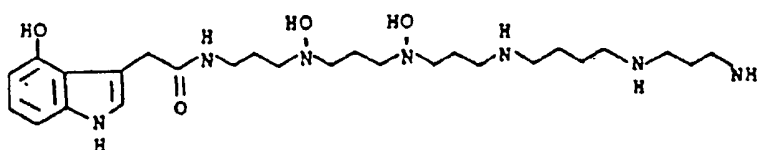
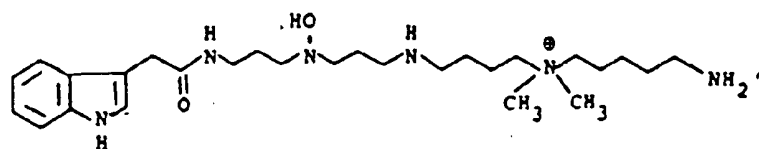
(21) Søknadsnr	905616	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	28.12.90	(85) Videreføringssdag	
(24) Løpedag	28.12.90	(30) Prioritet	02.01.90, US, 460207
(41) Alm. tilgj.	03.07.91		31.07.90, US, 560699
(44) Utlegningsdato	18.10.93		

(71) Patentsøker	Pfizer Inc, 235 East 42nd Street, New York, NY 10017-5755, US
(72) Oppfinner	Nicholas Alex Saccomano, Ledyard, CT, US Robert Alfred Volkmann, Mystic, CT, US
(74) Fullmektig	Johan H. Gørbitz, Bryn & Aarflot AS, Oslo

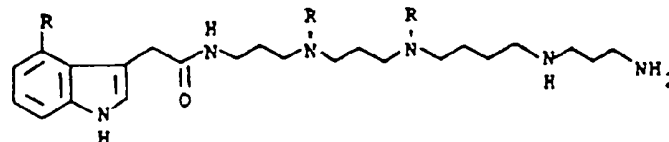
(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av polyaminer**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag Det beskrives fremgangsmåter for fremstilling av polyaminer med formelen



og



hvor R er H eller OH og farmasøytisk akseptable salter derav, som er funnet i giftsekretet fra *Agelenopsis aperta*-edderkoppene. Disse polyaminer og deres salter antagoniserer eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere. Slike neurotransmittere påvirker celler i forskjellige organismer, og kan benyttes som sådanne for å antagonisere de nevnte neurotransmittere, ved behandling av sykdommer og tilstander mediert av eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere, og for kontroll av invertebrate skadegjørere

Det beskrives også preparater som omfatter de nevnte polyaminer og salter derav.

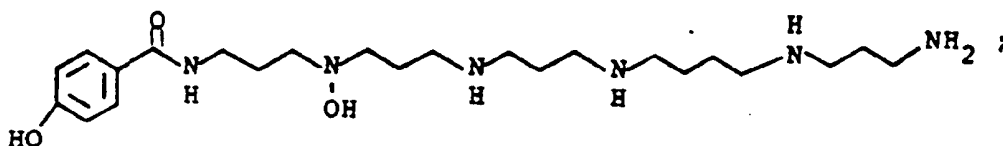
Denne oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av visse polyaminer som er funnet i giftsekretet fra *Agelenopsis aperta*-edderkoppen. Disse polyaminer og deres farmasøytisk akseptable salter er antagonister av eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere. Slike neurotransmittere påvirker celler, innbefattet nerveceller, i en rekke organismer, innbefattet invertebrater og vertebrater. Polyaminene og deres salter kan benyttes til å antagonisere eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere som påvirker celler, så som celler i en organismes nervesystem, samt til behandling av sykdommer og tilstander mediert av eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere og til kontroll av invertebrate skadegjørere.

De nevnte polyaminer og salter derav kan innarbeides i passende preparater.

Det er rapportert at giften fra *Agelenopsis aperta*-edderkoppen inneholder minst to toksiner som påvirker kalsiumstrømmer. Jackson, H., et al., Soc. Neu. Sci. Abstr. 12:1078 (1987). Forfatterne omtaler et toksin som de har betegnet AG2, som har en molekylvekt på mindre enn 1000 dalton og som synes å undertrykke kalsiumstrømmer i en lang rekke vev. Videre omtaler Jackson, H., et al., Soc. Neu. Sci. Abstr. 12:730 (1986) et annet toksin fra *Agelenopsis aperta* som inneholder en komponent med en molekylvekt på ca. 6000. Sistnevnte toksin angis å bevirke presynaptisk blokkering av transmisjonen, og det er antydnet at toksinet blokkerer kalsiumkanaler som har sammenheng med frigjøringen av neurotransmittere.

Visse polyaminer i giften fra *Agelenopsis aperta*-edderkoppen er beskrevet i US-patentsøknad serie No. 07/346.181 av 28. april 1989. Disse polyaminene og farmasøytisk akseptable salter derav, beskrives som blokkere av eksitatoriske aminosyre-reseptorer i celler, og et slikt polyamin (B<sub>1</sub>) angis også å være blokker av kalsiumkanaler i celler. Disse polyaminene er der beskrevet som følger:

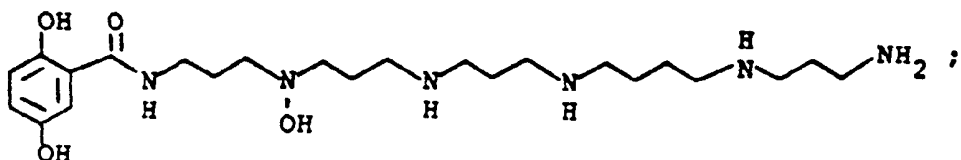
AGEL 452:



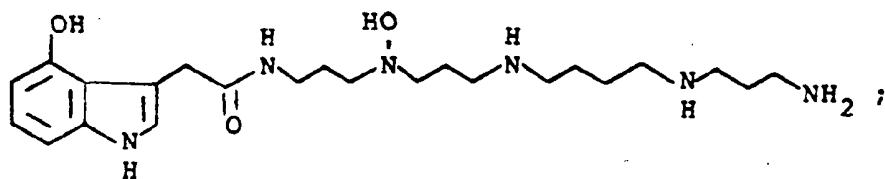
173733

2

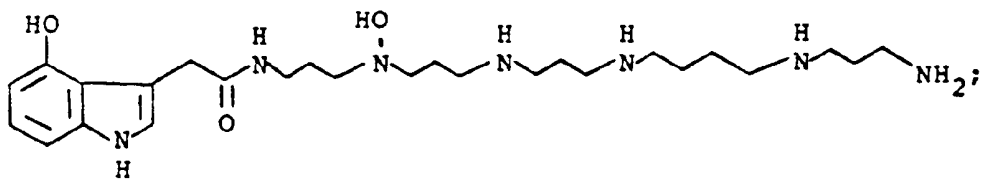
AGEL 468:



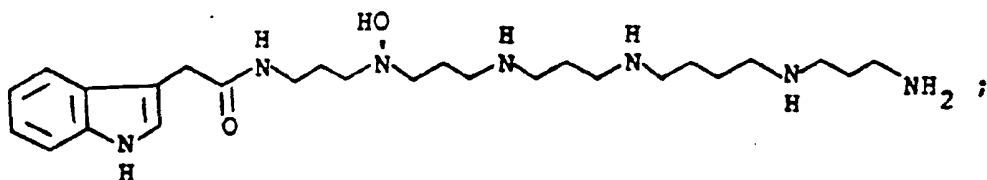
AGEL 448:



AGEL 505:



AGEL 489:



og

AGEL 504:

en forbindelse med følgende identifiserende karakteristika:

(a) forekommende i en fraksjon fra det rå giftsekret fra Agelenopsis aperta-edderkoppa, som elueres fra en C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonne 22 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 10 µ partikkelstørrelse, ved bruk av en gjennomstrømningshastighet på 15 ml/min. og et oppløsningsmiddelsystem med et lineært gradientprogram på 5% → 20% B, 95% → 80% A [0 → 30 min.], deretter 20% → 70% B, 80% → 30% A [30 → 55 min.], hvor A er 0,1% vandig TFA og B er acetonitril, ved ca. 22,75 minutter;

(b) forekommende i en fraksjon av fraksjonen beskrevet i (a), ovenfor, som elueres fra en C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonne, 22 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 10 µ partikkelstørrelse, ved bruk av en gjennomstrømningshastighet på 15 ml/min. og et oppløsningsmiddelsystem med et ulineært gradientprogram på 0% → 0% B, 100% → 100% A [0 → 5 min.], deretter 0% → 10% B, 100% → 90% A [5 → 20 min.] (Waters, kurve 1) deretter 10% → 20% B, 90% → 80% A [20 → 30 min.] (Waters, kurve 6) deretter 20% → 50% B, 80% → 50% A [30 → 40 min.] (Waters, kurve 11), hvor A er 0,1% vandig TFA og B er acetonitril, ved ca. 21,5 minutter, og

(c) FAB MS: høy-oppløsning: 505,3861 beregnet for  $C_{27}H_{48}N_6O_3$ .

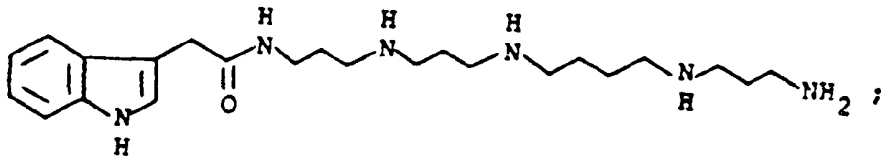
Forbindelser som er eksitatoriske aminosyre-neurotransmitter-antagonister, har en rekke anvendelser. Kalsium-antagonister kan finne klinisk anvendelse ved behandling av tilstander som slag, cerebral ischemi, degenerative nerveforstyrrelser, så som Alzheimer's sykdom og epilepsi, og også som psykoterapeutika. Se Excitatory Amino Acids in Health and Disease, D. Lodge, Ed. John Wiley & Sons, Ltd., New York, NY 1988, som herved inkorporeres i foreliggende beskrivelse. Slike forbindelser er dessuten nyttige ved studiet av fysiologien av celler, f.eks. nerveceller, og ved kontroll av invertebrate skadegjørere.

Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte for fremstilling av visse polyaminer som er funnet i giften fra Agelenopsis aperta-edderkoppa. Polyaminene fremstillet i henhold til oppfinnelsen er som følger:

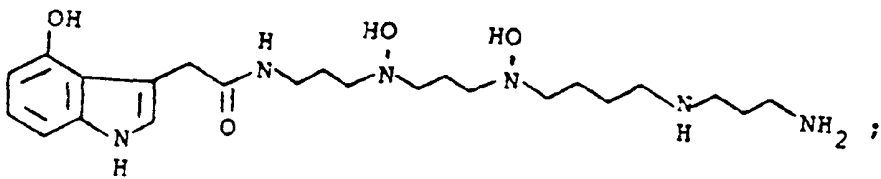
173733

4

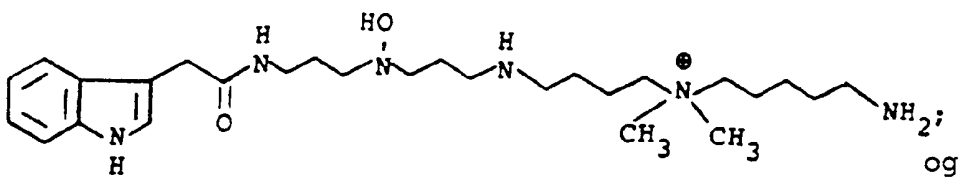
AGEL 416:



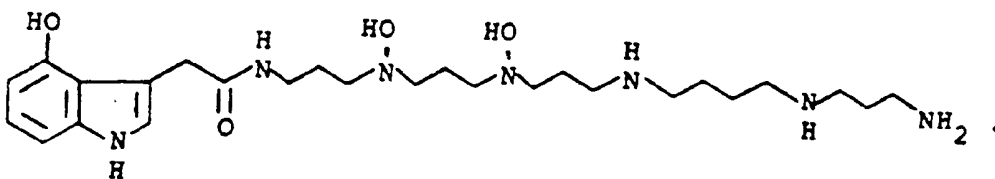
AGEL 464:



AGEL 489(A):



AGEL 521:



Polyaminene fremstillet i henhold til foreliggende oppfinnelse og deres farmasøytisk akseptable salter, er antagonister av eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere. Polyaminene som sådanne er således anvendelige ved antagonisering av slike eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere. De er også anvendelige for kontroll av invertebrate skadegjørere og til behandling av slike sykdommer og tilstander i pattedyr som medieres av eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere. Dessuten er slike polyaminer anvendelige som psykoterapeutika.

Gjennom oppfinnelsen kan det også fremstilles farmasøytiske preparater som inneholder de nevnte polyaminer.

Giften fra *Agelenopsis aperta*-edderkoppen oppnås ved en melkeprosess basert på elektrisk stimulering i henhold til velkjente standardmetoder. Det er å foretrekke at den anvendte metode forhindrer forurensning av giften gjennom abdominal regurgitasjon av blod og lymfe. Slike metoder er velkjent for fagmannen. Hele den således oppnådde gift oppbevares i dypfryst tilstand ved ca.  $-78^{\circ}\text{C}$  inntil anvendelse i den nedenfor beskrevne opprensning.

Opprensningen av komponentene fra rågiften oppnås ved omvendt-fase HPLC (High Performance Liquid Chromatography) på et utvalg av preparative og semi-preparative kolonner, så som C-4 og C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonner (Rainin Instrument Co. Inc., Mack Road, Woburn Massachusetts 01801), C-18 Baker kolonner (J.T. Baker Inc., 22 Red School Lane, Phillipsburg, NJ 08865) og Dynamax Phenyl kolonner (Rainin Instrument Co. Inc., Mack Road, Woburn Massachusetts 01801). Påvisning av toppene foretas monokromatisk ved 220-230 nm. Videre analyse av fraksjonene kan oppnås for eksempel ved Polychrome UV-data registert med en Waters 990 diode-array-detektor (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757). Fraksjonene fra kolonnene oppsamles på kjent måte, f.eks. ved bruk av en ISCO/"FOXY" fraksjonssamler og en ISCO 2159 detektor (ISCO, 4700 Superior, Lincoln, Nebraska 68504). Fraksjonene oppsamles i passende dimensjonerte beholdere, så som sterilt polyetylen-laboratorieutstyr. Konsentrering av fraksjonene oppnås ved lyofilisering fra eluatet og deretter ved lyofilisering fra vann. Renheten av de resulterende

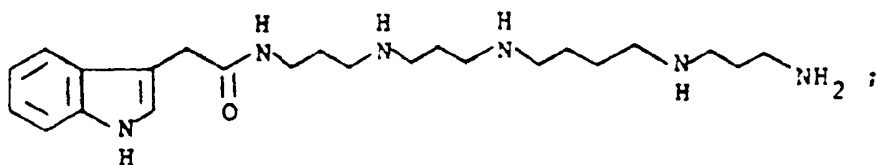
fraksjoner kan deretter bestemmes ved kromatografisk analyse på en analytisk kolonne med et gradientsystem som er mer isokratisk enn systemet benyttet i den avsluttende opprensning av fraksjonene.

De strukturer som de respektive fraksjoner omfatter, bestemmes etter kjente analytiske metoder, så som massepektrometri og kjernemagnetisk resonans.

Ved anvendelse av den ovenfor skisserte generelle fremgangsmåte har en passende kolonne for den første fraksjonering av giften vært en C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonne på 22 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse og 10 µ partikkelstørrelse. Kolonnen elueres med en gjennomstrømningshastighet på 15 ml/min. ved bruk av et lineært gradientprogram på 100% → 80% A, 0% → 20% B [0 → 30 min.], hvor A er 0,1% vandig trifluoreddiksyre (TFA) og B er acetonitril. Fraksjonene oppsamles som beskrevet ovenfor. Seks av de således oppnådde fraksjoner merket 1, 2, 3, 4, 5 og 6, ble valgt for videre analyse og/eller rensning. En annen metode for fraksjonering av hele giftsekretet omfatter en C-18 Baker (4,6 mm x 250 mm, 100 Å porestørrelse, 5 µ partikkelstørrelse) kolonne som ble eluert ved bruk av en strømningshastighet på 1 ml/min. under isokratiske betingelser med 8% B, 92% A, hvor A og B er som beskrevet ovenfor. I henhold til foreliggende oppfinnelse foretrekkes imidlertid bruk av C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonnen og den ovenfor beskrevne fremgangsmåte for den initiale fraksjonering av hele giftsekretet.

Fraksjonene 1, 2 og 3 viste seg å omfatte polyaminer som er beskrevet i US-patentsøknad serie No. 07/346.181 og omfattes således ikke av foreliggende oppfinnelse. Fraksjonene 4, 5 og 6 ble ytterligere rensset ved bruk av forskjellige kolonner og betingelser. Resultatene for de forskjellige underfraksjoner er angitt i de etterfølgende Eksempler 2, 3 og 4.

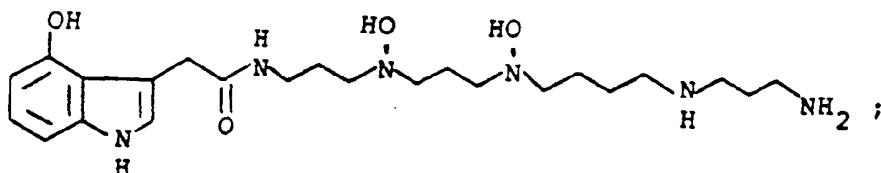
Som vist i de etterfølgende Eksempler, er polyaminforbindelsene som utgjøres av fraksjonene AGEL 416, AGEL 464, AGEL 489(A) og AGEL 521 som følger:  
AGEL 416:



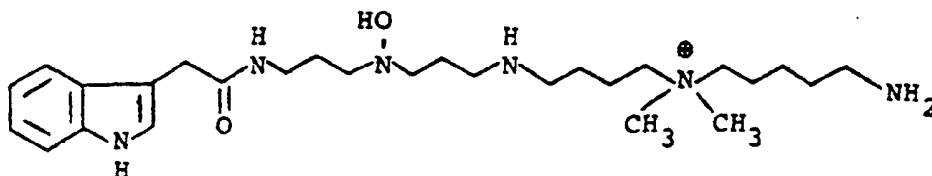
173733

7

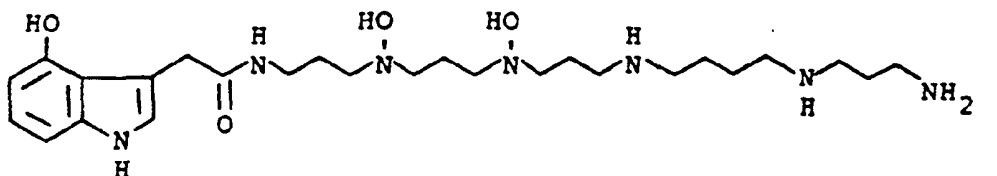
AGEL 464:



AGEL 489(A):



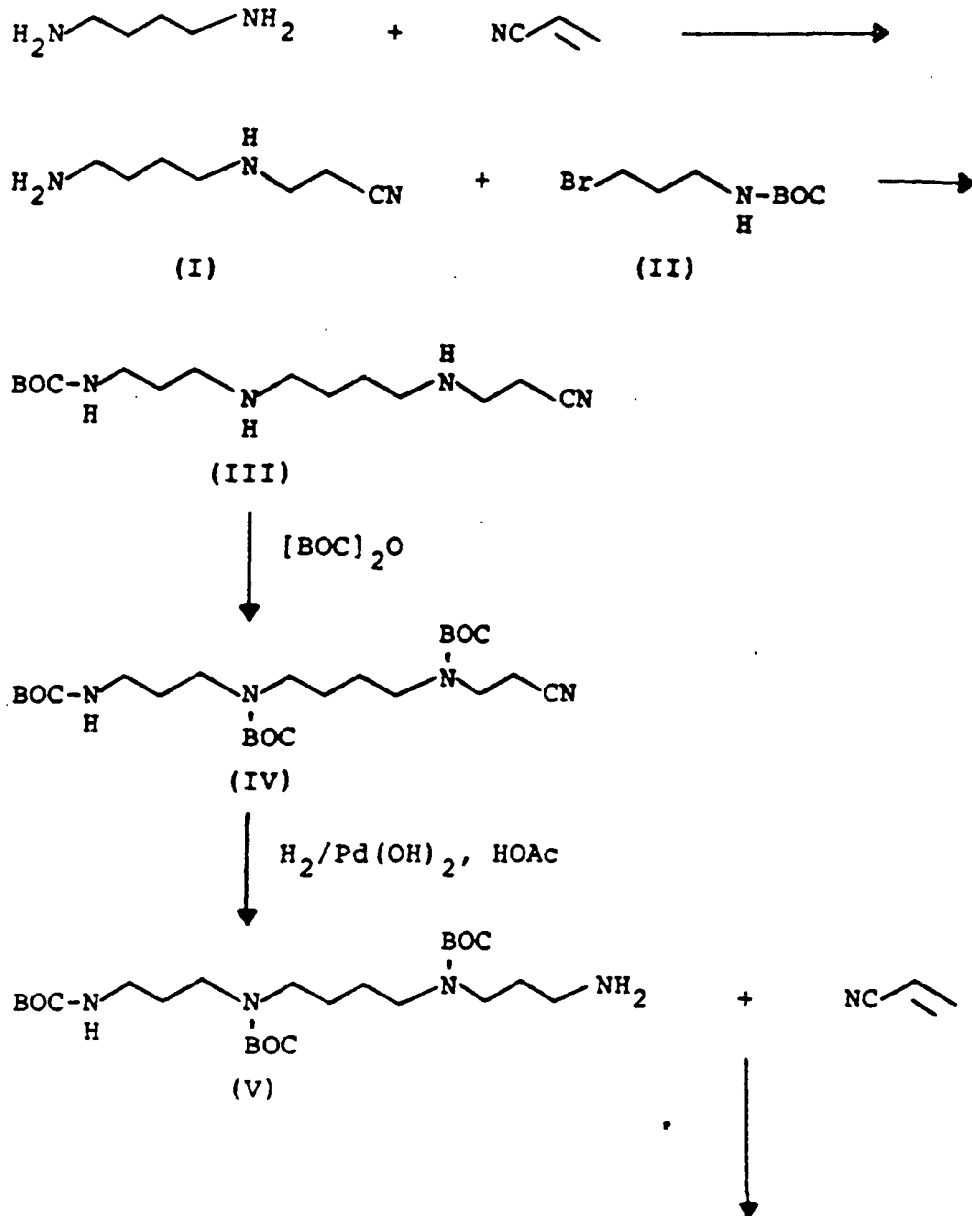
AGEL 521:

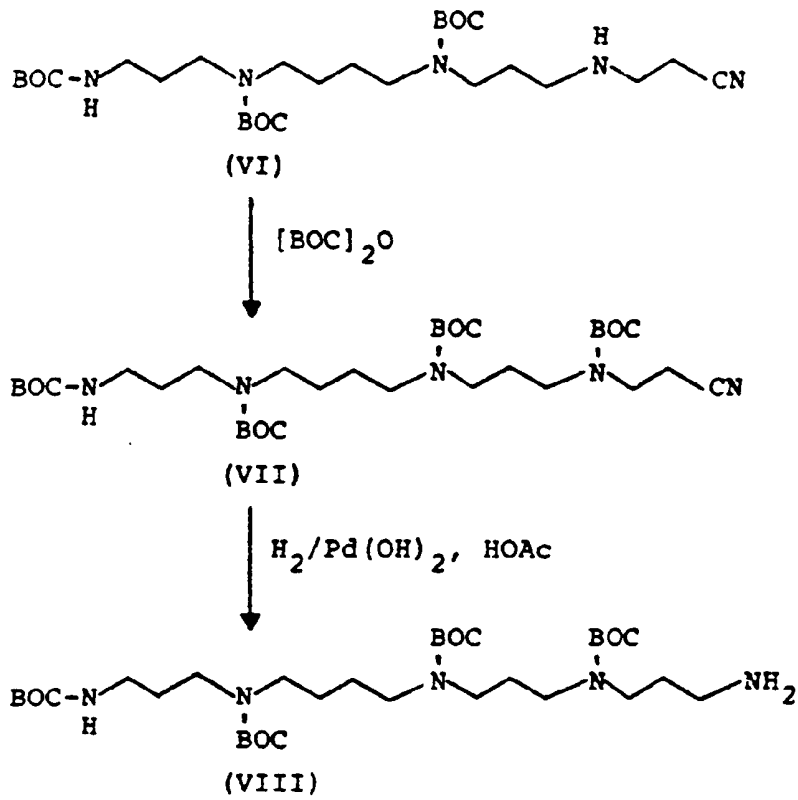


Ut fra hva som her er fastslått med hensyn til forbindelsene som forekommer i fraksjon AGEL 416, AGEL 464, AGEL 489(A) og AGEL 521, er det nå mulig å oppnå de nevnte forbindelser etter andre fremgangsmåter enn gjennom isolering/rensing av totalsekretet fra *Agelenopsis aperta*. Alle slike fremgangsmåter faller inn under oppfinnelsens ramme. For eksempel kan polyaminforbindelsene, i henhold til oppfinnelsen, fremstilles direkte eller syntetisk.

En syntese i henhold til oppfinnelsen for fremstilling av polyaminet med formel:



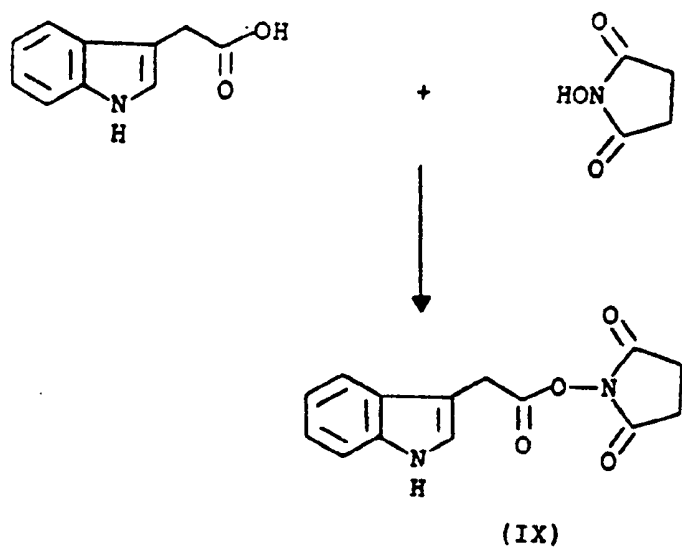
Reaksjonsskjema A



173733

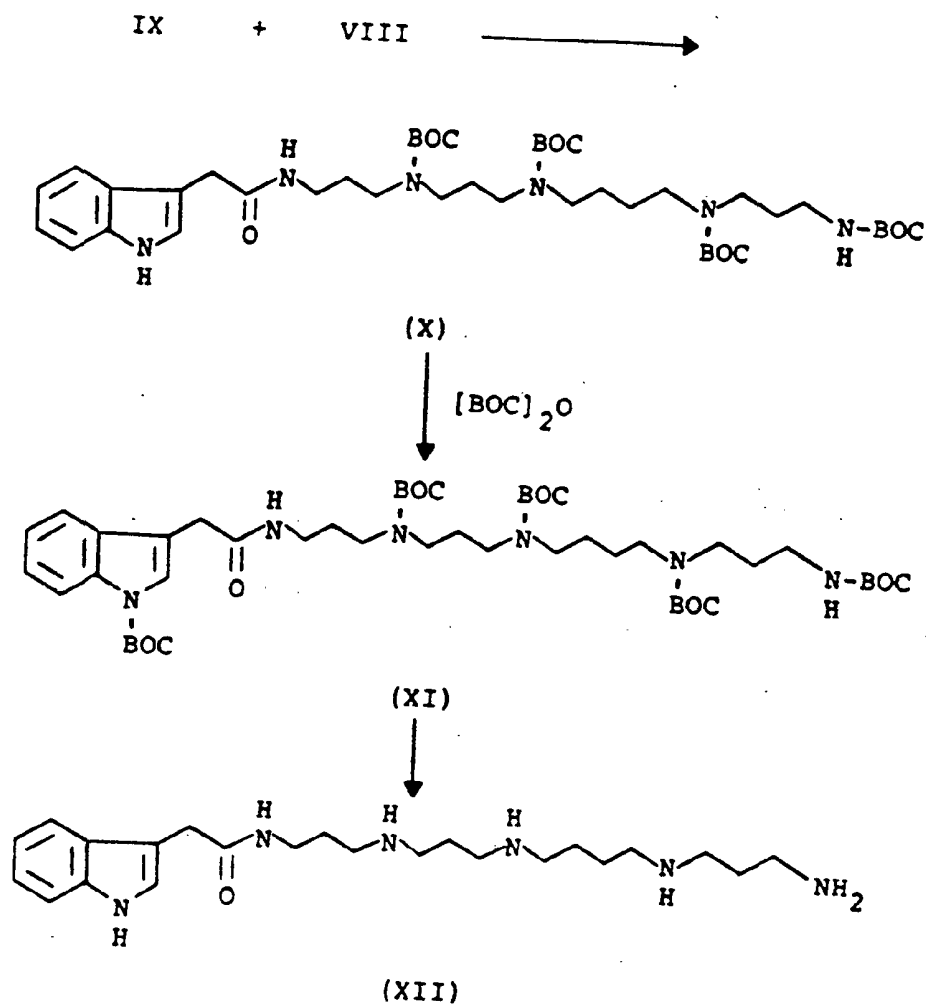
11

Reaksjonsskjema B



173733

12

Reaksjonsskjema C

Ifølge Reaksjonsskjema A fremstilles polyamin-mellomproduktet med formel IV ved en serie trinn som starter med diaminobutan. Egnede reaksjonsbetingelser for fremstilling av mellomproduktet VIII i henhold til Reaksjonsskjema A, er angitt i Eksempel 5, del A til G. Reaksjonsskjema B illustrerer en fremgangsmåte for fremstilling av mellomforbindelsen med formel IX. Passende reaksjonsbetingelser for å fremstille dette mellomprodukt i henhold til Reaksjonsskjema B, er angitt i Eksempel 5, del H. Fremstilling av polyaminforbindelsen med formel XII er vist i Reaksjonsskjema C. Passende reaksjonsbetingelser for koblingen av mellomproduktene VIII og IX og den etterfølgende fremstilling av forbindelsen XII, er angitt i Eksempel 5, del I til K.

Polyaminene fremstillet i henhold til oppfinnelsen, fører til en reversibel antagonisering av eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere, og disse neurotransmitterne påvirker celler, som for eksempel celler i nervesystemet hos en rekke organismer, innbefattet invertebrater og vertebrater. Betegnelsen vertebrater er i denne sammenheng ment å innbefatte pattedyr. Betegnelsen invertebrater er ment å innbefatte for eksempel insekter, ektoparasitter og endoparasitter.

De nye polyaminers evne til å antagonisere eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere fremgår av deres evne til å blokkere N-metyl-D-asparaginsyre-indusert (NMDA) økning av cGMP i neonatalt rotte-cerebellum som beskrevet i det følgende. Lillehjernen fra ti 8-14 dager gamle Wistar-rotter utprepareres hurtig og anbringes i 4°C Krebs/bikarbonat-buffer, pH 7,4, og snittes deretter opp i 0,5 mm x 0,5 mm snitt ved bruk av en McIlwain tissue chopper (The Nickle Laboratory Engineering Co., Gomshall, Surrey, England). De resulterende cerebellum-snitt overføres til 100 ml Krebs/bikarbonat-buffer ved 37°C som hele tiden holdes i likevekt med 95:5 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Cerebellum-snittene inkuberes på denne måte i 90 minutter, hvorunder buffer-oppløsningen skiftes ut tre ganger. Deretter avdekanteres bufferoppløsningen, hvoretter vevet sentrifugeres (1 min., 3200 rpm) og resuspenderes i 20 ml Krebs/bikarbonat-buffer. Deretter overføres 250 µl alikvoter (ca. 2 mg) til 1,5 ml mikrosentrifuge-rør. Rørene tilsettes 10 µl av en stam-oppløsning

av testforbindelsen og deretter 10  $\mu$ l av en 2,5 mM oppløsning av NMDA for å utløse reaksjonen. Den endelige NMDA-konsentrasjon er 100  $\mu$ M. Kontrollrør tilsettes ikke NMDA. Rørene inkuberes i 1 minutt ved 37°C i et rystebad, hvorpå 750  $\mu$ l av en 50 mM Tris-Cl, 5 mM EDTA-oppløsning tilsettes for å stanse reaksjonen. Rørene anbringes omgående i et kokende vann-bad i 5 minutter. Innholdet i hvert rør behandles deretter med ultralyd i 15 sekunder ved bruk av en ultralyd-probe innstillet på effekt-posisjon 3. Det tas ut 10  $\mu$ l, og i disse bestemmes proteinet etter Lowry, Anal. Biochem. 100:201-220 (1979). Rørene sentrifugeres deretter (5 min., 10.000 x g), hvorpå 100  $\mu$ l av den overstående væske tas ut og nivået av cyklisk GMP (cGMP) bestemmes ved hjelp av et New England Nuclear (Boston, Massachusetts) cGMP RIA assay-sett, i henhold til leverandørens metode. Dataene angis som pmol cGMP utviklet per mg protein.

De nye polyaminenes evne til å antagonisere eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere demonstreres gjennom deres evne til å blokkere NMDA/glycin-indusert økning i fritt  $[Ca^{2+}]_i$  i cytosol i dissosierte cerebellare kornceller etter følgende fremgangsmåte. Cerebellare kornceller fremstilles fra lillehjernen fra 8 dager gamle rotter (Wilkin, G. P., et al., Brain Res:115: 181-199, 1976). Kvadrater (1 cm<sup>2</sup>) Aclar (Proplastics Inc., 5033 Industrial Ave., Wall, N.J., 07719) dekkes med poly-L-lysin og anbringes i 12-brønns skåler som inneholder 1 ml Eagles Basal-medium. Cellene dissosieres og alikvoter inneholdende  $6,25 \times 10^6$  celler tilsettes til hver brønn som inneholder Aclar-kvadratene. Cytosin-beta-D-arabino-furanosid (sluttkonsentrasjon 10  $\mu$ M) tilsettes 24 timer etter "plating". Cellene benyttes til fura-2-analyse etter 6, 7 og 8 dagers dyrking. Cellene (bundet til Aclar-kvadratene) overføres til 12-brønns skåler inneholdende 1 ml 2  $\mu$ M fura2/AM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 97402) i HEPES buffer (inneholdende 0,1% serumalbumin fra storfe, 0,1% dektrose, pH 7,4, magnesium-fritt). Cellene inkuberes i 40 minutter ved 37°C, og den fura2/AM-holdige buffer fjernes og erstattes med 1 ml av samme buffer uten fura2/AM. Til en kvartskyvette tilsettes 2,0 ml oppvarmet (37°C) buffer. Cellene på Aclar-kvadratet anbringes i kyvetten og kyvetten føres inn i en termostatert (37°C) holder

forsynt med en magnetrører, hvorpå fluorescensen måles med et fluorescens spektrofotometer (Biomedical Instrument Group, University of Pennsylvania). Fluorescens-signalet får stabiliseres i ca. 2 minutter.

En økning i fritt kalsium i cytosol som gir seg utslag i øket fluorescens, bevirkes av tilsetning av 50  $\mu\text{M}$  NMDA og 1  $\mu\text{M}$  glycine. Deretter tilsettes 5-20  $\mu\text{l}$  av en stam-oppløsning av den aktuelle forbindelse i fosfatbuffer-holdig saltvann (PBS, pH 7,4) i passende konsentrasjoner, til kyvetten. Kalibrering av fluorescens-signalene og fura2/AM "leakage correction" foretas ved bruk av fremgangsmåter fastlagt av Grynkiewicz, G. et al., J. Biol. Chem., 260:3440 (1985). Ved avslutningen av hver test bestemmes maksimums-fluorescens-verdien ( $F_{\text{maks}}$ ) ved tilsetning av ionomycin (35  $\mu\text{M}$ ) og den minimale fluorescens-verdi ( $F_{\text{min}}$ ) ved den etterfølgende tilsetning av EGTA (12 mM) for chelatering av kalsium. Ved å benytte ovenfor omtalte fremgangsmåte vises at de aktuelle forbindelsers evne til å antagonisere eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere, inntreffer ved nedsatt fluorescens etter tilsetning av den aktuelle forbindelse.

Polyaminene fremstillet i henhold til foreliggende oppfinnelse er i seg selv anvendelige til å antagonisere eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere. Som sådanne er disse forbindelsene også anvendelige ved kontroll av invertebrate skadegjørere og ved behandling av sykdommer og tilstander i pattedyr, mediert av eksitatoriske aminosyre-neurotransmittere, så som slag, cerebral ischemi, nervedegenerasjon, så som Alzheimer's sykdom og epilepsi. Polyaminene kan også benyttes som psykoterapeutika. Dessuten er polyaminene anvendelige ved studiet av fysiologien av celler, innbefattet, men ikke begrenset til, celler i nervesystemet.

Gjennom foreliggende oppfinnelse kan det tilveiebringes farmasøytisk akseptable salter av de nye polyaminer. Slike salter frembringes etter velkjente metoder. For eksempel kan syreaddisjonssalter av polyaminene fremstilles etter konvensjonelle metoder. Syreaddisjonssalter av polyaminene, så som hydroklorid- og trifluoreddiksyre-addisjonssalter foretrekkes, spesielt hydrokloridsaltene.

Når et polyamin fremstillet i henhold til oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, administreres til til et pattedyr, kan det administreres for seg eller i kombinasjon med farmasøytisk akseptable bære- eller fortynningsmidler i et farmasøytisk preparat i henhold til vanlig farmasøytisk praksis. Polyaminene eller deres farmasøytisk akseptable salter, kan administreres peroralt eller parenteralt. Parenteral administrasjon innbefatter intravenøs, intramuskulær, intraperitoneal, subkutan og lokal administrasjon.

Ved peroral bruk av et polyamin eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, kan de nye forbindelser for eksempel administreres i form av tabletter eller kapsler eller som en vandig oppløsning eller suspensjon. Når det gjelder tabletter for peroral bruk, tilsettes vanligvis bæremidler som laktose og maisstivelse. Glattmidler, så som magnesiumstearat tilsettes også vanligvis. For peroral administrasjon i kapselform er laktose og tørket maisstivelse egnede fortynningsmidler. Når det for peroral bruk fordres vandige suspensjoner, kombineres virkestoffet med emulgerings- og suspenderingsmidler. Om ønskes, kan enkelte søtnings- og/eller aromastoffer tilsettes.

For intramuskulær, intraperitoneal, subkutan og intravenøs bruk fremstilles vanligvis sterile oppløsninger av virkestoffet, hvorpå oppløsningene innstilles på en hensiktsmessig pH og tilsettes buffer. For intravenøs bruk må totalkonsentrasjonen av oppløst materiale kontrolleres for å gjøre preparatet isotonisk.

Når ett av de nye polyaminene eller deres salter benyttes i human sammenheng, vil den daglige dosering vanligvis avgjøres av behandlende lege. Egnede doser av de nye polyaminer utgjør fra 3 til 30 mg/kg/dag. Doseringen vil dessuten variere med den enkelte pasients alder, vekt og respons, samt av graden av pasientens symptomer og styrken av den administrerte forbindelse. Doseringer utenfor det nevnte område kan derfor også være aktuelt.

Når det benyttes et polyamin fremstillet i henhold til foreliggende oppfinnelse eller et salt derav, for å kontrollere invertebrate skadegjørere, appliseres forbindelsen direkte på skadegjøreren eller i skadegjørerenens miljø. For eksempel kan en

oppløsning av forbindelsen sprøytes på skadegjøreren. Den nødvendige mengde for kontroll av skadegjøreren vil variere med hvilken invertebrat det er tale om og de aktuelle miljømessige betingelser, og vil avgjøres av den person som står for påføringen.

Når polyaminer fremstillet i henhold til oppfinnelsen eller salter derav, benyttes ved fysiologiske studier av celler, tilføres forbindelsene til cellene på velkjent måte. For eksempel kan forbindelsene tilføres cellene i en passende fysiologisk buffer. En passende konsentrasjon av forbindelsen ved slike studier er 100  $\mu\text{M}$ . Konsentrasjonen av forbindelsene kan under slike studier imidlertid være høyere enn, eller betydelig lavere enn 100  $\mu\text{M}$ . Mengden av den forbindelse som gis, vil bli fastlagt av fagmannen i henhold til velkjente prinsipper.

#### Eksempel 1

##### Initial fraksjonering av det totale giftsekret fra Agelenopsis aperta

Det totale giftsekret fra Agelenopsis aperta, oppnådd fra Natural Product Sciences Inc., Salt Lake City, Utah 84108, som var oppbevart i dypfryst tilstand ved ca.  $-78^{\circ}\text{C}$ , ble opptint, hvorpå 10 til 60  $\mu\text{l}$  mengder ble fortynnet til 200  $\mu\text{l}$  og anbragt på en C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonne (22 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 10  $\mu$  partikkelstørrelse) og eluert ved bruk av en gjennomstrømningshastighet på 15 ml/min. og et oppløsningsmiddelsystem som benyttet et lineært gradientprogram på 0%  $\rightarrow$  20% B, 100%  $\rightarrow$  80% A [0  $\rightarrow$  30 min.], hvor A er 0,1% vandig trifluoreddiksyre (TFA) og B er acetonitril. Registrering av toppene ble foretatt monokromatisk ved 220 nm og fraksjoner oppsamlet med en ISCO/"FOXY"-fraksjonssamler og en ISCO 2159 detektor. Fraksjoner ble samlet i tidsrommet fra 0 minutter til 30 minutter. Basert på toppens deteksjon, ble blant annet følgende fraksjoner oppsamlet:

<u>Fraksjon</u>	<u>Elueringstid</u>
1	ca. 13,8 min.
2	ca. 19,25 min.
3	ca. 21,0 min.
4	ca. 22,3 min.
5	ca. 23,1 min.
6	ca. 26,0 min.

Fraksjon 1 ble subfraksjonert ved bruk av den samme kolonne og de betingelser som beskrevet ovenfor, men med en Waters 990 diode-array-detektor, og det ble fastslått at Fraksjon 1 omfattet polyaminet AGEL 452. Dette polyamin er beskrevet i verserende US-patentsøknad serie nr. 07/346.181 og utgjør ikke del av foreliggende oppfinnelse. Fraksjon 2 var som beskrevet for subfraksjonering av Fraksjon 1, og det ble fastslått at Fraksjon 2 omfattet polyaminene AGEL 448 og AGEL 468, som begge også er beskrevet i nevnte US-patentsøknad serie nr. 07/346.181. Ingen av disse polyaminene utgjør del av foreliggende oppfinnelse. Videre ble Fraksjon 3 subfraksjonert ved bruk av en C-4 Vydac<sup>(R)</sup> (22 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 10 µ partikkelstørrelse) kolonne ved bruk av en lineær gradient på 5% → 10% B, 95% → 90% A [0 → 30 min.] hvor A og B er som beskrevet ovenfor under bruk av en Waters 990 diode-array-detektor. Det ble fastslått at Fraksjon 2 omfattet polyaminene 504 og 505 som også er beskrevet i nevnte US-patentsøknad serie nr. 07/346.181 og som ikke utgjør del av foreliggende søknad.

#### Eksempel 2

##### Subfraksjonering av Fraksjon 4 og bestemmelse av strukturer i denne

Fraksjon 4, oppnådd som beskrevet i Eksempel 1, ble anbragt på en C-18 Baker-kolonne (4,6 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 5 µ partikkelstørrelse) og eluert ved bruk av en strømningshastighet på 1 ml/min. under isokratiske betingelser med 8% B, 92% A, hvor A og B er som angitt i Eksempel 1. Toppene ble registrert ved bruk av en Waters 990 diode-array-detektor ( $\lambda = 220$  nm), og fraksjonsoppsamlingen ble foretatt som beskrevet i Eksempel 1. En subfraksjon, her betegnet AGEL 521,

ble eluert fra kolonnen ved ca. 19,50 minutter. Fraksjon AGEL 521 ble forberedt for spektralanalyse ved lyofilisering fra elueringsmidlet og deretter fra vann, i henhold til standard-metoder. Den lyofiliserte forbindelse av Fraksjon AGEL 521 ble oppbevart ved ca.  $-80^{\circ}\text{C}$  under argonatmosfære.

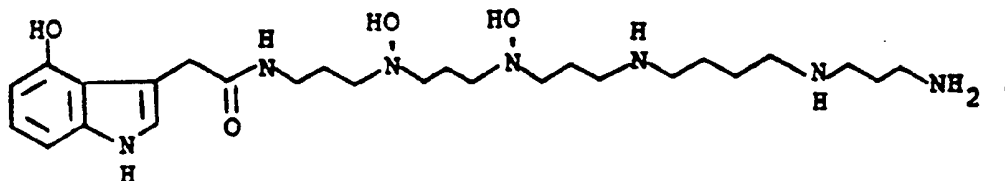
Strukturen av forbindelsen som inngår i Fraksjon AGEL 521 ble deretter bestemt ved bruk av FAB MS. De således oppnådde data og strukturer utledet av disse, er som følger:

AGEL 521:

FAB MS: (høy-oppløsning) observert (M+H):

M/Z=522,3774; beregnet for  $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_4$ : 522,3768

Struktur: 1H-indol-3-acetamid-N-(20-amino-4,8-dihydroksy-4,8,12,17-tetrazeicos-1-yl)



### Eksempel 3

#### Subfraksjonering av Fraksjon 5 og bestemmelse av strukturer i denne

Fraksjon 5, oppnådd som beskrevet i Eksempel 1, ble anbragt på en Dynamax Phenyl (4,6 mm x 250 mm, 60Å porestørrelse, 8  $\mu$  partikkelstørrelse) kolonne og eluert med en strømnings-hastighet på 1 ml/min. under isokratiske betingelser med 10% B, 90% A, hvor A og B er som beskrevet i Eksempel 1. Toppdeteksjon og fraksjonsoppsamling ble foretatt som beskrevet i Eksempel 2. Fraksjonene merket AGEL 416 og AGEL 464 ble oppnådd som følger:

<u>Fraksjon</u>	<u>Elueringstid</u>
AGEL 416	ca. 26,47 min.
AGEL 464	ca. 37,76 min.

173733

20

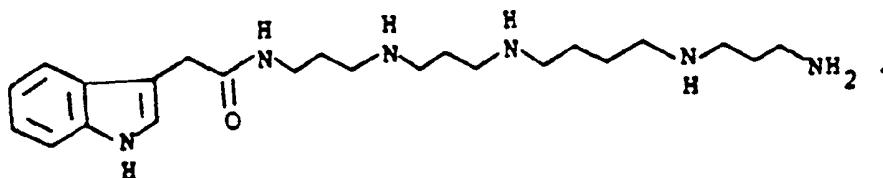
Fraksjon AGEL 416 og AGEL 464 ble forberedt for spektral-analyse og oppbevart som angitt i Eksempel 2.

Strukturen av forbindelsen som inngår i Fraksjon AGEL 416, ble bestemt ved bruk av FAB MS, og resultatene er som følger:

FAB MS: (høy-oppløsning) observert (M+H):

M/Z=417,3336; beregnet for  $C_{23}H_{41}N_6O_4$ : 417,3342

Struktur: 1H-indol-3-acetamid-N-(16-amino-4,8,13-triazaheksadec-1-yl)

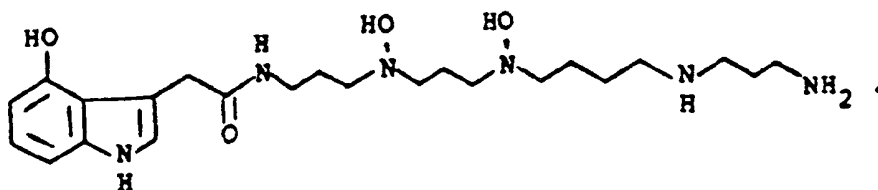


Strukturen av forbindelsen som inngår i Fraksjon AGEL 464 ble bestemt ved bruk av FAB MS med følgende resultat:

FAB MS: (høy-oppløsning) observert (M+H):

M/Z=465,3173; beregnet for  $C_{23}H_{41}N_6O_4$ : 465,3189

Struktur: 1H-indol-3-acetamid-N-(16-amino-4,8-dihydroksy-4,8,13-triazaheksadec-1-yl)-4-hydroksy



#### Eksempel 4

Subfraksjonering av Fraksjon 6 og  
bestemmelse av strukturene i denne

Fraksjon 6, oppnådd som beskrevet i Eksempel 1, ble anbragt på en Dynamax Phenyl-kolonne og eluert ifølge fremgangsmåtene beskrevet i Eksempel 3. Toppdeteksjon og fraksjons-

oppsamling ble foretatt som beskrevet i Eksempel 2. Fraksjoner merket AGEL 489(A) og AGEL 489 ble oppnådd som følger:

<u>Fraksjon</u>	<u>Elueringstid</u>
AGEL 489	ca. 41,95 min.
AGEL 489(A)	ca. 55,27 min.

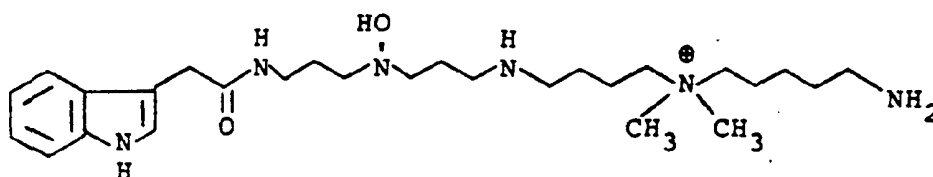
Fraksjonene AGEL 489(A) og AGEL 489 ble forberedt for spektralanalyse og oppbevart som beskrevet i Eksempel 2.

Strukturen av forbindelsen som inngår i AGEL 489(A) ble bestemt ved bruk av FAB MS med følgende resultat:

FAB MS: (høy-oppløsning) observert (M+H):

M/Z=489,3896; beregnet for C<sub>27</sub>H<sub>49</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: 489,3917

Struktur: 1H-indol-3-acetamid-N-(18-amino-13,13-dimetyl-4-hydroksey-4,8,13-triazaoktadec-1-yl)

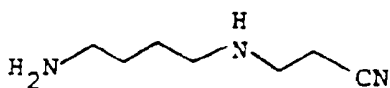
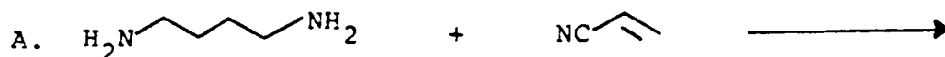


Strukturen av forbindelsen som inngår i Fraksjon AGEL 489, ble bestemt ved bruk av FAB MS og funnet å være forbindelsen AGEL 489 beskrevet i US-patentsøknad serie nr. 07/346.181. AGEL 489 utgjør ikke del av foreliggende oppfinnelse.

#### Eksempel 5

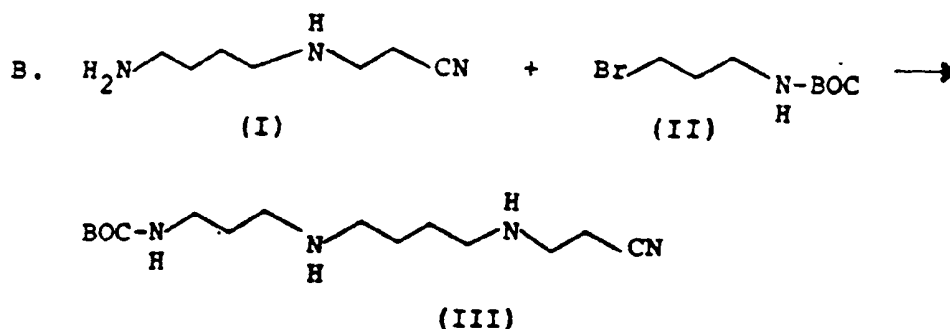
1H-indol-3-acetamid-N-(16-amino-4,8,13-triazaheksadec-1-yl)

Syntese av tittelforbindelsen, som ble fastslått å inngå i Fraksjon AGEL 416 beskrevet i Eksempel 3, ble foretatt som følger:

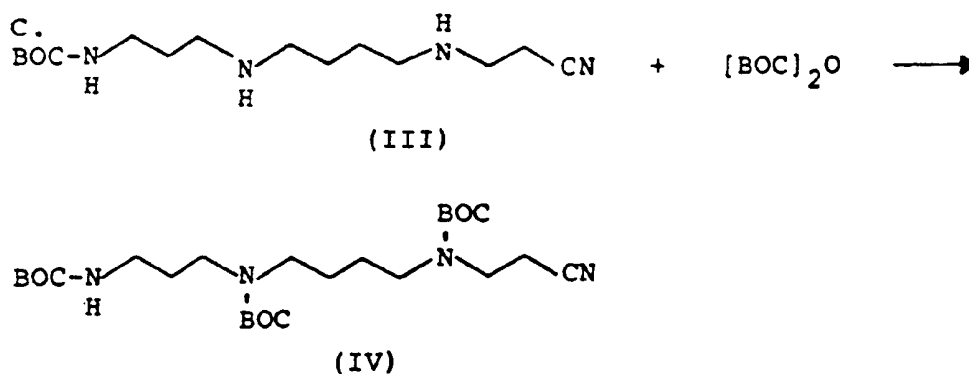


(I)

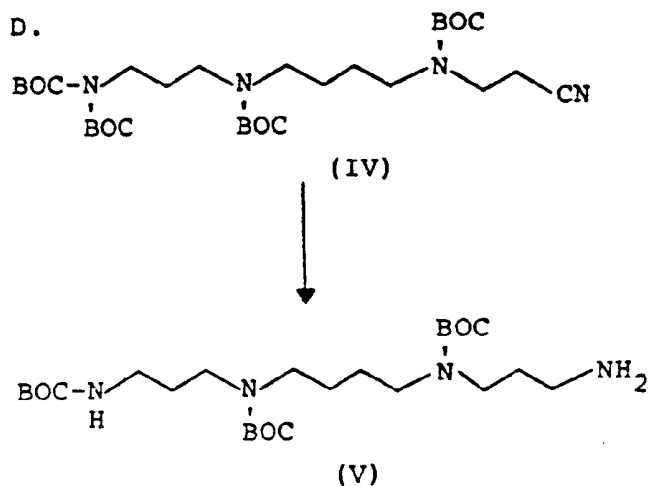
Forbindelsen med formel I ble fremstillet fra diaminobutan og akrylnitril i henhold til fremgangsmåten publisert av Yamamoto, Hisashi, J. Am. Chem. Soc. 103:6133-6136 (1981).



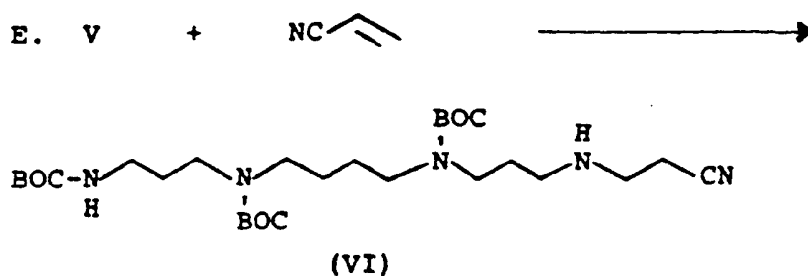
Under nitrogenatmosfære ble 5,78 g (0,041 mol) av forbindelse I, fremstillet som beskrevet i del A ovenfor, tilsatt til 75 ml CH<sub>3</sub>CN og 11,48 g KF Celite og deretter omrørt. Til den omrørte blandingen ble det tilsatt en oppløsning av 9,75 g (0,041 mol) av forbindelsen med formel II, fremstillet som beskrevet i Fremstilling A, i 25 ml CH<sub>3</sub>CN. Reaksjonsblandingen ble kokt under tilbakeløpskjøling i 6 timer, deretter avkjølt til romtemperatur og hensatt over natten. KF-Celite ble deretter frafiltrert og filter-kaken vasket grundig med CH<sub>3</sub>CN. Filtratet ble konsentrert i vakuum for å gi 14 g råprodukt som en olje. Råproduktet ble kromatografert på 400 g silikagel ved bruk av 500 ml diklormetan, deretter 1 liter 85:15 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH etterfulgt av 1 liter 75:25 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, etterfulgt av 1 liter 75:25 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH pluss 25 ml isopropylamin og deretter 1 liter 75:25 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH pluss 50 ml isopropylamin, deretter 400 ml 75:25 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH pluss 75 ml isopropylamin. Fraksjonene ble undersøkt ved tynnskiktkromatografi og fraksjoner som inneholdt det ønskede produkt, bekreftet ved NMR, samlet og konsentrert i vakuum for å gi 4,7 g av produktet med formel III, ovenfor.



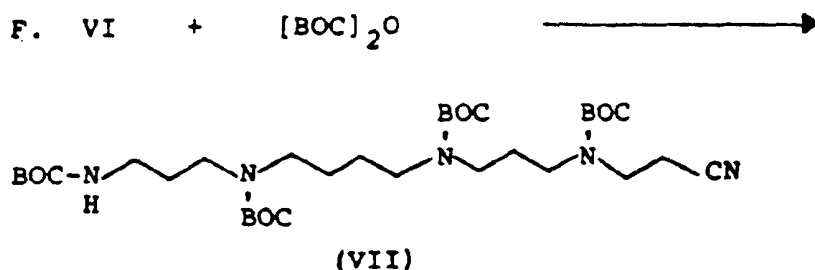
Under nitrogenatmosfære ble 4,7 g (15,8 mmol) av forbindelse III, fremstillet som beskrevet i del B, ovenfor, oppløst i 150 ml diklormetan. Deretter ble 7,56 g (34,7 mmol) di-*t*-butyldikarbonat tilsatt og reaksjonsblandingen omrørt over natten ved romtemperatur. Blandingen ble deretter konsentrert i vakuum og kromatografert på 400 g silikagel ved bruk av 50:50 etylacetat/heksan som oppløsningsmiddel. Fraksjonene ble undersøkt ved TLC (50:50 etylacetat/heksan). Fraksjoner som inneholdt produktet med formel IV ble kombinert og konsentrert i vakuum for å gi 7,9 g produkt i form av en olje.



Til 125 ml eddiksyre ble det under nitrogenatmosfære tilsatt 7,85 g (15,8 mmol) av forbindelsen med formel IV, fremstillet, som beskrevet i del C ovenfor, og 6,5 g Pd(OH)<sub>2</sub>/-kull. Blandingen ble hydrogenert ved 3,5 kg/cm<sup>2</sup> i 2 timer. Katalysatoren ble fjernet ved filtrering og filter-kaken vasket grundig med eddiksyre. Filtratet ble konsentrert, tatt opp i 250 ml diklormetan, vasket to ganger med 100 ml 1N NaOH og tørket over K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Oppløsningen ble filtrert og filtratet konsentrert i vakuum for å gi 7,8 g av forbindelsen med formel V.

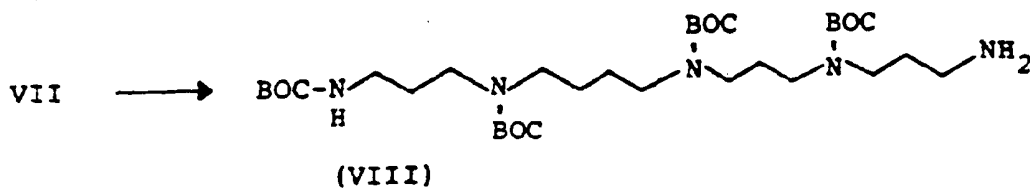


Under nitrogenatmosfære ble 7,15 g (14,2 mmol) av forbindelse V, fremstillet som beskrevet i del D ovenfor, oppløst i 150 ml metanol. Deretter ble 1,03 ml (15,6 mmol) akrylnitril tilsatt og reaksjonsblandingen omrørt i 72 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble deretter konsentrert, konsentrert på nytt tre ganger fra diklormetan og befridd for oppløsningsmiddel i vakuum for å gi 7,65 g av produktet med formel VI i form av en olje.



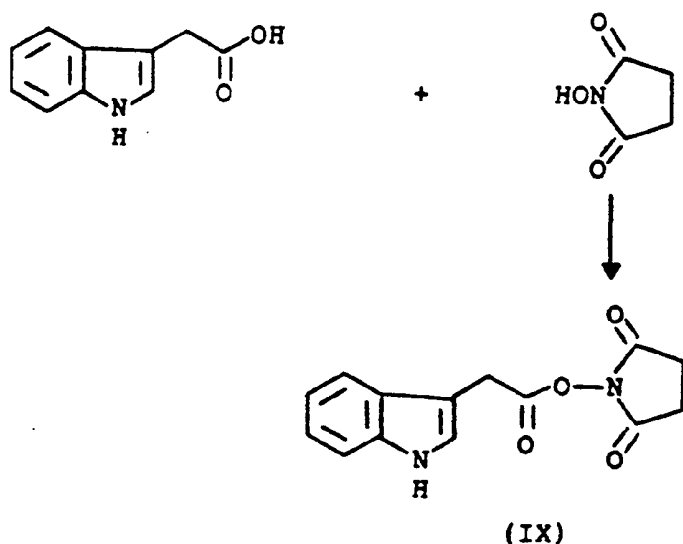
Under nitrogenatmosfære ble 6,45 g (11,6 mmol) av forbindelse VI, fremstillet som beskrevet i del E ovenfor, oppløst i 125 ml diklormetan. Til denne oppløsningen ble det tilsatt 2,6 g (12 mmol) di-t-butyl-dikarbonat, hvorpå reaksjonsblandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble deretter konsentrert og kromatografert på 400 g silikagel ved bruk av 50:50 etylacetat/heksan som elueringsmiddel. Produktholdige fraksjoner ble kombinert og konsentrert for å gi 6,6 g av produktet med formel VIII i form av en olje.

G.



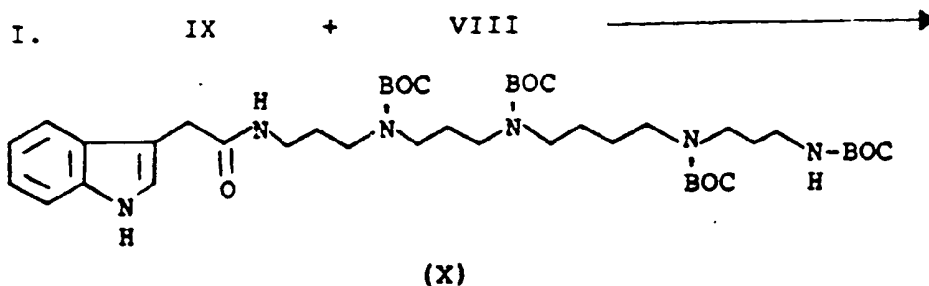
Til 150 ml eddiksyre ble det under nitrogenatmosfære tilsatt 6,6 g (10,1 mmol) av forbindelse VII, fremstillet som beskrevet i del F ovenfor, og 6 g Pd(OH)<sub>2</sub>/kull. Blandingen ble hydrogenert ved 3,5 kg/cm<sup>2</sup> i 2 timer. Katalysatoren ble frafiltrert og filter-kaken vasket grundig med eddiksyre. Filtratet ble konsentrert, tatt opp i 200 ml diklormetan, vasket to ganger med 100 ml 1N NaOH og tørket over K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Oppløsningen ble filtrert og filtratet konsentrert i vakuum for å gi 6,5 g av produktet med formel VIII

H.

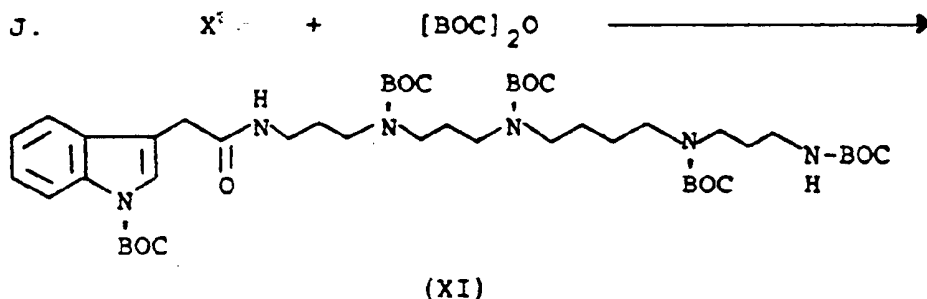


Under nitrogenatmosfære ble 1,75 g (10 mmol) indol-eddiksyre, 1,15 g (10 mmol) N-hydrokxy-succinimid og 2,06 g (10 mmol) dicykloheksylkarbodiimid tilsatt til 75 ml tetrahydrofuran. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur, hvorpå det etter 5 minutter oppsto et bunnfall. Etter ca. 1,5 timer ble bunnfallet fjernet ved filtrering, filterkaken vasket med 75 ml tetrahydrofuran og luft-tørket for å gi 1,84 g. De kombinerte filtratene ble konsentrert, tatt opp i etylacetat og filtrert med påfølgende vask av filteret med etylacetat. Filtratet ble konsentrert til et skum. Skummet ble utgnidd med 75 ml dietyleter for å gi en hard gummi. Deretter ble ca. 30 ml etylacetat tilsatt, etterfulgt av etyleter. Faststoffet ble frafiltrert, vasket med dietyleter og tørket under nitrogen for

å gi 1,74 g av produktet med formel IX. Det ble funnet at ytterligere 0,47 g produkt kunne oppnås ved å behandle moderluten med petroleter.

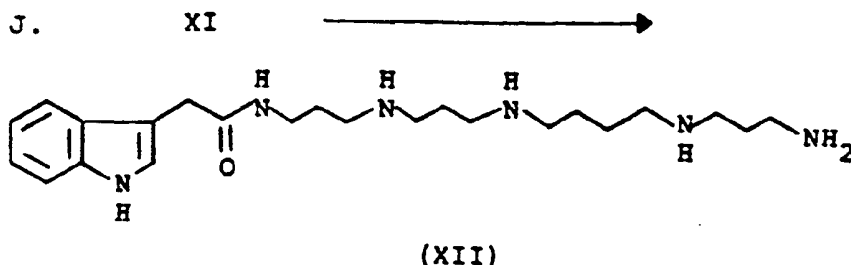


Under nitrogenatmosfære ble 0,33 g (5 mmol) av forbindelse VIII, fremstillet som beskrevet i del G ovenfor, oppløst i 10 ml diklormetan under omrøring, hvorpå 0,136 g (5 mmol) av forbindelse IX, fremstillet som beskrevet i del H ovenfor, ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Den ble deretter fortynnet til 35 ml med diklormetan, vasket med 10 ml 0,5N NaOH, tørket over  $K_2CO_3$  og konsentrert. Konsentratet ble kromatografert på silikagel ved bruk av 4:1 etylacetat/heksan. Produktholdige fraksjoner ble konsentrert for å gi 0,37 g hvitt skum som inneholdt produktet med formel X sammen med noe etylacetat.



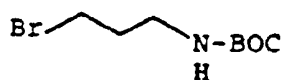
Under nitrogenatmosfære ble 0,37 g (0,45 mmol) av forbindelse X, fremstillet som beskrevet i del I ovenfor, oppløst

i 10 ml diklormetan. Deretter ble 0,218 g (1 mmol) di-t-butyl-dikarbonat tilsatt etterfulgt av 12 ml (0,1 mmol) 4-(N,N-dimetyl-amino)-pyridin. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time og fikk deretter stå over natten. Blandingen ble kromatografert på silikagel ved bruk av 4:1 etylacetat/heksan og produktholdige fraksjoner konsentrert for å gi 0,32 g av produktet med formel XI som et hvitt skum.



Under nitrogenatmosfære ble 0,32 g (0,35 mmol) av forbindelse XI, fremstillet som beskrevet i del J ovenfor, tilsatt til 15 ml trifluoreddiksyre og omrørt i 15 minutter. Reaksjonsblandingen ble deretter konsentrert i vakuum og utgidd med dietyler for å gi 0,30 g produkt som et hvitt pulver.

#### Fremstilling 4



Under nitrogenatmosfære ble 34,5 g (157,6 mmol) 3-brompropylamin.HBr i 600 ml N,N-dimetylformamid omrørt. Oppløsningen ble tilsatt 34,4 g (157,6 mmol) di-t-butyl-dikarbonat og deretter 32,3 ml (236 mmol) trietylamin. Det oppsto umiddelbart et bunnfall. Reaksjonsblandingen ble omrørt over natten. Den ble deretter fortynnet til 1,5 liter med etylacetat, vasket én gang med 500 ml 1N HCl, tre ganger med 500 ml vann, én gang med saltvann og deretter tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Etter konsentrering ble produktet kromatografert på 800 g silikagel ved bruk av 4:1 heksan/etylacetat og fraksjonene undersøkt ved TLC (KMNO<sub>4</sub>/I<sub>2</sub>).

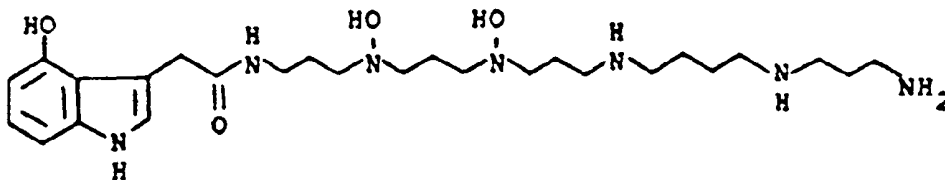
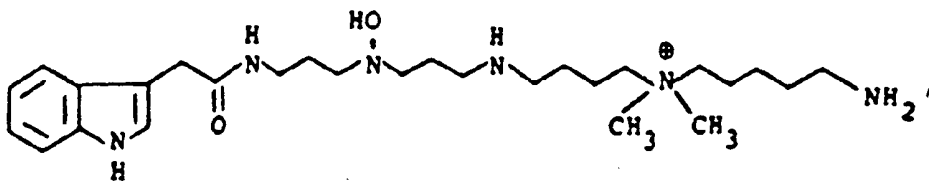
173733

28

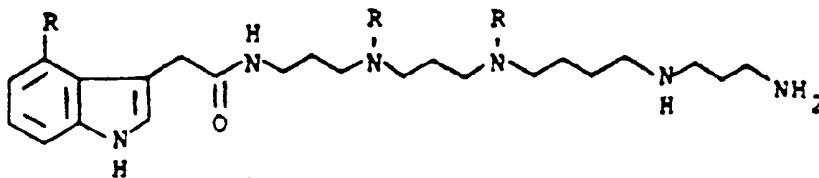
Produktholdige fraksjoner ble kombinert, konsentrert i vakuum, avdrevet to ganger med 50 ml diklormetan og satt under høyvakuum for å gi 25,8 g av tittelproduktet.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av en praktisk talt ren forbindelse valgt fra:

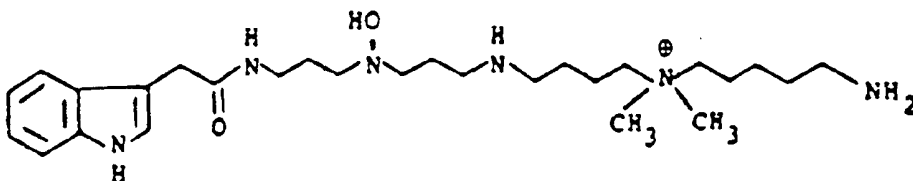


og



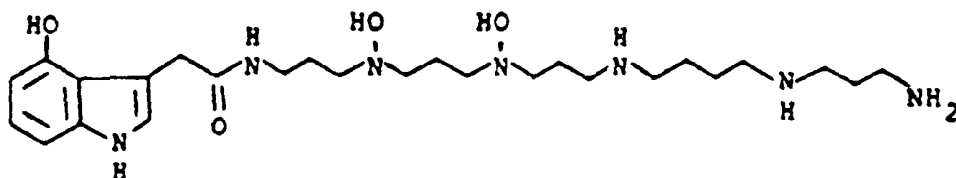
hvor R er H eller OH og farmasøytisk akseptable salter derav,  
k a r a k t e r i s e r t v e d

(a) når det ønskes en forbindelse med formel



at giftsekretet fra *Agelenopsis aperta* elueres fra en C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonne (22 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 10 µ partikkelstørrelse) ved bruk av en gjennomstrømnings-hastighet på 15 ml/min. og et oppløsningsmiddelsystem hvor det benyttes et lineært gradientprogram på 0% → 20% acetonitril, 100% → 80% 0,1% vandig trifluoreddiksyre og monokromatisk toppdeteksjon ved 220 nm, hvorunder fraksjonen som elueres ved ca. 26,0 minutter oppsamles og elueres fra en Dynamax Phenyl-kolonne (4,6 mm x 250 mm, 60 Å porestørrelse, 8 µ partikkelstørrelse) ved bruk av en strømningshastighet på 1 ml/min., og isokratiske betingelser med 10% acetonitril og 90% 0,1% vandig trifluoreddiksyre og toppdeteksjon ved 220 nm, hvorunder fraksjonen som elueres ved ca. 55,27 min., oppsamles og eventuelt lyofiliseres, resuspenderes i vann og lyofiliseres fra vann;

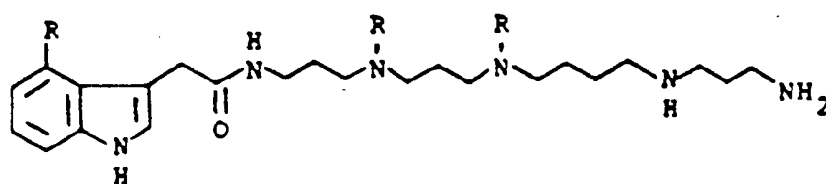
(b) når det ønskes en forbindelse med formel



at giftsekretet fra *Agelenopsis aperta* elueres fra en C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonne (22 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 10 µ partikkelstørrelse) ved bruk av en gjennomstrømnings-hastighet på 15 ml/min. og et oppløsningsmiddelsystem hvor det benyttes et lineært gradientprogram på 0% → 20% acetonitril, 100% → 80% 0,1% vandig trifluoreddiksyre og monokromatisk toppdeteksjon ved 220 nm, hvorunder fraksjonen som elueres ved ca. 22,3 minutter oppsamles og elueres fra en C-18 Baker-kolonne (4,6 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 5 µ partikkelstørrelse) ved bruk av en strømningshastighet på 1 ml/min., og isokratiske betingelser med 8% acetonitril og 92% 0,1% vandig trifluoreddiksyre og toppdeteksjon ved 220 nm, hvorunder fraksjonen som

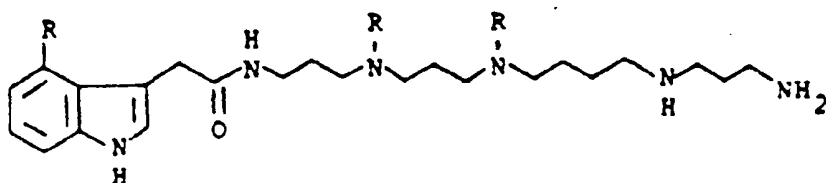
elueres ved ca. 19,5 min., oppsamles og eventuelt lyofiliseres, resuspenderes i vann og lyofiliseres fra vann;

(c) når det ønskes en forbindelse med formel

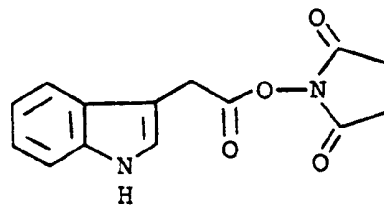


hvor hver R er OH, at giftsekretet fra *Agelenopsis aperta* elueres fra en C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonne (22 mm x 250 mm, 300 Å pore-størrelse, 10 µ partikkelstørrelse) ved bruk av en gjennomstrømningshastighet på 15 ml/min. og et oppløsningsmiddelssystem hvor det benyttes et lineært gradientprogram på 0% → 20% acetonitril, 100% → 80% 0,1% vandig trifluoreddiksyre og monokromatisk toppdeteksjon ved 220 nm, hvorunder fraksjonen som elueres ved ca. 23,1 minutter oppsamles og elueres fra en Dynamax Phenyl-kolonne (4,6 mm x 250 mm, 60 Å porestørrelse, 8 µ partikkelstørrelse) ved bruk av en strømningshastighet på 1 ml/min., og isokratiske betingelser med 10% acetonitril og 90% 0,1% vandig trifluoreddiksyre og toppdeteksjon ved 220 nm, hvorunder fraksjonen som elueres ved ca. 37,76 min., oppsamles og eventuelt lyofiliseres, resuspenderes i vann og lyofiliseres fra vann;

(d) når det ønskes en forbindelse med formel

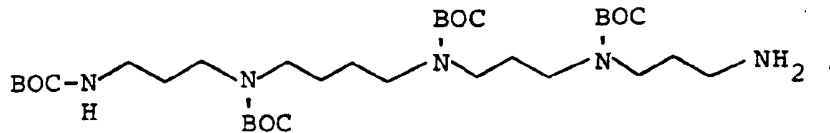


hvor hver R er H, at giftsekretet fra *Agelenopsis aperta* elueres fra en C-18 Vydac<sup>(R)</sup> kolonne (22 mm x 250 mm, 300 Å porestørrelse, 10 µ partikkelstørrelse) ved bruk av en gjennomstrømningshastighet på 15 ml/min. og et oppløsningsmiddelsystem hvor det benyttes et lineært gradientprogram på 0% → 20% acetonitril, 100% → 80% 0,1% vandig trifluoreddiksyre og monokromatisk toppdeteksjon ved 220 nm, hvorunder fraksjonen som elueres ved ca. 23,1 minutter oppsamles og elueres fra en Dynamax Phenylkolonne (4,6 mm x 250 mm, 60 Å porestørrelse, 8 µ partikkelstørrelse) ved bruk av en strømningshastighet på 1 ml/min., og isokratiske betingelser med 10% acetonitril og 90% 0,1% vandig trifluoreddiksyre og toppdeteksjon ved 220 nm, hvorunder fraksjonen som elueres ved ca. 26,47 min., oppsamles og eventuelt lyofiliseres, resuspenderes i vann og lyofiliseres fra vann, eller alternativt, en forbindelse med formel



(IX)

omsettes i et reaksjons-inert oppløsningsmiddel under inert atmosfære, med en forbindelse med formel



(VIII)

hvorpå reaksjonsproduktet omsettes under inert atmosfære med di-t-butylidikarbonat, og deretter med 4-(N,N-dimetylamino)-pyridin, hvorpå det oppnådde produkt omsettes under inert atmosfære, med trifluoreddiksyre; og forbindelsene eventuelt

173733

33

... omdannes til deres farmasøytisk akseptable salter  
etter i og for seg kjente fremgangsmåter.