



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **173548**

(13) B

(51) Int Cl⁵ C 07 H 11/04

Styret for det industrielle rettsvern

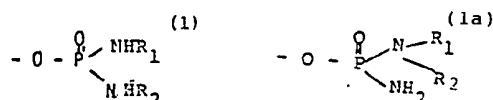
(21) Søknadsnr	902717	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	19.10.89, PCT/EP89/01251
(22) Inng. dag	19.06.90	(85) Videreføringsdag	19.06.90
(24) Løpedag	19.10.89	(30) Prioritet	20.10.88, DE, 3835772
(41) Alm. tilgj.	20.08.90		
(44) Utlegningsdato	20.09.93		

(71) Patentsøker	Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, Im Neuenheimer Feld 280, D-6900 Heidelberg, DE
(72) Oppfinner	Manfred Wiessler, Heidelberg, DE Michael Dickes, Dossenheim, DE
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte for fremstilling av teraputisk aktive glykokonjugater av fosforamidsennep eller ifosfamidsennep**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag** Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av fosforamider med generell formel (1) og (1a),



hvor i sukkerbestanddelen er bundet til fosforamid-sennepsgassfunksjonen eller fosfamidsennepsgassfunksjonen fortrinnsvis i 1-posisjonen og hvor i R_1 og R_2 er identiske eller forskjellige og kan betegne hydrogen- C_1 - C_4 -lavere-alkyl eller C_1 - C_6 -alkylhalid og hvor i sukkerbestanddelen kan foreligge i form av mono-, di- eller polysakkarider i alle eksisterende isomere og enantiomere former, ved at det beskyttende bromsukker konjugeres med de tilsvarende fosforforbindelser på en i og for seg kjent måte og at de beskyttende grupper frigjøres. Oppfinnelsen angår også D-glykopyranosyl-N,N-di(2-kloretyl) —fosforsyre-diamider og anvendelse av disse forbindelser som antitumormidler.

Kreftsykdommer befinner seg i Forbundsrepublikken Tyskland på andreplass i dødelighetsstatistikken etter hjertekarsykdommene. Til de etablerte terapier for kreftsykdommer regnes i dag ved siden av operasjon og bestråling også anti-
5 neoplastisk kjemoterapi.

Til tross for fremragende operasjonsteknikk, forbedret stråleterapi og nyutviklede kjemoterapeutika har det hittil i løpet av de siste år ikke lyktes å forbedre helbredelsesgraden for maligne tumorer, selv om det ved enkelte
10 tumortyper, som f.eks. morbus Hodgkin, er oppnådd meget gode resultater.

Det gjenstår følgelig også det ønske å muliggjøre grunnleggende forbedringer i kjemoterapien, basert på stadig voksende kunnskap om biokjemien til tumorcellene.

15 Hovedmålet for nyutvikling av antineoplastisk virkende kjemoterapeutika er forbedringen av selektiviteten og dermed en reduksjon av uønskede bivirkninger.

Riktignok er det i mellomtiden blitt kjent mange biokjemiske forskjeller mellom tumorceller og normale celler, men
20 disse forskjeller er ikke altfor signifikante.

Et flertall av de i dag anvendte stoffer disponerer derfor allerede over en viss selektivitet og følgelig en brukbar terapeutisk indeks, men allikevel er man fjernt fra en absolutt selektivitet.

25 En mulighet for å nå dette mål, er anvendelse av "prodrugs", dvs. legemidler som aktiveres spesielt på eller i målcellene, eller som spesielt sterkt detoksifiseres av ikke-målceller. Ifølge en annen anvendelsesform er det forsøkt å avstenge legemidlet på eller i målcellene, eller i det minste
30 anrike legemidlet på eller i målcellene ("Drug Targeting").

Mange planer for Drug Targeting baserer seg på en spesifikk binding av et farmasøytisk middel på målcellen eller på forskjellige opptaksmekanismer mellom ikke-målceller og målceller. Også kvantitative forskjeller kan hermed utnyttes.

35 Således er man ved hjelp av hybridiseringsteknikken (Köhler og Milstein, 1975, Nature 256, 495) i stand til å tilføre målrettede monoklonale antistoffer og ved deres hjelp å kunne gjenkjenne tumorassosierte antigener.

Glykosidesterne som skal tilføres er tilgjengelige ved hjelp av kjente metoder, spesielt gjennom den videreutviklede Koenigs-Knorr-reaksjon eller imidatmetoden.

Et sammendrag av disse metoder, så vel som av den
5 stereoselektive glykosylering, for hvilken det ifølge den i dag ønskede stereokjemi for sammenkoblingen er tilgjengelig tre grunnleggende metoder, finnes spesielt i Paulsen, 1984, Chem. Soc. Rev. 13, 15.

Det er imidlertid kjent at, til tross for de mange
10 tilgjengelige glykosyleringsmetoder, ikke alle de ønskede forbindelser kan fremstilles stereoselektivt med tilfredsstillende utbytter. Hver glykosyloverføring representerer et individuelt problem, og universelle reaksjonsbetingelser er ofte ikke angitt (Schmidt, 1986, Angew. Chem. 98, 213).

15 Foreliggende oppfinnelse angår følgelig en analogi-fremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive glykokonjugater av fosforamidsennep eller ifosfamidsennep, omfattende:

α -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyre-
20 diamid,

β -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyre-
diamid,

α -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyre-
diamid,

25 α -D-mannopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyre-
diamid,

β -D-mannopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyre-
diamid,

4-O-(β -D-galaktopyranosyl)- α -D-glukopyranosyl-N,N'-
30 di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

4-O-(β -D-galaktopyranosyl)-N,N'-di-(2-kloretyl)-fos-
forsyrediamid,

4-O-(β -D-galaktopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl-N,N'-
di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

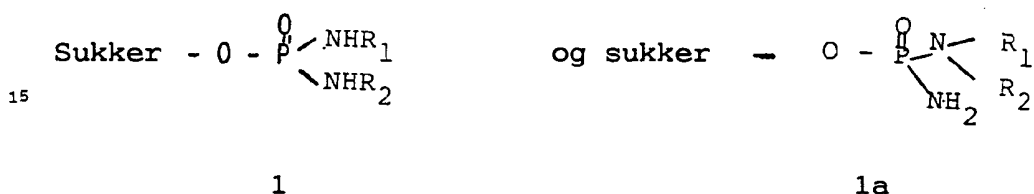
35 4-O-(β -D-glukopyranosyl)- α -D-glukopyranosyl-N,N'-di-
(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

4-O-(β -D-glukopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl-N,N'-di-
(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

som spesifikt virksomme antitumormidler til anvendelse som antineoplastiske midler hvor aktiviteten for en stor grad er opprettholdt, mens toksisiteten er sterkt nedsatt.

Analogifremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse er kjennetegnet ved at de beskyttede bromsukkerforbindelser, spesielt benzylbeskyttede bromsukkerforbindelser konjugeres med de tilsvarende fosforforbindelser, og de erholdte forbindelser befriks fra beskyttelsesgruppene.

Som typiske eksempler fremstilles ved hjelp av de angitte fremgangsmåter konjugater med de følgende generelle formler.



hvorved forbindelsen mellom sukkeret og fosforamidssenepsgass-funksjonen fortrinnsvis finner sted i 1-stillingen. Som de viktigste sukkerforbindelser skal nevnes: galaktose, mannose, glukose, mannan, galaktan, glukose, så vel som forgrenede sukkerforbindelser, spesielt i 3- og 6-posisjonen, imidlertid hvorved prinsipielt alle sukkerforbindelser, nemlig mono-, di- eller polysakkarider i alle eksisterende isomere og enantiomere former kan innføres.

R_1 og R_2 kan være like eller forskjellige og ha de følgende betydninger:

hydrogen, C_1 - C_4 -lavere-alkyl, C_1 - C_6 -halogenalkyl, fortrinnsvis C_1 - C_4 -halogenalkyl, og spesielt C_2 -halogenalkyl.

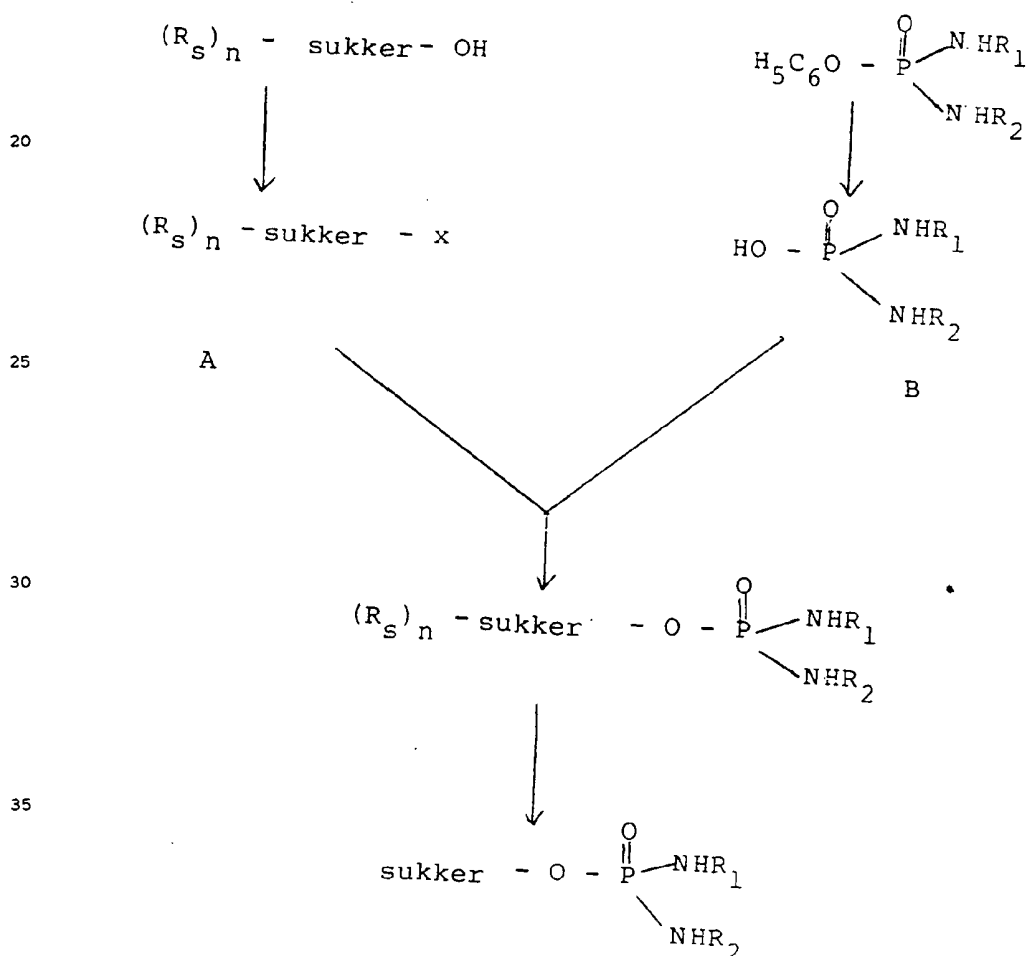
Som beskyttende grupper kan alle generelle vanlige beskyttelsesgrupper for OH-funksjoner anvendes, f.eks. benzyl-, acetyl-, tritylgrupper, og avspaltingen foregår likeledes på kjent måte - enzymatisk, hydrogenolytisk, sur eller alkalisk.

Generelt kan den ønskede og innføre glykosylkoblede fosfamidsennep og ifosfamidsennep fremstilles på følgende måte:

Fosforforbindelsene i form av sammenkoblede enheter kan fremstilles etter arbeidsskjemaet ifølge Lorenz og Wiessler, 1985, Arch. Pharm. 318, 577.

Disse to forbindelser kan eventuelt erholdes med beskyttende bromsakkarider ifølge eksemplet for forbindelsen 28 β , glukose- β -IPM, hhv. disakkaridforbindelsene 50 og 51 i overensstemmelse med arbeidsskjemaet ifølge de medfølgende figurene 1 og 2.

En beskyttet sukkerforbindelse A omsettes med en fosforsyreforbindelse B i et løsningsmiddel, fortrinnsvis et polart løsningsmiddel, f.eks. acetonitril, CH_2Cl_2 , eller toluen, i et temperaturområde fra 20°C til 120°C i et tidsrom av 1 time til 48 timer, under tilsetning av en hjelpebase, f.eks. Et_3N , $\text{Et}(\text{i-prop})_2\text{N}$. Den generelle fremgangsmåtebeskrivelse kan representeres ved hjelp av det følgende formelskjema.



Reaksjonen med ifosfamid foregår på tilsvarende måte.

R_x = en beskyttende gruppe, f.eks. benzyl,

x = en reaktiv gruppe, f.eks. brom.

Med utgangspunkt i 1-O-metylpyranosidene til glukose,
5 galaktose og mannose kan de tilsvarende 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-glukopyranosylbromider ifølge figur 1 fremstilles.

Den etterfølgende benzylering foregår på kjent måte, f.eks. i dioksan med benzylklorid under tilstedeværelse av KOH for metyl- α -D-gluko- hhv. -galaktopyranosid, mens metyl- α -D-
10 mannopyranosid omsettes i f.eks. i benzylklorid/NaH. De benzylerede metylglykosider 10, 11 og 12 hydrolyseres i tilslutning til dette f.eks. med $H_2SO_4/HOAc$ til forbindelse 13 hhv. med $HCl/HOAc$ til forbindelsene 14 og 15. Forbindelsen 13 og den isomere mannose 15 kan deretter derivatiseres, f.eks. med p-
15 nitrobenzoylklorid i diklormetan/pyridin, til de angitte 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-O-p-nitrobenzoyl-D-glukopyranoser 16 og 18, som begge lett kan renses ved omkrystallisering. Da denne rensing ikke er så godt mulig for p-nitrobenzoatet av 2,3,4,6-tetra-O-benzylgalaktose, foretrekkes i dette tilfelle
20 derivatisering med fenylisocyanat i pyridin til krystalliserbar 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-O-(N-fenyl-karbamoyl)-D-galaktopyranose 17 (Kronzer og Schuerch, 1974, Carboh. Res. 33, 273).

De benzylbeskyttede α -bromhalogenoser 19, 20 og 21 kan f.eks. dannes ved behandling av HBr i CH_2Cl_2 og innsettes i
25 den etterfølgende glykosyleringsreaksjon etter vanlig opparbeidelse, nemlig avfiltrering av p-nitrosobenzosyre hhv. anilinbromid og fjerning av overskytende HBr, uten videre rensing.

De benzylbeskyttede glykosyldonorer har nå ingen substituenter på C-2 som kan utøve en dirigerende innflytelse på glykosyleringen. De bromerte sukkerforbindelser som er forsynt med benzylbeskyttende grupper, omsettes deretter med fosforamid hhv. ifosfamid i diklormetan/trietylamin. Utbyttet av omsetningen av 16, 17 og 18 til 22, 23 og 24 er angitt i
35 tabell 1, og i tabell 1 er også angitt anomerforholdet og elueringsmidlet ved søylekromatograferingen. Atskillelsen utføres f.eks. ved hjelp av søylekromatografi.

Tabell 1

	Utbytte (%)	$\alpha:\beta$	EE:PE
22	68	56:44	60:40
23	65	50:50	60:40
24	47	55:45	80:20

Ved HPLC-analysen må det tas hensyn til den meget sterke konsentrasjonsavhengighet for retensjonstidene, og likeså den sterke tailing av konjugatene. Bestemmelsen av strukturen og stereokjemien fulgte deretter ved hjelp av ^1H - og ^{13}C -NMR-spektroskopi.

Til fremstilling av større mengder anvendes en fremgangsmåte, ved hvilken det dannes en foretrukket anomer ved hjelp av stereoselektiv syntese, noe som medfører at det kan avstås fra en HPLC-rensing.

Ifølge Schmidt, 1986, Angew. Chem. 98, 213, kan det tilsettes benzylbekyttede O-glykosyltrikloracetimidater som glykosyldonorer for stereoselektive synteser. Syntesen av trikloracetimidatene følger den beskrevne fremgangsmåte i litteraturen, med utgangspunkt i tetra-O-benzylglukosene 13, 14 og 15.

Under anvendelse av kaliumkarbonat som base erholdes fra forbindelse 13 i en kinetisk kontrollert reaksjon β -imidatet 25 β , med NaH oppnås en rask anomerisering til termodynamisk stabil 25 α . Analogt erholdes fra forbindelse 14 galaktosylimidatet 26 α , fra forbindelse 15 erholdes mannosylimidatet 27 α . Disse imidater utviser i forhold til de bromaktivererte benzyglukoser den fordel at de har høyere stabilitet; de kan lett isoleres og er lagringsstabile.

På denne måte omsettes imidatene under forskjellige reaksjonsbetingelser med IPM 4b. Som løsningsmiddel anvendes f.eks. diklormetan eller acetonitril, som katalysatorer f.eks. BF_3 .dietyleter eller HCl i diklormetan.

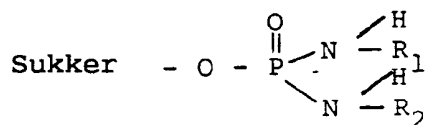
Reaksjonen foregikk hurtigere i CH_3CN enn i CH_2Cl_2 . Mannosyl-imidatet 27 α reagerte med forbindelse 4b selektivt til mannosid 24 α .

De beskyttede glykosider kan avbeskyttes, f.eks. ved hjelp av katalytisk hydrering med Pd/aktivt kull ved romtemperatur. Forløpet av hydreringen kan følges ved hjelp av tynnsjiktskromatografi. Påvisningen kan utføres ved hjelp av metanolisk svovelsyre, mer følsom er imidlertid påvisningen med 4-
 5 (p-nitrobenzyl)-pyridinreagens (NBP).

Etter avslutning av reaksjonen avfiltreres katalysatoren, filtratet sentrifugeres ned og tørkes i høyvakuum. Ved anvendelse av glykosidene 22, 23 og 24 i form av rene anomerer
 10 erholdes de beskrevne glykosider 28, 29 og 30 likeledes i form av rene anomerer (fig. 2).

De beskrevne fosforamidkonjugater, så vel som konjugatene av derivatene av formel

15



kan erholdes på den beskrevne måte.

20

En rensing av de dannede produkter i form av klare, fargeløse, høyviskøse oljer er ikke nødvendig. Skulle det imidlertid dannes biprodukter ved hydreringen, så kan disse atskilles ved hjelp av en kort søylekromatografi på kiselgel (acetonitril-/metanolblanding).

25

HPLC-analyse tillater bestemmelsen av anomerforholdene i tilfelle av glykosidet 28 og mannosidet 30.

30

35

Tabell 2

Reaksjon av trikloracetimidat med IPM

Edukt	LM	Reaksjonsbet.	Produkt	Utbytte	$\alpha:\beta$
5 <u>25α</u>	CH ₂ Cl ₂	RT, 1 d RF, 6 h	<u>22</u>	- 56 %	1:6
	CH ₃ CN	RT, 1 d RF, 6 h		lite 42 %	1:20
<u>25β</u>	CH ₂ Cl ₂	RF, 4 h		51 %	2:3
	CH ₃ CN	RF, 6 h		45 %	1:1:1
10 <u>26α</u>	CH ₂ Cl ₂	RT, 4 h RF, 8 h	<u>23</u>	- 48 %	2:5
	CH ₃ CN	RF, 6 h		42 %	1:3
<u>27α</u>	CH ₂ Cl ₂	RT, 4 h RF, 4 h	<u>24</u>	- 48 %	kun α
	CH ₃ CN	RF, 6 h		47 %	

15 RT = romtemperatur

Identiteten av forbindelsene kan fastslås ved hjelp av FAB-MS og ¹H-NMR-spektroskopi. Konfigurasjonen av sukkerresten kan dessuten bekreftes ved hjelp av enzymatiske reaksjoner. Som eksempel er det i fig. 3 angitt FAB-spektret (negativt) av Glc- β -IPM 28 β .

Under anvendelse av glyserol som matriks gav så vel negative som positive FAB-spektra vesentlige informasjonen. Fra alle seks forbindelser kunne signalene til de negative molekyltopp-ioner (M-H)⁻ hhv. de positive molekyltopp-ioner (M+H)⁺ observeres. Det fremkom iblant tre topper i et karakteristisk forhold, et fenomen som inntraff ved at molekylet inneholdt to kloratomer, klor forekommer i naturen imidlertid ikke isotoprent, men i forholdet ³⁵Cl:³⁷Cl-3:1, noe som betinger et forhold mellom isotoptoppene på tilnærmet 9:6:1. Således ble det for ionene (M+H)⁺ funnet de ventede verdier m/e = 383, 385, 387, og for (M-H)⁻ de tilsvarende verdier m/e = 381, 383 og 385. Et karakteristisk fragment, nemlig fragmentet til det alkylende aglykon IPM, ble entydig påvist ved hjelp av signalene m/e = 221, 223, 225 for (IPM+H)⁺, så vel som m/e = 219, 221 og 223 for (IPM-H)⁻; også her finnes den typiske fordeling av isotoptoppene. I avbildning 4 kan begge tripletter til ionene (M-H)⁻ og (IPM-H)⁻ fra Glc- β -IPM 28 β tydelig på-

vises. Signalene $m/e = 91$ og 183 stammer fra den anvendte glyserolmatriks.

Koordineringen av konfigurasjonen til det anomere sentrum lykkes ved hjelp av $^1\text{H-NMR}$, som ved de beskyttede eduk-
ter over de typiske koblinger til protonet H-1 og dennes kjem-
iske forskyvning; denne parameter sammenfattes i tabell 3.

Isomeren PM 4a til IPM reagerte med 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-glukopyranosid 19 og den tilsvarende mannosyldonor 21 i diklormetan/trietylamin under dannelselse av 2,3,4,6-tetra-
O-benzyl-D-glukopyranosyl-N,N-bis-(2-kloretyl)-fosforsyredi-
amid 31 hhv. til 2-epimeren 32 (fig. 4).

Tabell 3

Kjemiske forskyvninger og koblinger av de anomere protoner i
de beskyttede monosakkarid-IPM-konjugater

	δ (H-1)	$J_{1,2}$	$J_{1,P}$
<u>28α</u>	5,605	3,4	7,8
<u>28β</u>	5,004	8,0	8,0
<u>29α</u>	5,642	3,1	7,8
<u>29β</u>	4,950	8,0	8,0
<u>30α</u>	5,564	2,0	8,0
<u>30β</u>	5,282	1,1	8,6

For fremstilling av glykosyl-PM-konjugatene 5 eller 31 er enda ytterligere synteseveier mulige, som vises i figur 5. På tilsvarende måte (eksemplene 1 og 2) erholdes over hepta-O-benzylglukosene 43 og 44

	R_1	R_2
<u>43</u>	OBn	H
<u>44</u>	H	OBn

disakkarid-IPM-konjugatene 50 og 51

	R ₁	R ₂
<u>50</u>	OH	H
<u>51</u>	H	OH

Tabell 4 viser ¹H-NMR-dataene for de beskyttede disakkaridkonjugater.

	δ (H-1)	J _{1,2}	J _{1,P}	δ (H-1')	J _{1',2'}
<u>50α</u>	5,623	3,6	7,8	4,478	8,0
<u>50β</u>	5,049	8,0	8,0	4,473	8,0
<u>51α</u>	5,622	3,6	7,8	4,537	7,9
<u>51β</u>	5,044	8,0	8,0	4,532	8,0

Også her bestemmes identiteten til alle fire diastereomere forbindelser ved hjelp av 2D-NMR-COSY. Figur 6a/6b representerer 2D-spektret for de beskyttede cellobiose-IPM-konjugater 51α og 51β.

Også her ble strukturen til sukkerrestene bekreftet ved hjelp av enzymatiske reaksjoner, dvs. laktose hhv. cellobiose.

Ved oppbygging av disakkaridkoblede IPM-konjugater har anvendelsen av naturlig forekommende disakkarider, som laktose eller cellobiose, som edukt en fordel i forhold til en konjugatoppbygging av monosukker ved at glykosidbindingen mellom sukkerforbindelsene er gitt på forhånd, og dermed kan et stereoselektivt syntesetrinn innspares. Følgelig anvendes den tidligere beskrevne syntesefremgangsmåte også ved fremstillingen av disakkaridkoblede IPM-konjugater. Det behøves altså først et benzylbeskyttet disakkarid hvis 1-O-posisjon enten kan aktiveres ved hjelp av hydrogenbromid eller trikloracetonitril. Således kan det fra laktose og cellobiose, i overensstemmelse med fremgangsmåten ifølge S. Koto [Koto et al., 1982, Nihon-Kagakkai: Nihon-Kagaku-Kaishi (J. Chem. Soc. Jpn.) 10,1651] syntetiseres disakkaridbygggestenene 2,3,6-2',3',4',6'-hepta-O-benzyl-laktose og det isomere cellobiose-derivat 44 (fig. 7).

Dersom glykosidene inkuberes i HEPES eller vann med tilsvarende glykosidase, kan den raske spalting av glykosidbindingen observeres.

Konjugatene Lac-IPM 50 og Cel-IPM 51 viste seg
5 stabile i metanolisk løsning, på samme måte som monosakkarid-konjugatene 28-30, ved romtemperatur (DC-analyse). Fordi det både i forbindelse 50 og 51 foreligger to glykosidbindinger, som oppviser lik (51 β) eller forskjellig konfigurasjon (f.eks. 50 α), anvendes i tillegg til enkeltvise glykosidaser også
10 enzymblandinger til undersøkelse av den enzymatiske frigivelse av IPM. Den enzymatiske spalting av de anomer-rene konjugater 50 og 51 ble fulgt ved hjelp av tynnsjikt-skromatografi; det ble ved hjelp av NBP enten påvist intakte konjugater eller spaltingsproduktene 28 α , 28 β eller IPM.

15 Ved hjelp av tilsvarende glykosidaser ble alle konjugater hurtig spaltet, og f.eks. metabolitter med den generelle formel 1 hhv. 1a kunne frigis.

Ved disakkaridkonjugatene 50 og 51 α var spaltingen av to forskjellige glykosidbindinger nødvendig for å oppnå IPM-
20 frigivelse. Kun 51 β , som oppviser to likt konfigurerte bindinger, kunne spaltes fullstendig ved hjelp av ett enkelt enzym, nemlig β -glukosidase.

Dette ble bekreftet ved hjelp av målingen av den biologiske aktivitet, nærmere bestemt den celletoksiske aktivitet
25 *in vitro* ved undersøkelse av et retotelsarkom hos mus og brysttumorcellelinjer hos rotte, så vel som av Eb/ESb-cellelinjer.

Det ble deretter foretatt undersøkelser på P388-leukemi hos mus og på 1C32-tumor hos rotte. Resultatene av
30 undersøkelsene *in vitro* og *in vivo* er vist i figurene 8-13.

Måling av toksisitet viste at ved en intraperitoneal dose på 100 mg/kg hhv. 1000 mg/kg Glc- β -IPM til CD₂F₁-hannmus kunne ingen akutt toksisitet observeres. Disseksjon av dyrene etter 28 dager gav ingen resultater. Også BD6-rottene med
35 transplantert 1C32-tumor som ble behandlet med Gal-IPM (5-122,5 hhv. 5-245 mg/kg), gav ingen påviselig toksisitet. Disseksjonsproduktet (bl.a. lever, nyrer, milt, hjerne, benmarg) brakte ingen resultater ved den 15. dag etter innledningen av

behandlingen.

Sammenfatningsvis kan det altså konstateres at undersøkelser *in vitro* på et retotelsarkom viser celletoksisiteten av både Aglyka PM og IPM, som også av monosakkarid-IPM-konjugatene med generell formel 1 hhv. 1a, og også disakkaridkonjugatene med generell formel 1 hhv. 1a. Ved tester *in vitro* viser det seg ved brysttumorellelinjene 1C29, 1C32 og 1C39 visse graderinger, mens Gal- β -IPM bestandig er den mest virksomme forbindelse. Også ved forsøk *in vivo* ble det påvist en god virksamhet på P388-modellen og på den solide 1C32-brysttumor, og det uten akuttoksisitet. Etter at også benmargstoksisiteten, som f.eks. ble undersøkt for Glc- β -IPM, kun er meget liten, er en viktig betingelse ved utviklingen av nye antineoplastisk virksomme kjemoterapeutika oppfylt.

De følgende eksempler illustrerer spesielt fremstillingen av forskjellige eksempelvise forbindelser.

Eksempel 1

Generell arbeidsbeskrivelse for fremstilling av benzylbeskyttet glykosyl-fosforsyrediamid

Arbeidsbeskrivelse A: Aktivering ved hjelp av hydrogenbromid

4,35 mmol av en på kjent måte beskyttet p-nitrobenzylglukose (f.eks. 3,0 g 16) hhv. N-fenylkarbamoylderivatet 17 ble etter tørking over P_2O_5 løst i 10 ml absolutt CH_2Cl_2 (trehalset kolbe). Under tørt nitrogen ved $-20^\circ C$ ble 30 ml av en HBr-mettet CH_2Cl_2 -løsning langsomt innsprøytet. Etter få sekunder utfeltes p-nitrobenzosyre. Etter oppvarming ved romtemperatur (i mindre enn 30 min) ble omrøringen fortsatt i enda 1 time ved romtemperatur, og deretter ble innholdet suget over i en andre trehalset kolbe. Etter avdamping av CH_2Cl_2 (omrøring med magnetrører, vannstrålevakuum, vannbad, romtemperatur) ble det tilsatt to porsjoner à 5 ml dietyleter, og løsningen ble inndampet som beskrevet tidligere for å fjerne HBr-rester. Den erholdte gule til orangefargede olje ble løst i 20 ml CH_2Cl_2 , og 1,0 g 4a eller 4b eller 54 (4,6 mmol) og 0,85 ml trietylamin (6 mmol) ble tilsatt. Etter 3 dagers omrøring ved romtemperatur ble løsningen filtrert, vasket to ganger med et lite volum vann, den organiske fase ble tørket

over Na_2SO_4 og rotasjonskonsentrert. Deretter fulgte søylekromatografering av den nesten gule, høyviskøse olje, og det ble erholdt anrikninger av de eventuelle anomerer i tidlige hhv. sene fraksjoner. Fullstendig anomer-renhet kunne i alle
5 tilfeller oppnås ved hjelp av HPLC, i flere tilfeller også ved hjelp av krystallisering.

Alle arbeidstrinn ble gjennomført under tørt nitrogen, med tørre løsningsmidler og under utelukkelse av lys.

10 Arbeidsbeskrivelse B: Omsetning av fosforsyrediamider med glykosylimidater

1,0 mmol glykosylimidat (f.eks. 25) ble løst i 20 ml acetonitril. Etter tilsetning av 1,0 mmol fosforsyrediamid ble løsningen oppvarmet under tilbakeløpskjøling i 6 timer (ute-
15 lukkelse av lys). Etter filtrering og rotasjonsinndamping ble produktet kromatografert på kiselgel på kjent måte.

Arbeidsbeskrivelse C: Avspalting av de benzylbeskyttende grupper

20 0,1 mmol av de benzylbeskyttede monosakkaridderivater 22, 23, 24 eller 55 hhv. disakkaridkonjugatene 48 eller 49 ble løst i 15 ml MeOH. Etter tilsetning av ca. 5 mg Pd/aktivt kull (oksidert form, inneholdende 10 % Pd) pr. 0,1 mval avspaltbar benzylgruppe (dvs. f.eks. 20 mg katalysator pr. 0,1 mmol 22,
25 35 mg pr. 0,1 mmol 48) ble hydreringen fortsatt ved romtemperatur til avspaltingen av alle beskyttende grupper kunne påvises ved hjelp av analytisk tynnsjikt-kromatografi (etter 1-4 timer). Øyeblikkelig etter avbruddet av hydreringen ble det avbeskyttede produkt erholdt i ren tilstand etter filtrering
30 og rotasjonsinndamping. Ved unødig lang reaksjonstid dekomponerte det avbeskyttede glykosid, og det ble dannet IPM 4b. I dette tilfelle kunne det ønskede produkt isoleres etter søylekromatografering (kiselgel, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH} = 70:30$).

Tynnsjikt-kromatografi:

35 Kiselgel, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH} = 30:70$, R_f (28a) = 0,58,

R_f (4b) = 0,18.

Kiselgel, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 75:20:5$.

Rf-verdier: 0,44 (28 α), 0,48 (28 β)
 0,43 (29 α), 0,45 (29 β)
 0,43 (30 α), 0,41 (30 β)
 0,29 (50 og 51), 0,13 (4b).

5 Til påvisning ble produktet sprøytet med NBP-reagens (2,5 % NBP i aceton), oppvarmet til 120°C i 10 min og etter avkjøling til romtemperatur sprøytet med 0,5 M NaOH. IPM-konjugatet ble farget dyptblått, mens IPM selv ble lyseblått.

Fosforamidsennep og ifosfamidsennep ble fremstilt
 10 etter kjente arbeidsmåter beskrevet i litteraturen.

Monosakkarid-PM/IPM-konjugat

(Analog 6)

Startmateriale:

15 0,55 g 4a (2,5 mmol) (N,N-di-(2-kloretyl)-fosforsyre-diamid)
 1,03 g ABG (2,5 mmol).

Utbytte: 30 mg 5 i form av gulaktig, klar olje (2,2 % teor.),
 diastereomerblanding (A+B, s. NMR-spektrum).

20 Analyse C₁₈H₂₉Cl₂O₁₁P (551,3):

	C	H	N
beregnet:	39,24	5,30	5,08
funnet:	39,5	35,38	4,94

(med D₂O, -NH₂), 3,35-3,70 (m, 8 H, 2x -CH₂CH₂Cl),
 25 3,82 (m, 1 H, H-5), 4,148 (dd, H-6a (A), J_{5,6a} = 5,0 Hz, J_{6a,6b} = 12,5 Hz), 4,208 (dd, H-6a (B), J_{5,6a} = 4,9 Hz, J_{6a,6b} = 12,5 Hz), 4,244 (dd, H-6b (A), J_{5,6b} = 2,1 Hz, J_{6a,6b} = 12,5 Hz), 4,288 (dd, H-6b (B), J_{5,6b} = 2,1 Hz), J_{6a,6b} = 12,5 Hz), 5,02-5,12 (m, 2 H), 5,21 og
 30 5,23 (2 t, til sammen 1 H, (B+A), J = 9,5 Hz), 5,298 og 5,316 (2 t, til sammen 1 H, H-1 (A) og H-1 (B), J_{1,2} = J_{1,P} = 7,8 Hz).

MS: m/e = 331 (M-PM).

35 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid 6

Til en blanding av 1,1 g 4b (5 mmol) og 2,05 g acetobromglukose (5 mmol) i 50 ml tørt aceton ble det tildryppet 0,5 g trietylamin (5 mmol). Det ble omrørt i 48 timer ved rom-

temperatur under utelukkelse av lys. Etter filtrering og rotasjonsinndamping ble bunnfallet oppløst i CH_2Cl_2 , tilsatt et lite volum 0,1 M HCl, vasket med NaHCO_3 -løsning og vann, tørket over Na_2SO_4 og kromatografert på kiselgel (aceton:n-heksan = 40:60). Det ble erholdt 80 mg 6 (2,9 % teor.) i form av klar, fargeløs olje, som krystalliserte etter måneder ved $+4^\circ\text{C}$.
Sm.punkt: 91°C .

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, aceton:n-heksan = 1:1, $R_f = 0,13$.

10 Analyse $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{O}_{11}\text{P}$ (551,3):

	C	H	N	Cl
beregnet:	39,24	5,30	5,08	12,87
funnet:	39,42	5,40	4,80	12,58.

15 Penta-O-pivaloyl- β -D-glukose 7

(Etter Kunz og Harreus, 1982, Liebigs Ann. Chem. 41)

Startmateriale:

29 g D-glukose (0,16 mol)

121,2 g pivaloylklorid (1,0 mol)

20 200 ml kloroform, 120 ml pyridin.

Utbytte: 66 g 7 (69 % teor.).

Sm.punkt: 154°C (Lit.: 156 - 158°C).

Analyse $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_{11}$ (600,8):

	C	H
25 beregnet:	61,98	8,72
funnet:	62,16	8,79.

2,3,4,6-tetra-O-pivaloyl- α -D-glukopyranosylbromid 8

(Etter Kunz og Harreus, 1982, Liebigs Ann. Chem. 41)

30 Startmateriale:

12 g 7 (20 mmol)

20 ml HBr i iseddik (33 %)

20 ml diklormetan.

Utbytte: 6,4 g 8 (55,5 % teor.).

35 Sm.punkt: 142°C .

Analyse $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{BrO}_9$ (579,5):

	C	H
beregnet:	53,89	7,48
funnet:	54,24	7,94

($J_{2,3} = 9,5$ Hz), 5,21 og 5,64 (2 t, 2 H, $J = 9,5$ Hz, H-4 og H-3), 6,62 (d, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 4,2$ Hz).

2,3,4,6-tetra-O-pivaloyl- β -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-klor-etyl)-fosforsyrediamid 9

Til en blanding av 0,38 g 4b (1,725 mmol) og 1,0 g 8 (1,725 mmol) i 50 ml aceton ble det ved romtemperatur tilsatt 0,5 g Ag_2CO_3 (1,8 mmol). Etter 24 timers omrøring (utelukkelse av lys) ved romtemperatur ble løsningen filtrert, inndampet og kromatografert på kiselgel (aceton:n-heksan = 25:75). Det ble

erholdt 160 mg 9 (12,9 % teor.) i form av klar, fargeløs olje, som krystalliserte etter måneder ved +4°C.

Sm.punkt: 94°C.

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, aceton:n-heksan = 1:1, $R_f = 0,43$.

Analyse $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ (719,54):

	C	H	N	Cl
beregnet:	50,08	7,42	3,89	9,86
funnet:	51,35	7,98	3,24	9,36.

Metyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-glukopyranosid 10

(Etter fremgangsmåter i Carbohydrate Chemistry, 1972)

Startmateriale:

50 g metyl- α -D-glukopyranosid (257 mmol)

250 g KOH (pulverisert)

150 ml dioksan

318 ml benzyklorid (2,76 mol).

Utbytte: 116 g 10 (81,3 % teor.) som høyviskøs, gul, klar olje.

Analyse $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (554,68):

	C	H
beregnet:	75,79	6,91
funnet:	76,19	6,93.

Metyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galaktopyranosid 11

(Analog 10)

Startmateriale:

40 g metyl- α -D-galaktopyranosid (206 mmol)

200 g KOH (pulverisert)

200 ml dioksan

280 ml benzyklorid.

Utbytte: 102 g 11 (89,3 % teor.) som gul, klar olje.

Analyse $C_{35}H_{38}O_6$ (554,68):

5		C	H
	beregnet:	75,79	6,91
	funnet:	76,07	6,67.

Metyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-mannopyranosid 12

10 (Etter Koto et al., 1976)

Råutbytte: Etter vaskeprosessen dannet det seg to faser. Etter atskillelse av den øvre fargeløse fase (hvit olje) ble det erholdt 52 g gul, lett opak olje, som uten videre rensing ble omsatt til 15.

15 En del av oljen ble kromatografert (kiselgel, EE:PE = 40:60): gul, klar olje.

1H -NMR: 90 MHz, $CDCl_3$

δ = 3,31 (s, 3 H, -OMe), 3,65-4,15 (m, 6 H, sukkerprotoner), 4,43-5,10 (m, 9 H, H-1- og 4x -CH₂-Ph), 7,1-7,45 (m, 20 H, 4x -Ph).

20

2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-glukopyranose 13

(Etter fremgangsmåter i Carbohydrate Chemistry, 1982)

Startmateriale:

25 115 g 10 (207 mmol).

Utbytte: 54 g 13 (48,3 % teor.).

Sm.punkt: 152°C (omkrystallisert fra metanol).

Analyse $C_{34}H_{36}O_6$ (540,66):

30		C	H
	beregnet:	75,53	6,71
	funnet:	75,69	6,91.

2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galaktopyranose 14

(Etter Kronzer og Schuerch, 1974, Carboh. Res. 33, 273)

35 Startmateriale:

30 g 11 (54 mmol)

500 ml eddiksyre (80 %)

150 ml 1 N HCl.

Utbytte: 28,6 g 14 (98 % teor.), gul, klar olje.

¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃

δ = 3,47 (d, 1 H, utbyttbar med D₂O, -OH), 3,5-4,3 (m, 6 H, sukkerprotoner), 4,35-5,05 (m, 8 H, 4x -CH₂-Ph), 5,28 (dd, 1 H, H-1, J_{1,2} = 3,2 Hz), 7,1-7,5 (m, 20 H, 4x -Ph).

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-mannopyranose 15

50 g av blanding 12 (ca. 90 mmol, ennå inneholdende noe hvit olje) ble oppløst i 800 ml iseddik og oppvarmet til 80-85°C. I løpet av 60 min ble 120 ml 2 N HCl tildryppet; etter ytterligere 90 min ble det tilsatt 200 ml vann, blandingen ble avkjølt til romtemperatur og deretter ekstrahert med 3200 ml toluen. Den organiske fase ble vasket med mettet NaHCO₃-løsning og vann, tørket over Na₂SO₄ og rotasjonsinndampet. Den erholdte brune sirup ble kromatografert (kiselgel, EE:PE = 30:70) og gav 33,2 g 15 (68,3 % teor.) i form av gul olje.

¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃

δ = 3,5-4,3 (m, 7 H, 1 H, utbyttbar med D₂O, -OH og 6 sukkerprotoner), 4,35-5,05 (m, 8 H, 4x -CH₂-Ph), 5,22 (d, 1 H, H-1, J_{1,2} ca. 2 Hz), 7,05-7,4 (m, 20 H, 4x -Ph).

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-O-p-nitrobenzoyl-D-glukopyranose 16

(Etter fremgangsmåter i Carbohydrate Chemistry, 1972)

Startmateriale:

15,5 g 13 (28,7 mmol)

6 g p-nitrobenzoylchlorid (32,3 mmol)

3,75 ml pyridin.

Utbytte: 15,6 g 16 (78,8 % teor.) som hvitt pulver.

Sm.punkt: 93-98°C (fra etanol).

Ny omkrystallisering fra diisopropyleter gav 16a som nåler.

Sm.punkt: 122°C.

Analyse C₄₁H₃₉NO₉ (689,76):

	C	H	N
beregnet:	71,39	5,70	2,03
funnet:	71,37	5,67	2,04

(fra 16b krystallisert fra morluten).

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-O-(N-fenylkarbamoyl)-D-galakto-
pyranose 17

(Etter Kronzer og Schuerch, 1974, Carboh. Res. 33, 273)

Startmateriale:

- 5 18,7 g 14 (34,6 mmol)
 50 ml pyridin
 5,4 ml fenylisocyanat.

Utbytte: 8,0 g 17 (35 % teor.), ($\alpha:\beta$ = 35:65).

Sm.punkt: 120-122°C (fra etanol).

- 10 Analyse $C_{41}H_{41}NO_7$ (659,78):

	C	H	N
beregnet:	74,64	6,26	2,12
funnet:	74,21	5,97	2,36

fra 17a krystallisert fra morluten, sm.punkt 143°C.

15

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-O-p-nitrobenzoyl- α -D-mannopyranose 18

(Etter Koto et al., 1976, Bull. Chem. Soc. Jpn. 49, 2639)

Startmateriale:

- 9,8 g 15 (18,1 mmol)
20 4,9 g p-nitrobenzoylchlorid
 50 ml pyridin.

Utbytte: Etter flashkromatografi (kiselgel 60, EE:PE = 25:75)
krystalliserte 7,7 g 18 (61,7 % teor.) fra diisopro-
pyleter.

- 25 Sm.punkt: 105°C.

Analyse $C_{41}H_{39}NO_9$ (689,76):

	C	H	N
beregnet:	71,39	5,70	2,03
funnet:	71,46	5,58	1,90.

30

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid
22

1) etter arbeidsbeskrivelse A

Startmateriale:

- 35 3,0 g 16 (4,35 mmol)
 1,0 g 4b (4,6 mmol).

Utbytte: Etter søylekromatografi (kiselgel, EE:PE = 60:40)
2,2 g 22 (68 % teor.), anomerblanding: $\alpha:\beta$ = 5:4 (1H -
NMR).

Tynnsjiktskromatografi:

Kisegel, EE:PE = 60:40, $R_f = 0,28$, $R_f(\alpha) > R_f(\beta)$.

HPLC, analyse:

Kisegel, EE:heksan = 75:25, strømningshastighet

5 1,0 ml/min, $R_t(\alpha) = 12,53'$, $R_t(\beta) = 14,04'$.

HPLC, prep.:

Kisegel, EE:heksan:MeOH = 58:42:0,5, strømnings-

hastighet 10,0 ml/min, $R_t(\alpha) = 45'$, $R_t(\beta) = 55'$.

Analyse $C_{38}H_{45}Cl_2N_2O_7P$ (743,60):

10		C	H	N	Cl	
	beregnet:	61,38	6,10	3,77	9,54	
	funnet:	61,15	6,22	3,78	9,61	<u>22α</u>
	funnet:	60,82	6,29	3,61	9,37	<u>22β</u>

15 2) etter arbeidsbeskrivelse B

Startmateriale:

4,5 g 25 α (6,57 mmol)

1,45 g 4b (6,57 mmol).

Utbytte: Etter søylekromatografi (som ovenfor) 2,06 g 22

20 (42,2 %) teor.), anomerforhold $\alpha:\beta$ ca. 1:20) (etter 1H -NMR og HPLC).

Startmateriale:

50 mg 25 β (0,073 mmol)

16,1 mg 4b (0,073 mmol).

25 Tynnsjiktskromatografi viser et produkt med $R_f = 0,28$ og lite innhold av tetrabenzylglukose 13 så vel som lite innhold av edukt 25 β , anomerforhold $\alpha:\beta = 1:1,1$ (HPLC).

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-

30 fosforsyrediamid 23

1) etter arbeidsbeskrivelse A

Startmateriale:

2,6 g 17 (3,94 mmol)

0,9 g 4b (4,07 mmol).

35 Utbytte: Etter søylekromatografi (kiselgel, EE:PE = 60:40)

1,9 g 23 (65 % teor.), anomerblanding: $\alpha:\beta = 1:1$ (1H -NMR).

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, EE:PE = 60:40, $R_f = 0,27$, $R_f(\alpha) > R_f(\beta)$.

HPLC, analyse:

Kiselgel, EE:heksan = 75:25, strømningshastighet

5 1,0 ml/min, $R_t(\alpha) = 14,26'$, $R_t(\beta) = 18,03'$.

HPLC, prep.:

Kiselgel, EE:heksan:MeOH = 58:42:0,5, $R_t(\alpha) = 51'$, $R_t(\beta) = 62'$.Analyse $C_{38}H_{45}Cl_2N_2O_7P$ (743,60):

10		C	H	N	Cl
	beregnet:	61,38	6,10	3,77	9,54
	funnet:	61,26	6,19	3,76	9,76 <u>23α</u>
	funnet:	61,16	6,26	3,76	9,66 <u>23β</u>

15 2) etter arbeidsbeskrivelse B

Startmateriale:

685 mg 26 α (1,0 mmol)221 mg 4b (1,0 mmol).

Utbytte: I den filtrerte reaksjonsblanding utgjorde anomerfor-

20 holdet $\alpha:\beta = 55:45$ (HPLC). Etter søylekromatografi(som ovenfor) ble det erholdt 260 mg 23 (38 % teor.).2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-mannopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid 24

25 1) etter arbeidsbeskrivelse A

Startmateriale:

2,3 g 18 (3,33 mmol)0,75 g 4b (3,39 mmol).

Utbytte: Etter søylekromatografi (kiselgel, EE:PE = 80:20)

30 1,16 g 24 (47 % teor.), anomerblanding: $\alpha:\beta = 55:45$
(1H -NMR).

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, EE:PE = 60:40, $R_f(\alpha) = 0,23$, $R_f(\beta) = 0,19$.

35 HPLC, analyse:

Kiselgel, EE:heksan = 75:25, strømningshastighet

1,0 ml/min, $R_t(\alpha) = 13,05'$, $R_t(\beta) = 21,61'$.

HPLC, prep.:

Kisegel, EE:heksan:MeOH = 64:36:0,5, strømnings-
hastighet 10,0 ml/min, Rt (α) = 45', Rt (β) = 70'.

Analyse $C_{38}H_{45}Cl_2N_2O_7P$ (743,60):

5		C	H	N	
	beregnet:	61,38	6,10	3,77	
	funnet:	60,98	6,32	3,52	<u>24α</u>
	funnet:	60,98	6,19	3,29	<u>24β</u>

10 2) etter arbeidsbeskrivelse B

Startmateriale:

3,2 g 27 α (4,67 mmol)

1,04 g 4b (4,70 mmol).

Utbytte: Tynnsjiktskromatografi viser nesten kvantitativ om-
15 setning til 24 α med Rf = 0,23. I den filtrerte reaksjonsblanding befinner seg kun α -anomeren (HPLC).

Etter søylekromatografi ble det erholdt 1,6 g 24 α
(45 % teor.).

20 O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-glukopyranosyl)-trikloracetimidat 25 α

(Etter Schmidt og Stumpp, 1983, Liebigs Ann. Chem. 1249)

Startmateriale:

9,2 g 13 (17 mmol)

25 7,7 ml trikloracetonitril

680 mg NaH.

Utbytte: 10,9 g 25 α (93,6 % teor.), fargeløs, klar olje.

Tynnsjiktskromatografi:

Kisegel, PE:E = 1:1, Rf = 0,44.

30 $^1\text{H-NMR}$: 90 MHz, CDCl_3

δ = 3,6-5,1 (m, 14 H), 6,51 (d, 1 H, H-1, $J_{1,2}$ = 3,5 Hz), 6,95-7,55 (m, 20 H, 4x -Ph), 8,55 (s, 1 H, -NH-).

O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- β -D-glukopyranosyl)-trikloracetimidat 25 β

(Etter Schmidt et al., 1984, Liebigs Ann. Chem. 680)

Startmateriale:

- 5 1,3 g 13 (2,4 mmol)
 1,25 g K₂CO₃ (tørket)
 1,25 ml trikloracetonitril.

Utbytte: Etter kiselgelfiltrering: lys, gulaktig olje (1,6 g, 97 % teor., α : β = 1:5); etter søylekromatografi
10 (kiselgel, E:PE = 2:3) ble det erholdt 25 β i form av fargeløs olje (50 mg, 30 % teor.).

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, PE:E = 1:1, R_f = 0,37.

- ¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃
15 δ = 3,55-3,90 (m, 6 H), 4,40-5,05 (m, 8 H), 5,82 (d, 1 H, H-1), 7,1-7,5 (m, 20 H, 4x -Ph), 8,70 (s, 1 H, -NH-).

O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-glukopyranosyl)-trikloracetimidat

20 26

(Etter Schmidt et al., 1984, Liebigs Ann. Chem. 1343)

Startmateriale:

- 1,5 g 14 (2,77 mmol)
 1,4 ml trikloracetonitril
25 80 mg NaH.

Utbytte: Etter kiselgelfiltrering ble anomerforholdet bestemt til α : β = 4:1 (¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃, nr. H14208, δ = 5,72 (d, 0,2 H, H-1 (β), J_{1,2} = 8, 0Hz), 6,52 (d, 0,8 H, H-1 (α), J_{1,2} = 3,7 Hz), 8,51 (s, 0,8 H, -NH- (α), utbyttbar med D₂O), 8,60 (s, 0,2 H, -NH- (β), utbyttbar med D₂O). Etter søylekromatografi (kiselgel, E:PE = 1:1) ble det erholdt to fraksjoner:
30 F1: 1130 mg 26 α (59,5 % teor.) som fargeløs olje, ¹H-NMR: 500 MHz, CDCl₃, nr. H14112.
35 F2: 320 mg 26 (16,8 % teor.) som lys, gulaktig olje (α : β = 2:1), ¹H-NMR: 500 MHz, CDCl₃, nr. H14113.

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, PE:E = 1:1, R_f (α) = 0,43, R_f (β) = 0,34.

O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-trikloracetimidat 27a

(Etter Schmidt et al., 1984, Liebigs Ann. Chem. 1343)

Startmateriale:

- 5 4,5 g 15 (8,27 mmol)
 4 ml trikloracetoneitril
 45 mg NaH.

Utbytte: Etter søylekromatografi 4,45 g 27a (65 % teor.) som fargeløs olje.

10 Tynnsjiktskromatografi:

Kieselgel, E:PE = 3:2, R_f = 0,51.

¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃

δ = 3,65-5,0 (m, 14 H), 6,33 (d, 1 H, H-1, J_{1,2} ca. 1,5 Hz), 7,0-7,5 (m, 20 H, 4x -Ph), 8,52 (s, 1 H, -NH-).
 15

α -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid 28a

Hydrering av 22a etter arbeidsbeskrivelse C

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, nr. 13943

- 20 δ = 3,25-3,32 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,488 (t, 1 H, J = 9,5 Hz), 3,61-3,67 (m, 5 H med 2x -CH₂-), 3,719 (t, 1 H, J ca. 9,5 Hz), 3,75-3,90 (m, 3 H), 5,605 (dd, 1 H, H-1, J_{1,2} = 3,4 Hz, J_{1,p} = 7,8 Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 13608

- 25 positiv: m/e = 383, 385, 387 (M+H)⁺
 221, 223, 225 (IPM+H)⁺.

β -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid 28b

Hydrering av 22b etter arbeidsbeskrivelse C

30 Analyse C₁₀H₂₁Cl₂N₂O₇P (383,10):

	C	H	N
beregnet:	31,35	5,53	7,31
funnet:	31,03	5,04	6,82.

35 α -D-galaktopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid 29a

Hydrering av 23a etter arbeidsbeskrivelse C

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, nr. 13945

δ = 3,26-3,32 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,635-3,665 (m, 4 H, 2 -CH₂-), 3,74-4,05 (m, 5 H), 4,098 (m, 1 H),

5,642 (dd, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 3,1$ Hz, $J_{1,p} = 7,8$ Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 13612

positiv: m/e = 383 (M+H)⁺
221, 223, 225 (IPM+H)⁺.

5 negativ: m/e = 381, 383, 385 (M-H)⁻
219, 221, 223 (IPM-H)⁻.

β -D-galaktopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid 29 β

Hydrering av 23 β etter arbeidsbeskrivelse C

10 ¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, nr. 13946
 δ = 3,26-3,32 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,605 (d, 1 H),
3,63-3,67 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,692 (dd, 1 H, J = 3,5
og J = 10,0 Hz), 3,70-3,95 (m, 4 H), 4,950 (t, 1 H,
H-1, $J_{1,2} = J_{1,p} = 8,0$ Hz).

15 FAB-MS: Nr. MSN 13613

negativ: m/e = 381, 383, 385 (M-H)⁻
219, 221, 223 (IPM-H)⁻.

α -D-mannopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid 30 α

20 Hydrering av 24 α etter arbeidsbeskrivelse C

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, nr. 13947
 δ = 3,26-3,32 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,5-4,0 (m, 9 H med
4 H ved 3,63-3,67, 2x -CH₂-), 4,018 (dd, 1 H), 5,564
(dd, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 2,0$ Hz, $J_{1,p} = 8,0$ Hz).

25 FAB-MS: Nr. MSN 13614

negativ: m/e = 381, 383, 385 (M-H)⁻
219, 221, 223 (IPM-H)⁻.

α -D-mannopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid 30 α

30 Hydrering av 24 β etter arbeidsbeskrivelse C

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, nr. 13948
 δ = 3,26-3,33 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,45 (m, 1, H-5),
3,604 (t, 1 H, H-4, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9,8$ Hz), 3,63-3,67
(m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,703 (dd, 1 H, H-3, $J_{2,3} = 3,2$
35 Hz, $J_{3,4} = 9,8$ Hz), 3,754 (dd, 1 H, H-6a, $J_{5,6a} = 6,2$
Hz, $J_{6a,6b}$ ca. 12,5 Hz), 3,931 (dd, 1 H, H-6b, $J_{5,6b} =$
2,1 Hz, $J_{6a,6b}$ ca. 12,5 Hz), 4,052 (dd, 1 H, H-2, $J_{1,2}$
ca. 1,1 Hz, $J_{2,3} = 3,2$ Hz), 5,282 (dd, 1 H, H-1, $J_{1,2}$
ca. 1,1 Hz, $J_{1,p} = 8,6$ Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 13615

negativ: m/e = 381, 383, 385 (M-H)⁻
219, 221, 223 (IPM-H)⁻.

5 Di-(2-kloretyl)-fosforsyreamid-diklorid 33

(Etter Friedman og Seligman, 1954, J. Am. Chem. Soc. 76, 655)

Startmateriale:

130 ml POCl₃ (1,4 mol)

50 g bis-(2-kloretyl)-amin-hydroklorid.

10 Utbytte: 53 g 33 som hvite krystaller.

Sm.punkt: 54°C (fra aceton/PE).

Analyse C₄H₈Cl₄NOP (258,9):

	C	H	N	Cl
beregnet:	18,56	3,11	5,41	54,77
15 funnet:	39,53	5,38	4,94	54,90.

Eksempel 2

Disakkarid-IPM-konjugat

Okta-O-acetyl-laktose 35

20 En blanding av 100 g laktose (147 mmol), 400 ml acetanhydrid og 25 g vannfritt natriumacetat ble omrørt i 60 min. ved 120-135°C. Etter avkjøling ble blandingen helt over i isvann og ekstrahert med CH₂Cl₂. Den organiske fase ble vasket med mettet NaHCO₃-løsning og vann, tørket over Na₂SO₄ og rotasjonsinndampet. Krystallisering fra etanol gav 153 g 35 (80 % teor.).

Sm.punkt: 79-92°C.

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, toluen:2-butanon = 10:4, R_f = 0,43.

30 Analyse C₂₈H₃₀O₁₉ (678,6):

	C	H
beregnet:	49,56	5,64
funnet:	49,37	5,80.

35 Allyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl-D-glukopyranosid 37

(Etter Koto et al., 1982, J. Chem. Soc. Jpn. 10, 1651)

34 g 35 (50 mmol) ble løst i 60 ml CHCl₃. 20,6 ml acetyl-bromid (276 mmol) og 4,56 ml H₂O ble tilsatt ved 0°C.

Etter 2,5 timers omrøring ved romtemperatur ble den gule, klare løsning rotasjonsinndampet ved 30°C, og det ble erholdt et gult skum (hepta-O-acetyl- α -D-laktosylbromid) med

$^1\text{H-NMR}$: 90 MHz, CDCl_3

5 $\delta = 1,95\text{--}2,20$ (m, 21 H, 7x -OAc), 3,7–5,65 (m, 13 H, sukkerprotoner), 6,51 (d, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 4$ Hz).

Skummet ble løst i 400 ml allylalkohol ved 35°C.

Etter tilsetning av 30 g sølvkarbonat ble blandingen omrørt i én dag ved romtemperatur (utelukkelse av lys), deretter ble

10 blandingen filtrert og rotasjonsinndampet. Bunnfallet ble ekstrahert med eter, og etter ny filtrering og rotasjonsinndamping ble produktet kromatografert på kiselgel 60 (toluen:2-butanon = 10:1 $\rightarrow$ 10:3). Det ble erholdt 18,2 g 37 (53,8 % teor.) i form av klar olje.

15

Allyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl-D-glukopyranosid 38

(Analog 37)

Startmateriale:

20 29 g α -D-cellobiose-oktaacetat (42,6 mmol) (Egakkjemi)

17,6 ml acetylbromid

3,9 ml H_2O .

Mellomprodukt:

25 Hepta-O-acetyl- α -D-cellobiosylbromid.

$^1\text{H-NMR}$: 90 MHz, CDCl_3

$\delta = 6,51$ (d, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 4$ Hz).

Utbytte: Etter søylekromatografi (kiselgel, EE:PE) og krystallisering fra diisopropyleter ble det erholdt 16,5 g

30 38 (57 % teor.).

Sm.punkt: 179°C.

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, toluen:2-butanon = 10:4, $R_f = 0,49$.

Analyse $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_{18}$ (679,62):

35

	C	H
beregnet:	51,48	5,96
funnet:	51,45	6,07.

Allyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-galaktopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-D-glukopyranosid 39

(Etter Koto et al., 1982, J. Chem. Soc. Jpn. 10, 1651)

Startmateriale:

5 19,5 g 37 (28,8 mmol)
 800 ml benzylklorid
 105 g KOH, pulverisert.

Utbytte: Etter søylekromatografi (kiselgel, toluen:2-butanon =
 100:1 → 10:1 og krystallisering fra EE/heksan ble det
10 erholdt 21,3 g 39 (73 % teor.) i form av nåler.

Tynnsjiktskromatografi:

 Kiselgel, toluen:2-butanon = 10:1, R_f = 0,50.

Sm.punkt: 73°C.

Analyse C₆₄H₆₈O₁₁ (1013,24):

15		C	H
	beregnet:	75,87	6,76
	funnet:	75,66	6,63.

Allyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-glukopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-D-glukopyranosid 40

20

(Analog 39)

Startmateriale:

 2,65 g 38 (3,92 mmol)
 100 ml benzylklorid
25 14,3 g KOH, pulverisert.

Utbytte: Etter søylekromatografi og krystallisering fra
 diisopropyleter/heksan ble det erholdt 2,82 g 40
 (71 % teor.).

Tynnsjiktskromatografi:

30 Kiselgel, toluen:2-butanon = 10:1, R_f = 0,50.

Sm.punkt: 102°C.

Analyse C₆₄H₆₈O₁₁ (1013,24):

35		C	H
	beregnet:	75,87	6,76
	funnet:	76,17	6,57.

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-galaktopyranosyl)-2,3,4-tri-O-benzyl-D-glukopyranose 43

A) Isomerisering med t-BuOK til 1-propenyleter 41

En blanding av 4,9 g 39 (4,84 mmol) og 1,3 g t-BuOK i
 5 30 ml DMSO ble omrørt under nitrogen i 2 timer ved 110°C. DMSO
 ble rotasjonsavdampet, bunnfallet ble løst i en blanding av
 eter/vann. Eterfasen ble fjernet, den vandige fase ble der-
 etter ekstrahert to ganger med eter. De forente eterfaser ble
 tørket over Na₂SO₄ og rotasjonsinndampet. Det ble erholdt
 10 4,02 g 41 (4,13 mmol) i form av brun olje (råutbytte 85 %).

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, toluen:2-butanon = 10:1, R_f = 0,62.

B) Hydrolyse av 1-propenyleteren 41 med HgCl₂ til 43
 (etter Gigg og Warren, 1968, J. Chem. Soc. (C), 1903)

15 Til en blanding av 4,02 g 41 (4,13 mmol) og 1130 mg
 HgO i 10 ml aceton/vann (10:1) ble det i løpet av 5 min til-
 dryppet 1150 mg HgCl₂ i 10 ml aceton/vann (10:1). Etter 1 times
 omrøring ved romtemperatur ble blandingen filtrert gjennom
 "Celite", rotasjonsinndampet og tilsatt eter. Eterfasen ble
 20 vasket med 10 ml av en halvmettet KJ-løsning og med vann.
 Etter tørking over Na₂SO₄ og rotasjonsinndamping ble produktet
 kromatografert på kiselgel (toluen:2-butanon = 100:1 → 10:5).
 Det ble erholdt 43 i form av gul olje, som krystalliserte fra
 eter/PE: 2,6 g (55 % teor. i forhold til 39, anomerblanding,
 25 α:β tilnærmet 2:1 etter ¹³C-NMR).

Sm.punkt: 103°C.

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, toluen:2-butanon = 10:1, R_f = 0,22.

Analyse C₆₁H₆₄O₁₁ (973,17):

	C	H
beregnet:	75,29	6,63
funnet:	74,79	6,65.

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-glukopyranosyl)-2,3,4-tri-O-benzyl-D-glukopyranose 44

1) analog 43: Isomerisering med t-BuOK til 1-propenyleter 42
 etterfulgt av hydrolyse med HgCl₂.

Utbytte: 47,7 % teor. (etter søylekromatografi).

2) Isomerisering med tris(trifenylfosfin)rhodiumklorid ($\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$) etterfulgt av hydrolyse med 1 N HCl (etter Corey og Suggs, 1973, J. Org. Chem. 38, 3224)

125 mg 40 (0,123 mmol) ble kokt i 3 timer i 30 ml Et-OH/vann (10:1) med 3 mg diazabicyklo[2.2.2]oktan (0,027 mmol) og 12 mg $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ (0,009 mmol). Deretter ble 6 ml 1 N HCl tilsatt, og blandingen ble kokt i ytterligere 2 timer. Etter avkjøling ble blandingen tilsatt NaHCO_3 -løsning og ekstrahert med eter. Den organiske fase ble vasket med vann, tørket over Na_2SO_4 og rotasjonsinndampet. Etter søylekromatografering (kiselgel, toluen:2-butanon = 100:1 $\rightarrow$ 100:5) ble det erholdt 109 mg 44 (91 % teor. i forhold til 40, anomerblanding, $\alpha:\beta$ tilnærmet 3:1 etter ^{13}C -NMR) i form av fargeløs olje.

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, toluen:2-butanon = 10:1, R_f = 0,22.

^1H -NMR: 90 MHz, CDCl_3

δ = 3,05 og 3,25 (2 d, 1 H, -OH (α og β), utbyttbar med D_2O), 3,3-5,2 (m, 28 H), 7,1-7,5 (m, 35 H, 7x -Ph).

^{13}C -NMR: Nr. C14897, CDCl_3

δ = 91,38 (s, C-1 α), 97,42 (s, C-1 β), 102,68 (s, C-1').

FAB-MS: Nr. 13689 (pos., glyserol, DMF/HCl)

m/e = 973 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- β -D-galaktopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-1-O-p-nitrobenzoyl-D-glukopyranose 45

Til 480 mg 43 (0,49 mmol) i 20 ml CH_2Cl_2 ble 2 ml av en løsning av 130 mg p-nitrobenzoylklorid og 0,3 ml pyridin i CH_2Cl_2 tildryppet ved romtemperatur. Etter 20 timer omrøring ved romtemperatur ble det etter tynnsjiktskromatografering på kiselgel (toluen:2-butanon = 10:1) påvist en meget liten mengde 43 (R_f = 0,22) og to produkter med R_f = 0,42 og 0,49. Etter vasking med 0,5 N HCl, 1 N NaHCO_3 og vann og tørking over Na_2SO_4 ble det erholdt en høyviskøs olje. Fra etanol krystalliserte 435 mg 45 (79 % teor., anomerblanding, $\alpha:\beta$ = 3:7 etter ^1H -NMR).

Sm.punkt: 112°C.

Analyse $\text{C}_{68}\text{H}_{67}\text{O}_{14}\text{N}$ (1122,28):

	C	H	N
beregnet:	72,77	6,02	1,25
funnet:	73,05	6,25	1,11.

5 4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-glukopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-1-O-p-nitrobenzoyl-D-glukopyranose 46

(Analog 45)

Startmateriale:

520 mg 44 (0,534 mmol)

10 150 mg p-nitrobenzoylchlorid

0,4 ml pyridin.

Utbytte: Etter 20 timer viste tynnsjiktskromatografering

(kiselgel, toluen:2-butanon = 10:1) to produkter med
Rf = 0,43 og 0,49 blant en meget liten mengde edukt

15 med Rf = 0,22. Etter søylekromatografering (kiselgel, toluen:2-butanon = 20:1) ble det erholdt 320 mg 46 i form av olje (53,4 % teor.). Fra diisopropyleter krystalliserte 46a.

Sm.punkt: 169°C.

20 Analyse C₆₈H₆₇O₁₄N (1122,28):

	C	H	N
beregnet:	72,77	6,02	1,25
funnet:	72,70	6,01	1,07.

25 O-[4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-glukopyranosyl)-2,4,6-tri-O-benzyl-α-D-glukopyranosyl]-trikloracetimidat 47

(Analog 25a)

Startmateriale:

130 mg 44 (0,133 mmol)

30 60 µl trikloracetoneitril

5,3 mg NaH.

Utbytte: Etter søylekromatografi (kiselgel, E:PE = 2:3) ble det erholdt 120 mg 47 (80 % teor.) som klar, fargeløs olje.

35 Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, E:PE = 3,2, Rf = 0,49.

¹H-NMR: 90 MHz, CDCl₃

δ = 3,3-5,2 (m, 27 H), 6,44 (d, 1 H, H-1, J_{1,2} = 4 Hz), 7,1-7,4 (m, 35 H, 7x -Ph), 8,57 (s, 1 H, -NH-,

utbyttbar med D₂O).

C₆₃H₆₄Cl₃NO₁₁ (1117,56).

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-galaktopyranosyl)-2,3,6-tri-O-
5 benzyl-D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid
48

Etter arbeidsbeskrivelse A

Startmateriale:

100 mg 45 (0,089 mmol)

10 21 mg 4b (0,095 mmol).

Utbytte: Etter søylekromatografi (kiselgel, EE:PE = 40:60 →
70:30) ble det erholdt to fraksjoner:

F1: 7 mg 48, β>>α (6,7 % teor.)

F2: 40 mg 48, α>>β (38,2 % teor.).

15 Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, EE/PE = 80:20, R_f (α) = 0,37, R_f (β) =
0,42.

C₆₅H₇₃Cl₂N₂O₁₂P (1176,18).

¹H-NMR: Nr. H15189, 90 MHz, CDCl₃, α>>β

20 Nr. H15326, 90 MHz, CDCl₃, β>>α.

HPLC, analyse:

Kiselgel, EE:heksan:MeOH = 72:28:0,7, strømnings-
hastighet 1,0 ml/min, R_t (α) = 10,32', R_t (β) =
8,73'.

25 HPLC, prep.:

Kiselgel, EE:heksan:MeOH = 64:36:0,5, strømnings-
hastighet 10,0 ml/min, R_t (α) = 35', R_t (β) = 27'.

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-glukopyranosyl)-2,3,6-tri-O-
30 benzyl-D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid
49

Etter arbeidsbeskrivelse B

Startmateriale:

40 mg 47 (0,036 mmol)

35 9 mg 4b (0,041 mmol).

Utbytte: Etter søylekromatografi (kiselgel, EE:PE = 60:40) og
prep. HPLC ble det erholdt to fraksjoner (klar,
fargeløs olje):

F1: 18 mg 49β (42,5 % teor.)

F2: 7 mg 49α (10,9 % teor.).

Tynnsjiktskromatografi:

Kiselgel, EE/PE = 80:20, Rf (α) = 0,35, Rf (β) =
5 0,42.

$C_{65}H_{73}Cl_2N_2O_{12}P$ (1176,18).

HPLC, analyse:

Kiselgel, EE:heksan:MeOH = 72:28:1, strømningshastig-
het 1,0 ml/min, Rt (α) = 7,03', Rt (β) = 5,89'.

10 HPLC, prep.:

Kiselgel, EE:heksan:MeOH = 64:36:0,5, strømnings-
hastighet 10,0 ml/min, Rt (α) = 35', Rt (β) = 25'.

15 4-O-(β-D-galaktopyranosyl)-α-D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-klor-
etyl)-fosforsyrediamid 50α

Hydrering av 48α etter arbeidsbeskrivelse C

$C_{16}H_{31}Cl_2N_2O_{12}P$ (541,31).

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, nr. H15701

20 δ = 3,27-3,34 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,563 (dd, 1 H, H-
2', J_{1',2'} = 8,0 Hz, J_{2',3'} = 9,8 Hz), 3,65-4,0 (m, 15 H
med 4 H ved 3,65-3,68, 2x -CH₂-), 4,478 (d, 1 H, H-
1', J_{1',2'} = 8,0 Hz), 5,623 (dd, 1 H, H-1, J_{1,2} = 3,6
Hz, J_{1,P} = 7,8 Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 14075

25 positiv: m/e = 221, 223, 225 (IPM+H)⁺
545, 547, 549 (M+H)⁺.

4-O-(β-D-galaktopyranosyl)-β-D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-klor-
etyl)-fosforsyrediamid 50β

30 Hydrering av 48β etter arbeidsbeskrivelse C

$C_{16}H_{31}Cl_2N_2O_{12}P$ (541,31).

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, ¹H-¹H-2D-COSY, nr. 15834

35 δ = 3,27-3,34 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,43 (dd, 1 H, H-2,
J_{1',2'} = 8,0 Hz), 3,558 (dd, 1 H, H-2', J_{1',2'} = 8,0 Hz,
J_{2',3'} = 10,0 Hz), 3,65-3,68 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,68-
3,90 (m, 8 H), 3,938 (dd, 1 H, J = 3,4 og J ca. 1,0
Hz), 3,989 (dd, 1 H, J = 1,9 og J = 12,6 Hz), 4,473
(d, 1 H, H-1', J_{1',2'} = 8,0 Hz), 5,049 (t, 1 H, H-1,
J_{1,2} = J_{1,P} = 8,0 Hz).

FAB-MS: Nr. MSN 14076

positiv: m/e = 221, 223, 225 (IPM+H)⁺
545, 547, 549 (M+H)⁺.

5 4-O-(β-D-glukopyranosyl)-α-D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-klor-etyl)-fosforsyrediamid 51α

Hydrering av 49α etter arbeidsbeskrivelse C

C₁₆H₃₁Cl₂N₂O₁₂P (541,31).

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, ¹H-¹H-2D-COSY, nr. 15856

10 δ = 3,27-3,32 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,333 (dd, 1 H, H-2', J_{1',2'} = 7,9 Hz, J_{2',3'} = 9,4 Hz), 3,40-3,45 (m, 2 H), 3,64-3,68 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,69 (dd, 1 H, H-2) 3,70-3,99 (m, 6 H), 4,537 (d, 1 H, H-1', J_{1',2'} = 7,9 Hz), 5,622 (dd, 1 H, H-1, J_{1,2} = 3,6 Hz, J_{1,P} = 7,8 Hz).

15 FAB-MS: Nr. MSN 14077

positiv: m/e = 221, 223, 225 (IPM+H)⁺
545, 547 (M+H)⁺.

20 4-O-(β-D-glukopyranosyl)-β-D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-klor-etyl)-fosforsyrediamid 51β

Hydrering av 49β etter arbeidsbeskrivelse C

C₁₆H₃₁Cl₂N₂O₁₂P (541,31).

¹H-NMR: 500 MHz, D₂O, ¹H-¹H-2D-COSY, nr. 15857

25 δ = 3,27-3,32 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,33 (dd, 1 H, H-2', J_{1',2'} = 8,0 Hz, J_{2',3'} ca. 10 Hz), 3,428 (dd, 1 H, H-2, J_{1,2} = 8,0 Hz, J_{2,3} = 10,0 Hz), 3,44-3,54 (m, 3 H), 3,64-3,68 (m, 4 H, 2x -CH₂-), 3,69-3,72 (m, 3 H), 3,745 (dd, 1 H, H-6'a, J_{5',6'a} = 5,8 Hz, J_{6'a,6'b} = 12,3 Hz), 3,855 (m, 1 H, H-6b), 3,928 (dd, 1 H, H-6'b, J_{5',6'b} = 2,1 Hz, J_{6'a,6'b} ca. 12,3 Hz), 3,990 (dd, 1 H, H-6a, J_{5,6a} = 2,0 Hz, J_{6a,6b} = 12,2 Hz), 4,532 (d, 1 H, H-1', J_{1',2'} = 8,0 Hz), 5,044 (t, 1 H, H-1, J_{1,2} = J_{1,P} = 8,0 Hz).

35 FAB-MS: Nr. MSN 14078

positiv: m/e = 221, 223, 225 (IPM+H)⁺
545, 547, 549 (M+H)⁺.

Eksempel 3

Maltotriose peracetyleres (natriumacetat/acetanhydrid), ($R_f = 0,48$, CHCl_3 /eddikester 1:1, kiselgel), produktet omsettes med HBr /iseddik ved 0°C til 1-bromidet ($R_f = 0,58$, samme betingelser som ovenfor); produktet omsettes med allylalkohol/ Ag_2CO_3 til 1-alkyl-maltotriosidet ($R_f = 0,60$, samme betingelser som ovenfor). Produktet omsettes med benzoylklorid/ KOH ved 120°C til alkyl-2,3,6,2',3',6',2'',3'',4'',6''-deka-O-benzyl-maltotriosid ($R_f = 0,51$, toluen/eddikester 10:1, kiselgel). Etter isomerisering av dette produkt til enoleter, forsåpning til 1-OH-forbindelse med 1 N HCl ($R_f = 0,17$, toluen/eddikester 10:1, kiselgel). Fra dette produkt dannes trikloracetimidat ved omsetning med NaH og trikloracetonitril ($R_f = 0,48$, samme betingelser som ovenfor). Produktet omsettes i acetonitril med ifosfamid-sennep under tilbakeløpskjøling til glykokonjugatet ($R_f = 0,24$, eddikester/heksan 6:4, kiselgel). Benzylgruppene avspaltes ved hydrering med 10 %-ig Pd /aktivt kull i CH_3OH ved romtemperatur ($R_f = 0,22$, CHCl_3 /metanol 1:1, kiselgel).

20

25

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive glykokonjugater av fosforamid-sennep eller ifosamid-sennep, omfattende:

30 α -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyredi-amid,

β -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyredi-amid,

35 α -D-glukopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyredi-amid,

α -D-mannopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

β -D-mannopyranosyl-N,N'-di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

4-O-(β -D-galaktopyranosyl)- α -D-glukopyranosyl-N,N'-
di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

4-O-(β -D-galaktopyranosyl)-N,N'-di-(2-kloretyl)-fos-
forsyrediamid,

5 4-O-(β -D-galaktopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl-N,N'-
di-(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

4-O-(β -D-glukopyranosyl)- α -D-glukopyranosyl-N,N'-di-
(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

10 4-O-(β -D-glukopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl-N,N'-di-
(2-kloretyl)-fosforsyrediamid,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e beskyttede brom-
sukkerforbindelser, spesielt benzylbeskyttede bromsukker-
forbindelser konjugeres med de tilsvarende fosforforbindelser,
og de erholdte forbindelser befris fra beskyttelsesgruppene.

15

20

25

30

35

Fig.1 - Syntese av benzylerede bromglukoser

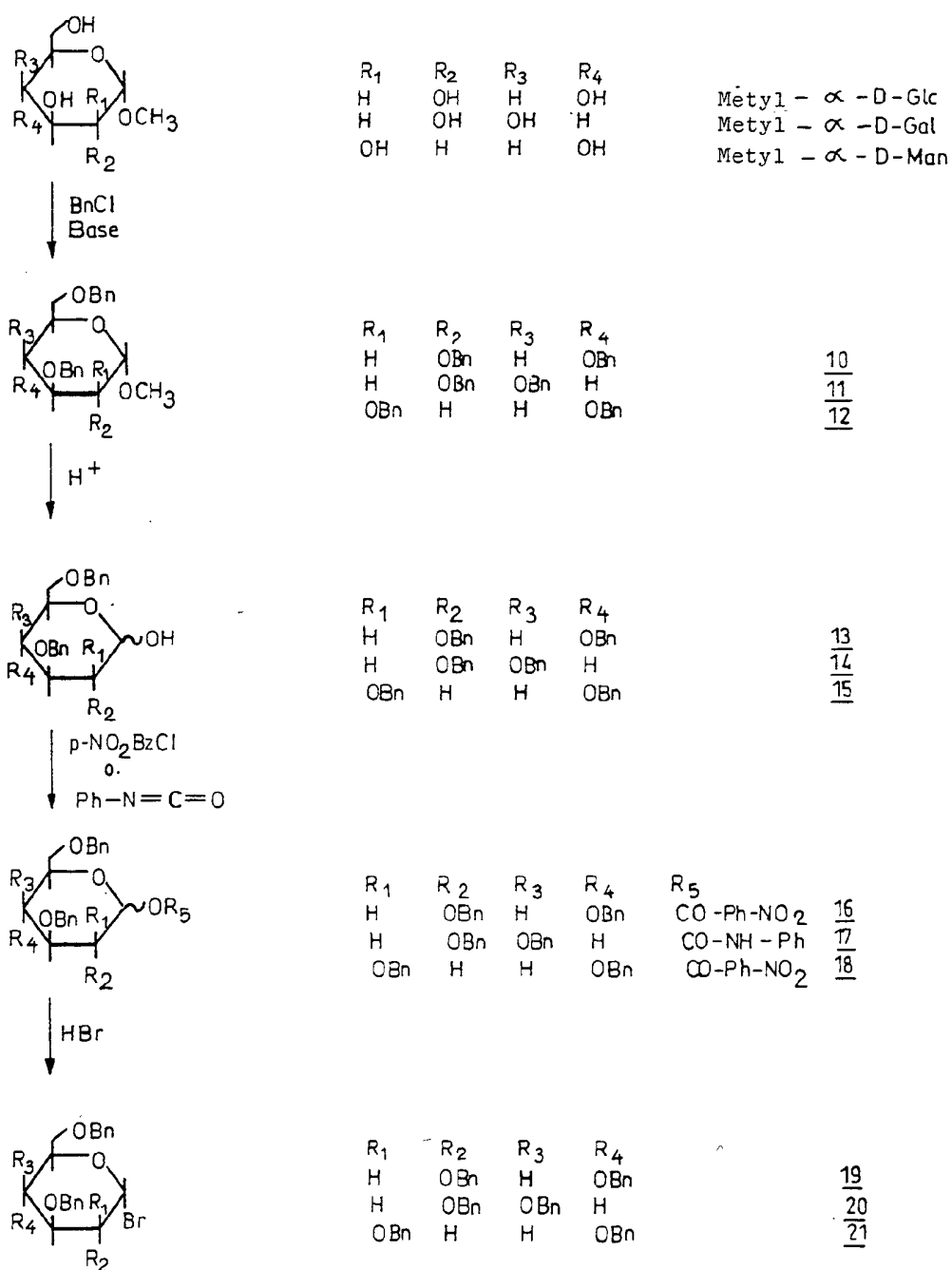
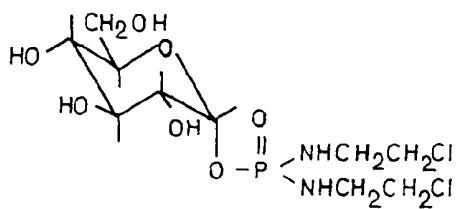
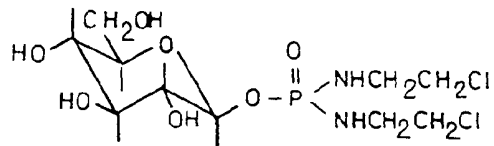


Fig. 2. - 6 beskyttede diastereomere
Glukosyl -IPM-konjugater



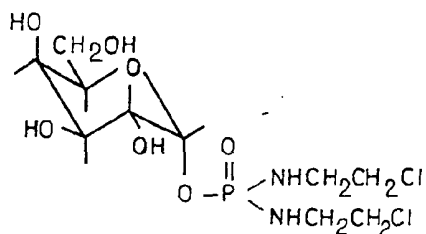
28α

Glc-α-IPM



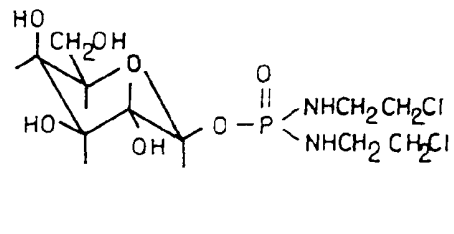
28β

Glc-β-IPM



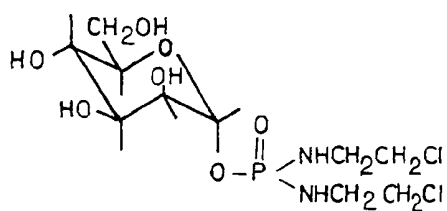
29α

Gal-α-IPM



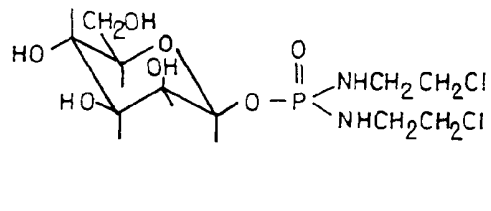
29β

Gal-β-IPM



30α

Man-α-IPM



30β

Man-β-IPM

173548

3/15

Fig. 3

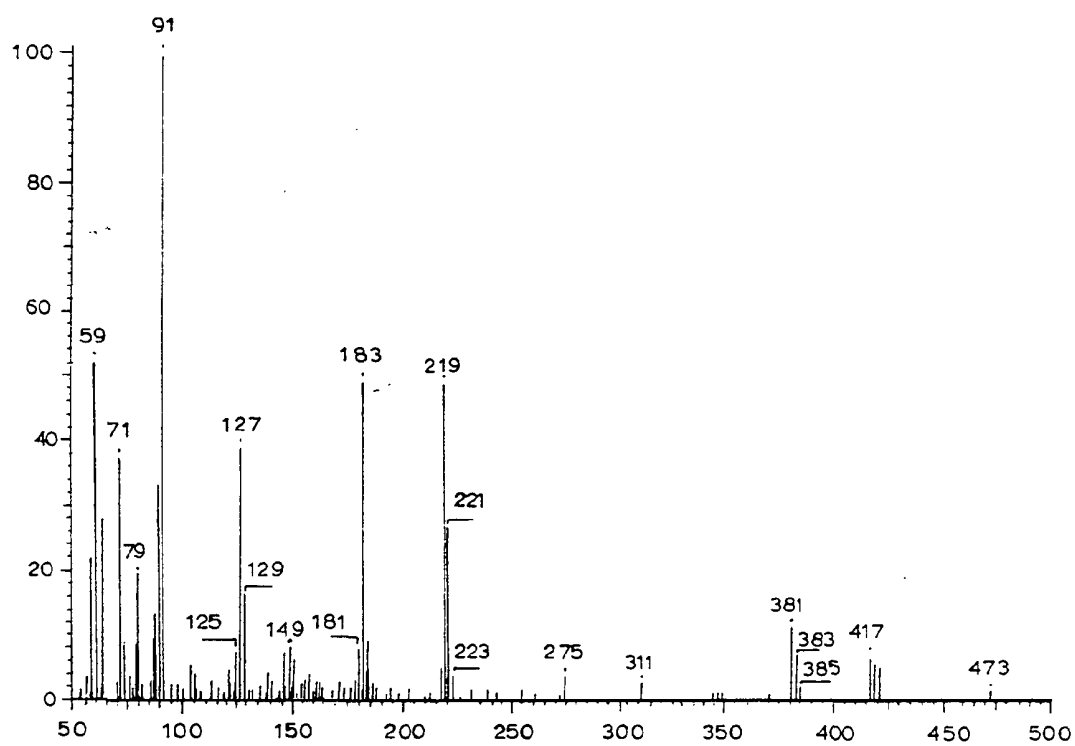


Fig. 4 Glykosylering av PM 4a

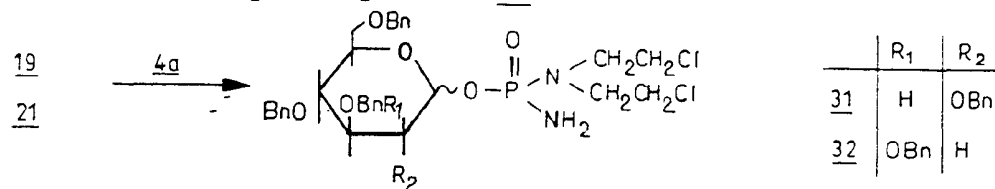
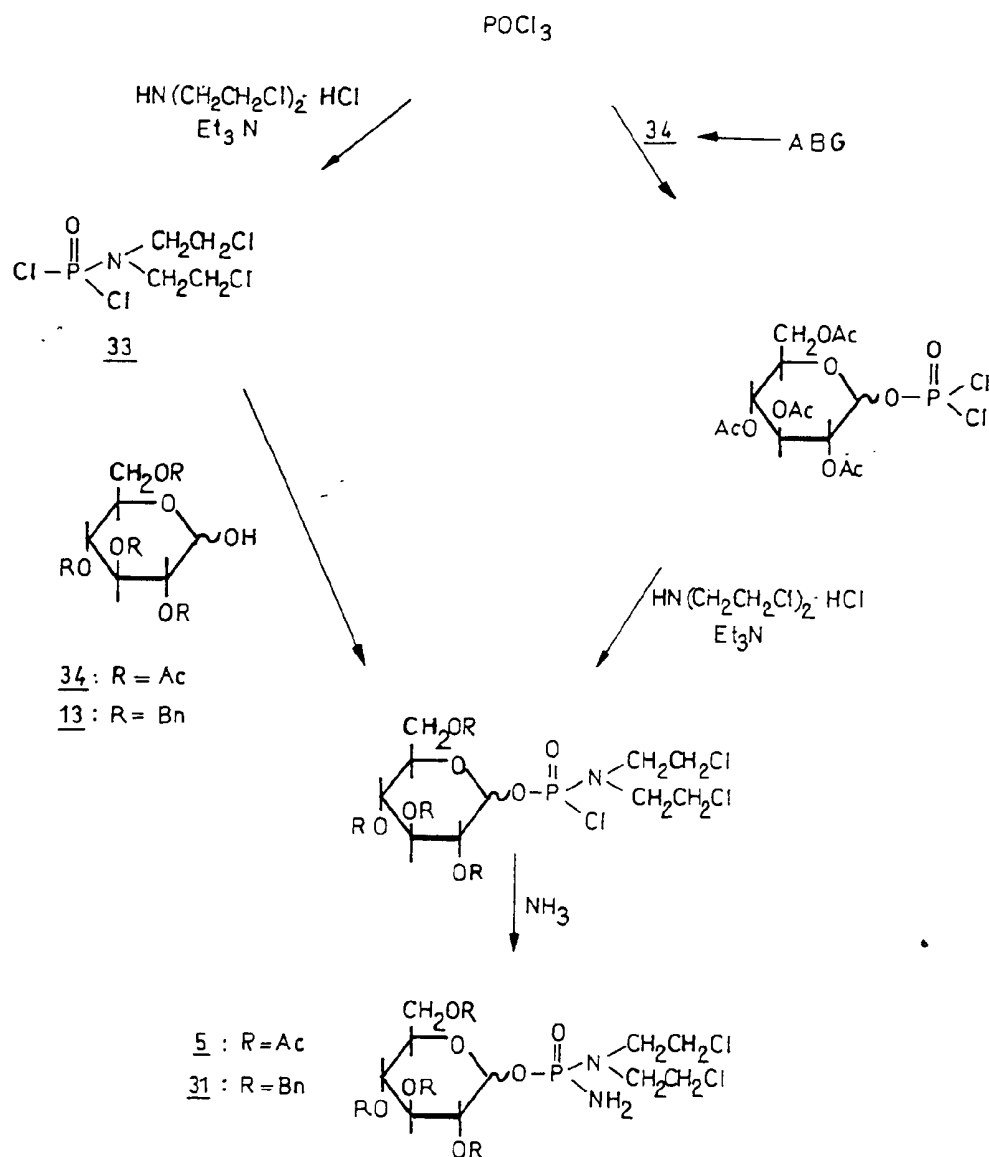


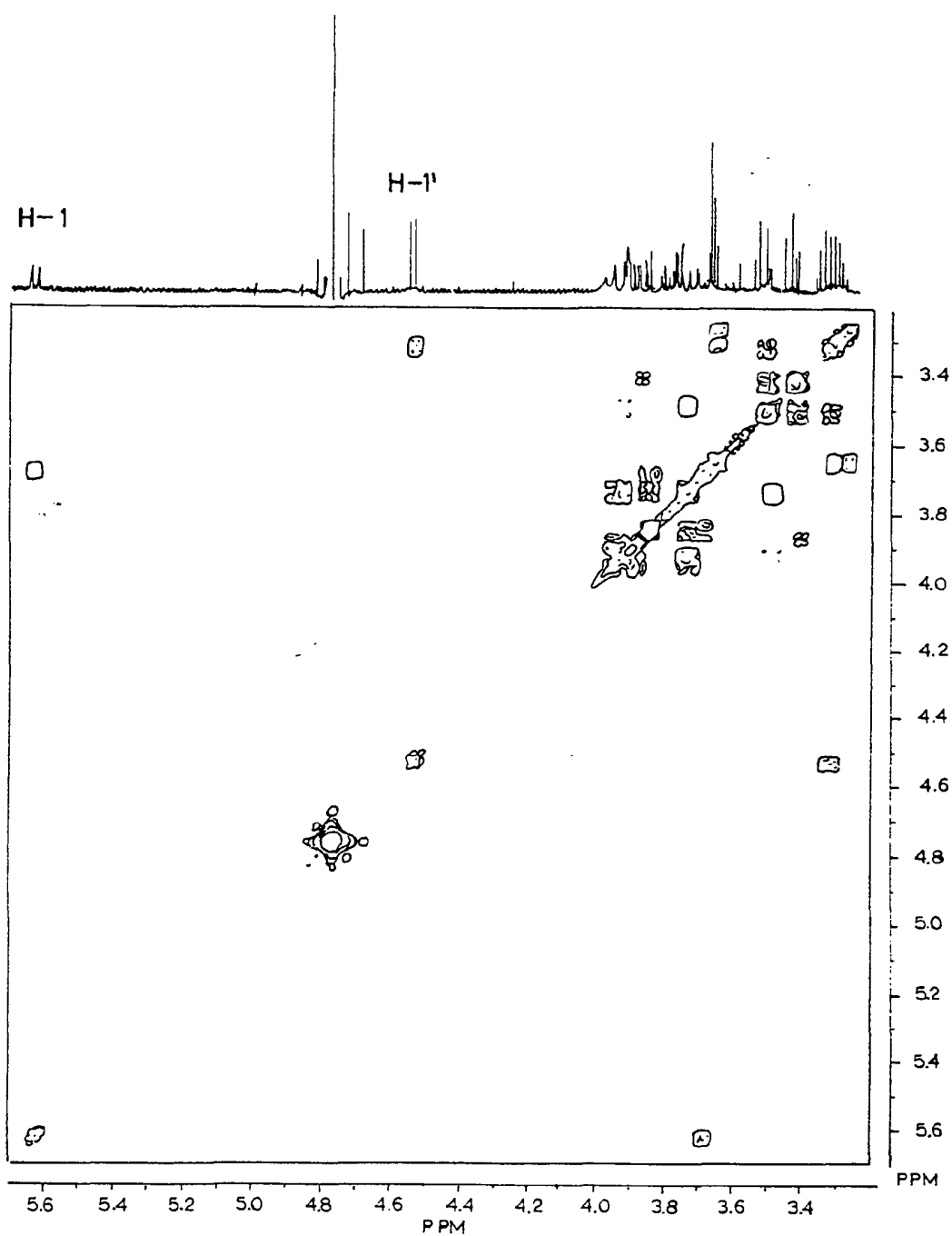
Fig.5



173548

5/15

Fig.6a 500 MHz ^1H - ^1H -2D-NMR - Spektrum av
Cellobiosekonjugater 51 α



173548

6/15

Fig. 6b 500 MHz ^1H - ^1H -2D-NMR-Spektrum av
Cellobiosederivatet 51 β

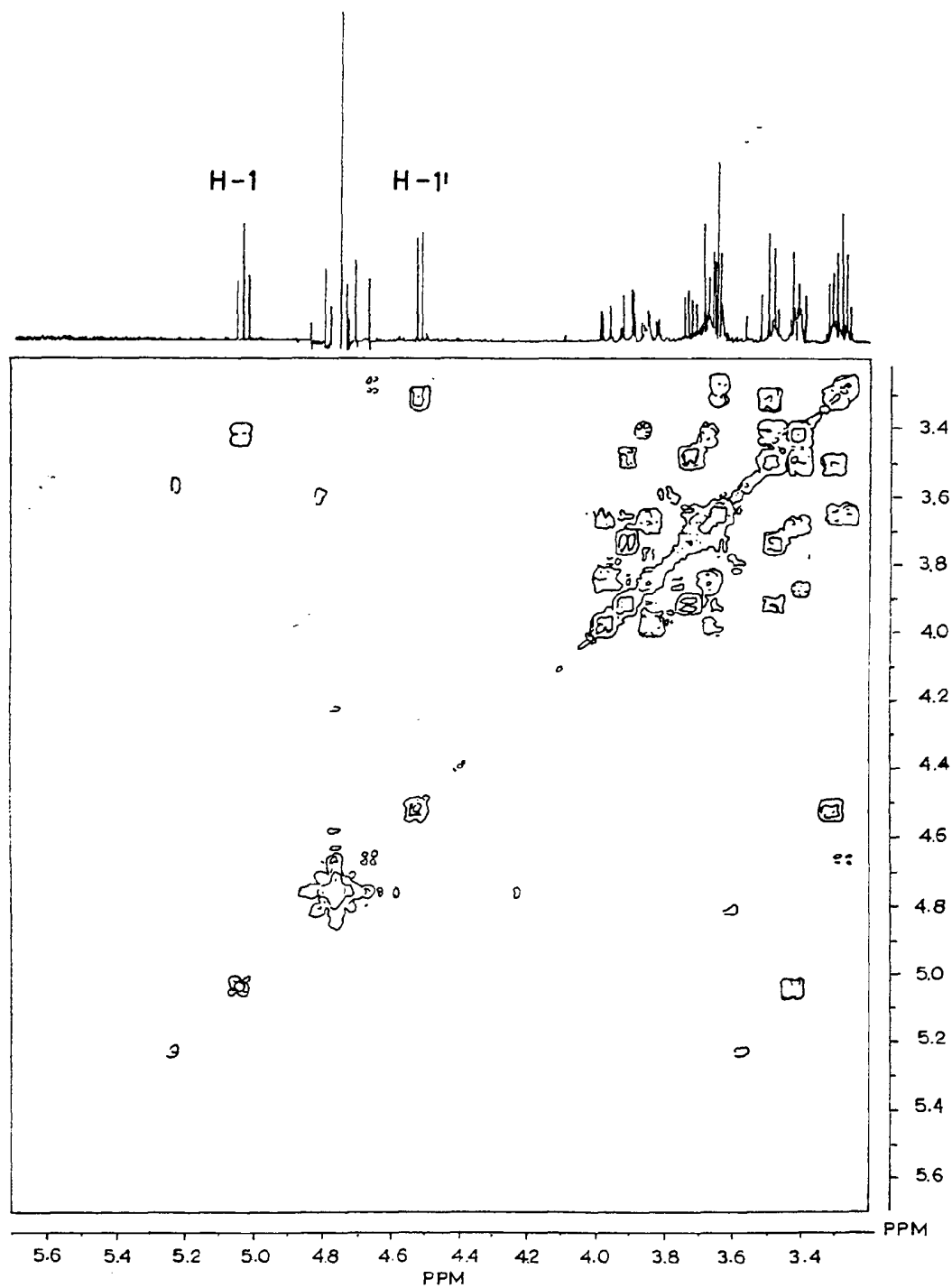


Fig.7

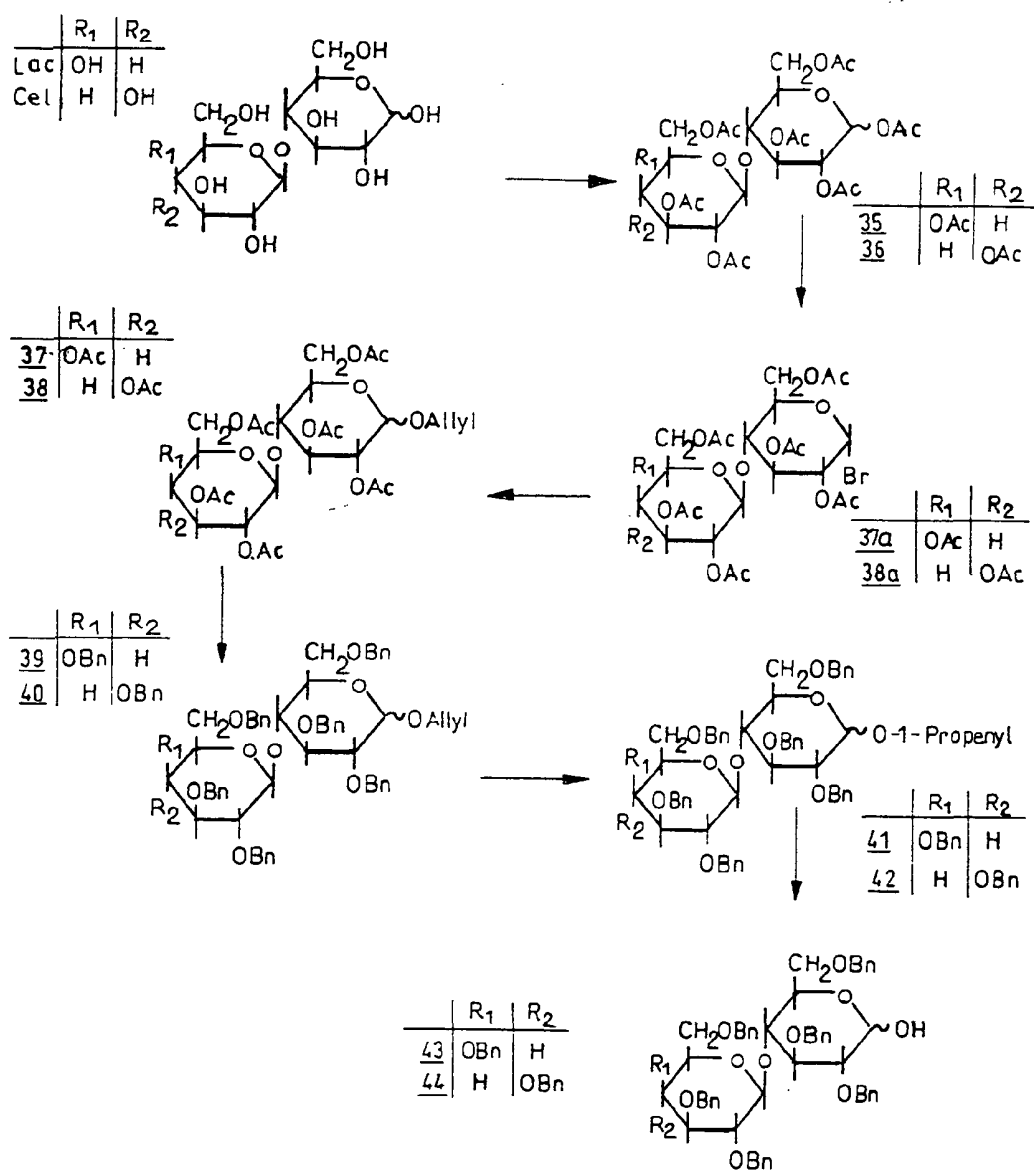


Fig.8 Proliferasjon av Res-kultur under kontinuerlig inkubering med 28 α (a) og 28 β (b)

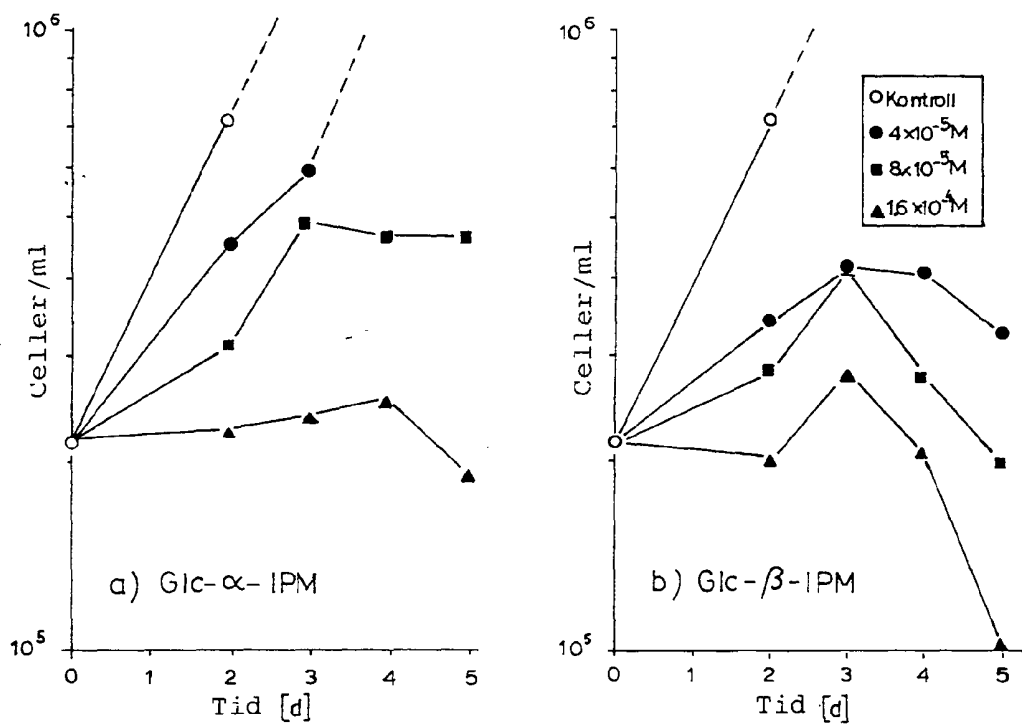
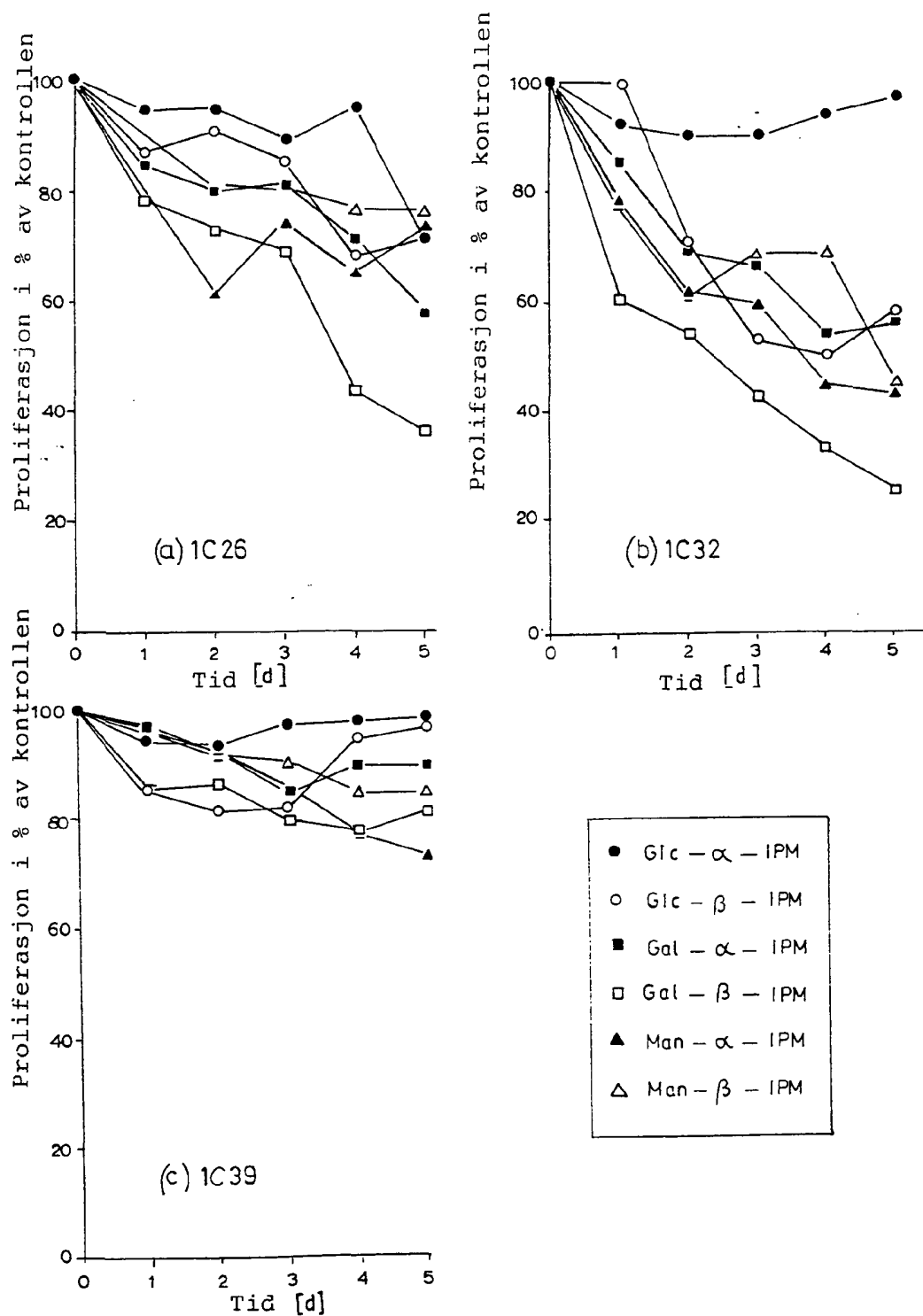


Fig. 9 Proliferasjon av brysttumorcellekulturer 1C26(a), 1C32(b) og 1C39(c) etter 2h-inkubasjon med $8 \cdot 10^{-5} \text{M}$ Monosakkarid-IMP-konjugater 28-30



10/15

Fig. 10 Proliferasjon av brysttumorcellelinjer 1C32 etter 2h-inkubasjon ($8 \cdot 10^{-5} \text{M}$) med disakkarid-IPM-konjugatene 50 og 51

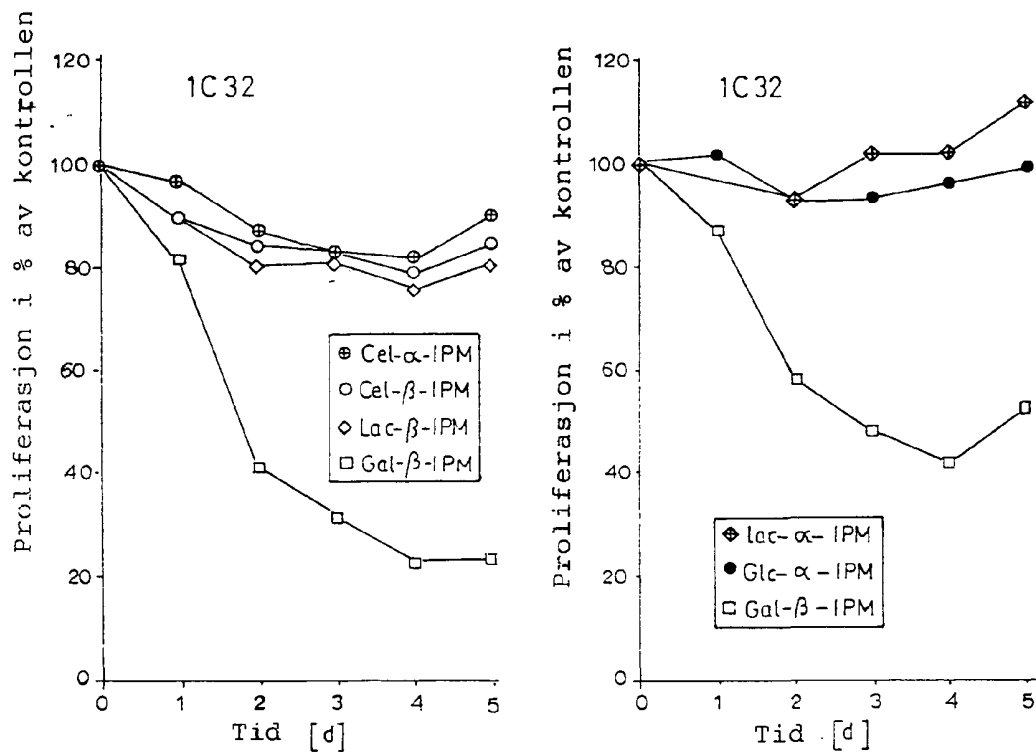
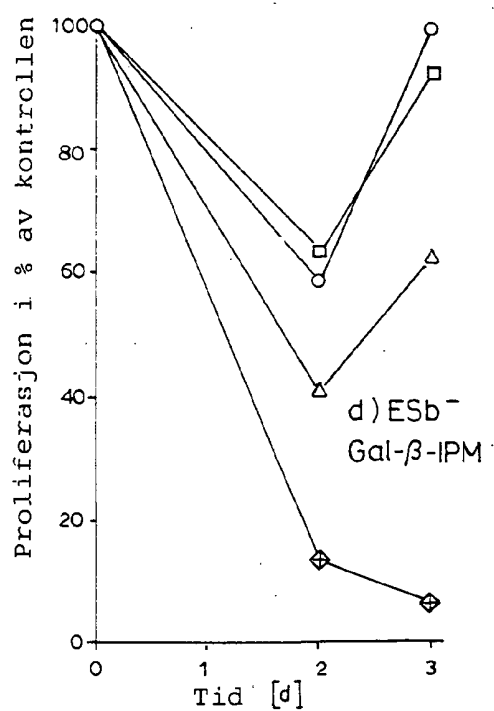
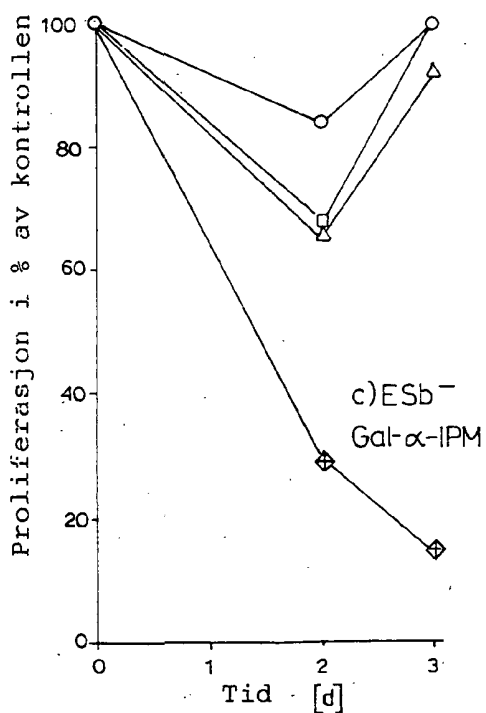
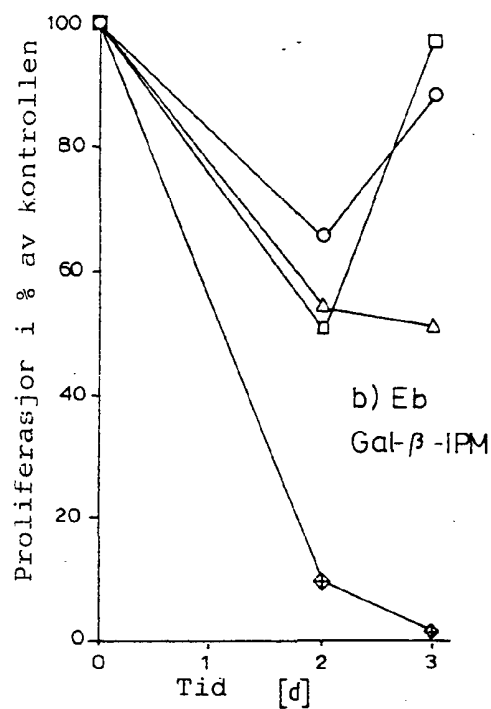
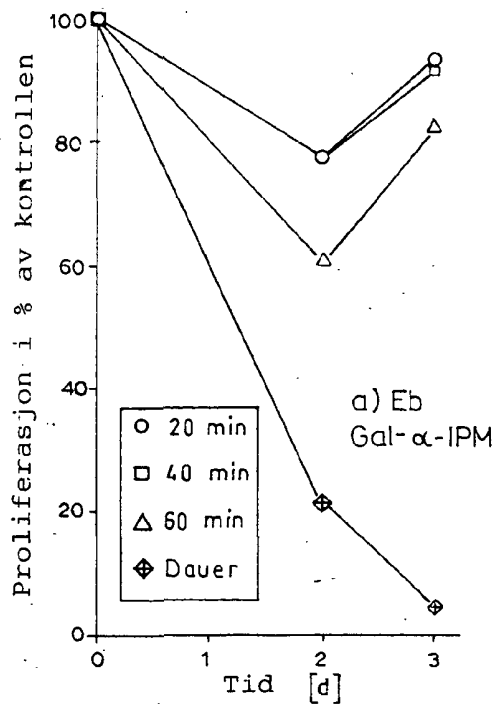


Fig. 11 Avhengighet av proliferasjon av Eb (a og b) henholdsvis ESb⁻ (c og d) med hensyn til inkubasjonstid, inkubering med Gal- α -IPM (a og c) henholdsvis Gal- β -IPM (b og d), $8 \cdot 10^{-5}$



173548

12/15

Fig.12 Overlevelsestider av de med Glc- β -IPM behandlede hunnmus (a) og hannmus (b); Behandlingsskjema: 5 $\cdot$ 1 o.a. dose pr. dag 1-5; (Resultat av en NCl-studie).

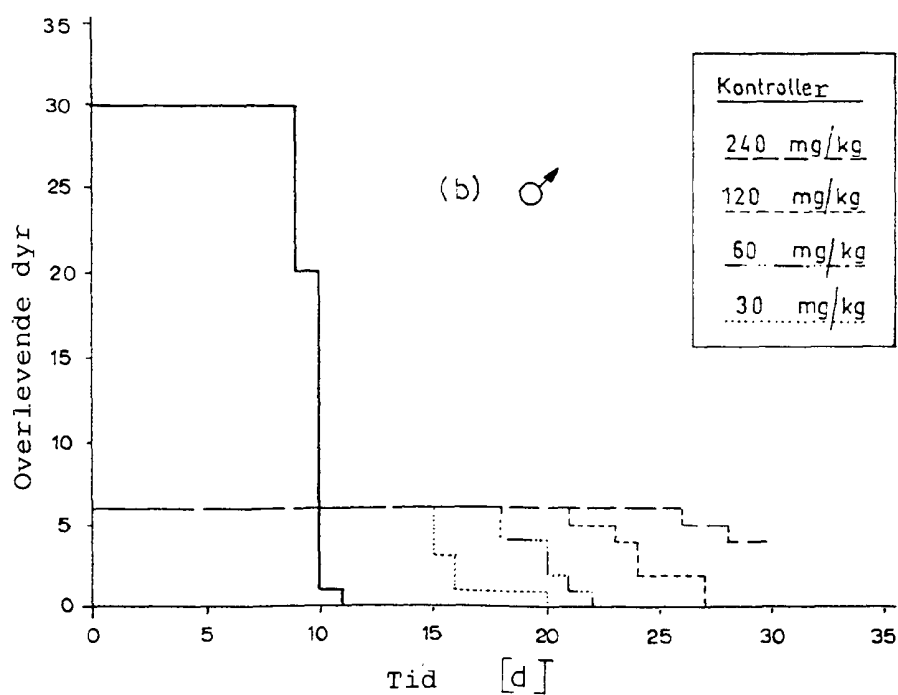
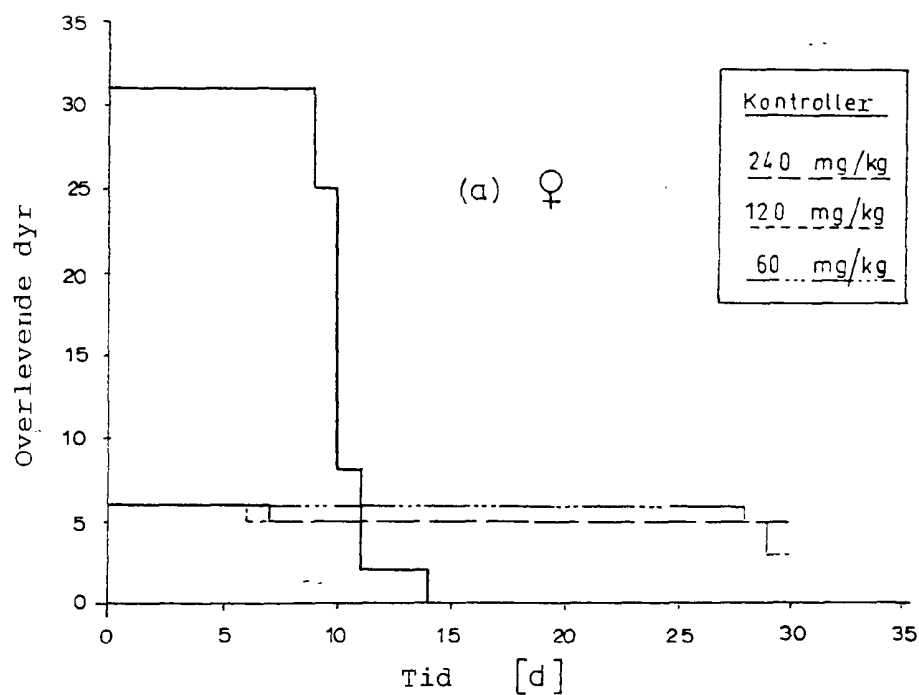


Fig. 13 Vekst av transplanterte 1C32-tumorer under terapi med Gal-IPM (5•1 dose); a) økning av tumorvolumene. b) tumorvolumer i % av kontrollene

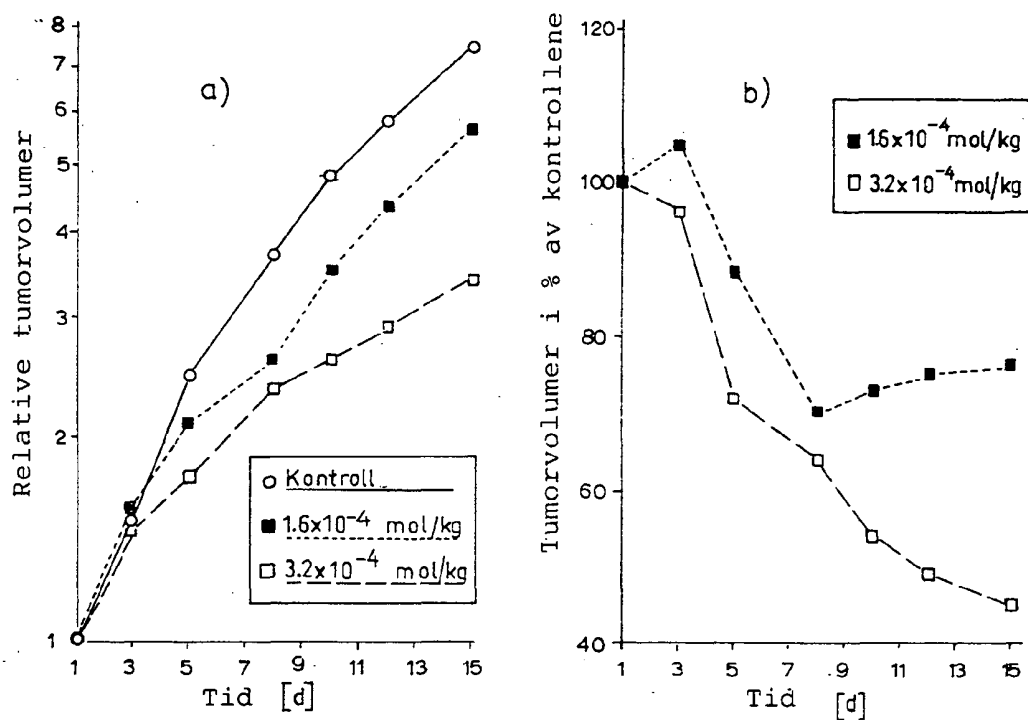


FIG.14 Syntesevei for eks. av 28β

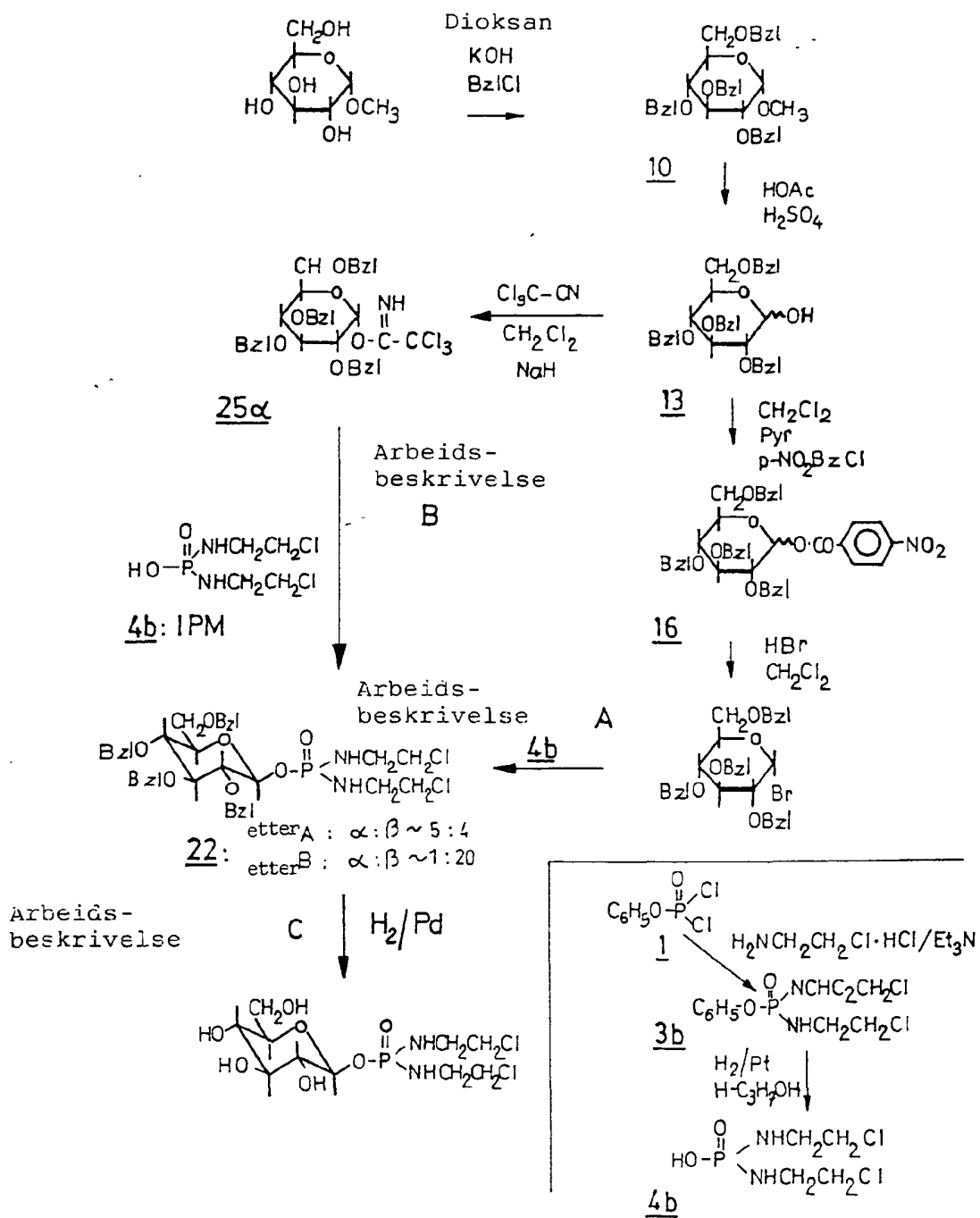


FIG.15 Syntese av disakkarid-IPM-konjugatene 50 og 51,
utgående fra Hepta-O-benzylglukosene 43 og 44

