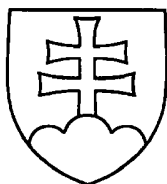


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 18.08.1998
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/056 819, 9720329.3
(32) Dátum priority: 22.08.1997, 24.09.1997
(33) Krajina priority: US, GB
(40) Dátum zverejnenia: 12.02.2001
(86) Číslo PCT: PCT/US98/17092, 18.08.1998

(21) Číslo dokumentu:

209-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷ :

A 61K 31/34
A 61K 31/35
C 07D 307/77
C 07D 309/10
C 07D 311/94
C 07D 317/46

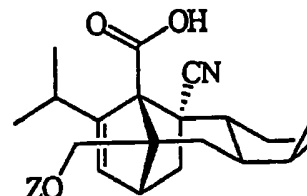
(71) Prihlasovateľ: MERCK & CO., INC., Rahway, NJ, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Kahn-Nielsen Jennifer, Rahway, NJ, US;
Tse Bruno, Rahway, NJ, US;

(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **4-Kyano-4-deformylsordarínové deriváty, spôsob ich prípravy, farmaceutický a agrochemický prostriedok s ich obsahom a ich použitie**

(57) Anotácia:
Deriváty 4-kyano-4-deformylsordarínu všeobecného vzorca (I) sú antifungálne činidlá užitočné na liečbu a/alebo prevenciu ľudských alebo živočíšnych hubových infekcií, ako aj na kontrolu fytopatogénnych húb na plodinách.



(I)

- 1 -

4-Kyano-4-deformylsordarínové deriváty, spôsob ich prípravy, farmaceutický a agrochemický prostriedok s ich obsahom a ich použitie

Oblasť techniky

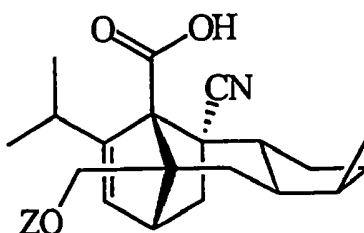
Predložený vynález sa týka derivátov 4-kyano-4-deformylsordarínu, ktoré sú účinnými antifungálnymi činidlami so širokým spektrom účinku a so zvýšenou stabilitou, spôsobov ich prípravy, farmaceutických a poľnohospodárskych prostriedkov s ich obsahom a spôsobov kontroly hubových infekcií u ľudí, zvierat a rastlinných materiálov použitím takýchto zlúčenín.

Doterajší stav techniky

Sordarín je antifungálne antibiotikum izolované z plesne *Sordaria araneosa* (pozri GB 1 162 027 a Helvetica Chimica Acta, 1971, 51:119-20). Ako antifungálne činidlá boli publikované aj iné zlúčeniny so sordarínovým skeletom. Japonský Kokai J62040292 opisuje zlúčeninu zofimarín izolovanú zo *Zofiela marina* sp.; Japonský Kokai J06157582 opisuje zlúčeninu BE-31405 izolovanú z *Penicillium* sp.; a SCH57404 je publikovaná v J. Antibiotics, 1995, 48:1171-1172. Semisyntetické sordarínové deriváty sú publikované v PCT prihláškach WO96/14326 a WO96/14327.

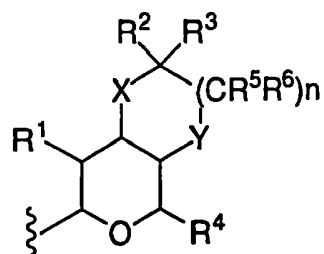
Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu sú 4-kyano-4-deformylsordarínové deriváty všeobecného vzorca I

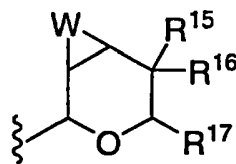


(I)

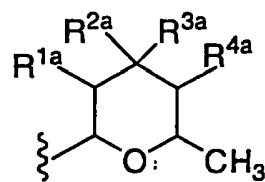
kde Z je tetrahydropyránová skupina vybraná z



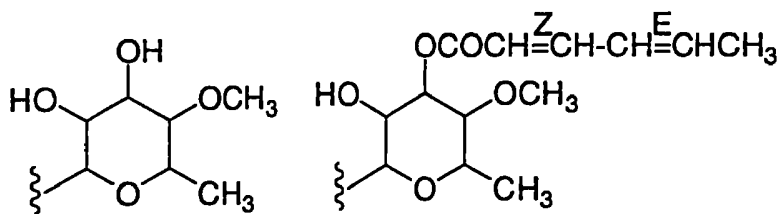
(a)



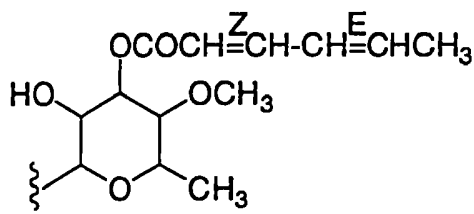
(b)



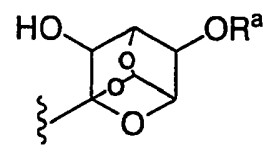
(c)



(d)



(e)



(f)

a

a ich soli a solváty (napr. hydráty) alebo metabolicky labilné deriváty, kde

R^a znamená C(O)CH₃ alebo CH₃;

R¹ znamená vodík, halogén, hydroxyl, C₁₋₄alkoxy alebo acyloxy;

R² a R³ znamenajú nezávisle vodík, C₁₋₆alkyl alebo C₁₋₄alkoxyC₁₋₄alkyl alebo R² a R³ spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené, znamenajú C=O, C=S alebo C₃₋₈-cykloalkyl;

R⁴ znamená vodík alebo CH₂R⁷ (kde R⁷ je vodík, hydroxyl, C₁₋₄alkoxy alebo skupinu OCOR⁸, v ktorej R⁸ je C₁₋₄alkyl alebo aryl);

R⁵ a R⁶ sú každý nezávisle vodík, C₁₋₆alkyl alebo C₁₋₄alkoxyC₁₋₄alkyl alebo R⁵ a R⁶ spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené znamenajú C=O, C=S alebo C₃₋₈-cykloalkyl;

n je nula alebo 1;

X a Y znamenajú každý nezávisle kyslík, síru alebo CR⁹R¹⁰ (kde R⁹ a R¹⁰ každý nezávisle znamená vodík, C₁₋₆alkyl, C₁₋₄alkoxy alebo C₁₋₄alkoxyC₁₋₄alkyl; alebo R⁹ a R¹⁰ spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené znamenajú C=O, C=S, C₃₋₈-

cykloalkyl alebo $C=CHR^{11}$, kde R^{11} znamená vodík alebo C_{1-4} alkyl); alebo ak X alebo Y je kyslík a n je nula, potom $-Y-CR^2R^3$ alebo $-X-CR^2R^3$ môžu znamenať aj $-N=CR^3$ alebo $NR^{12}-CR^2R^3$ (kde CR^2 a R^3 sú $C=O$ a R^{12} je C_{1-4} alkyl, acylová skupina COR^{13} , kde R^{13} je C_{1-6} alkyl), alebo keď Y je kyslík a n je nula X môže znamenať skupinu CR^{11} (kde R^{11} má významy definované vyššie), ktorá je pripojená na pyránový kruh dvojitou väzbou;

R^{15} znamená vodík, halogén, azidoskupinu, C_{1-6} alkyl, hydroxy, C_{1-6} alkoxy (voliteľne substituované 1 alebo 2 hydroxyskupinami alebo ketalovými skupinami alebo 1 alebo 2 C_{1-3} alkoxy skupinami), aryl C_{1-4} alkoxy, C_{3-6} alkenyloxy, skupinu $OCOR^{18}$ (kde R^{18} je aryl C_{1-4} alkoxy alebo C_{1-10} alkylová skupina voliteľne obsahujúca jednu alebo dve dvojité väzby) alebo C_{1-6} alkoxykarbonyl C_{1-4} alkoxy a R^{16} znamená vodík alebo R^{15} a R^{16} môžu spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené, znamenať $C=O$ alebo $C=CH_2$;

R^{17} znamená CH_2R^{19} , kde R^{19} je vodík, hydroxyl, C_{1-14} alkoxy alebo skupinu $OCOR^{20}$, v ktorej je R^{20} C_{1-4} alkyl; a

W znamená kyslík, síru alebo CH_2 ;

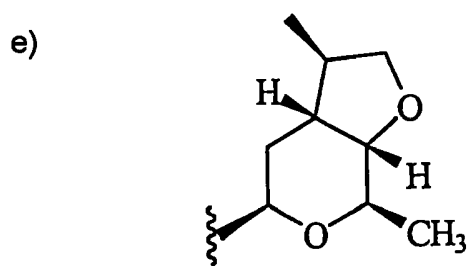
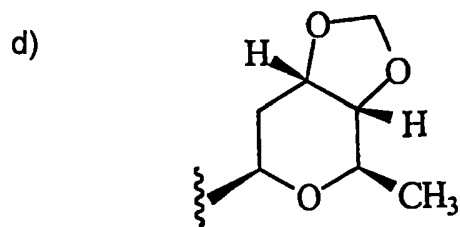
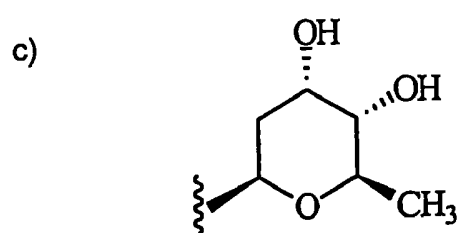
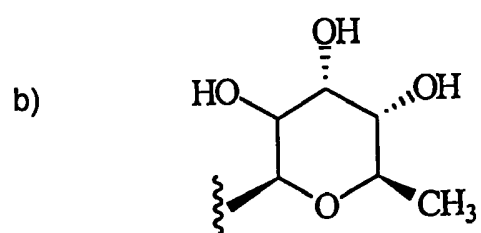
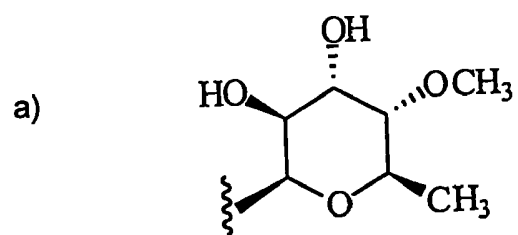
a čiarkovaná čiara v skupine (a) znamená voliteľnú prítomnosť ďalšej väzby;

R^{1a} znamená vodík, halogén, hydroxyl alebo C_{1-4} alkoxy;

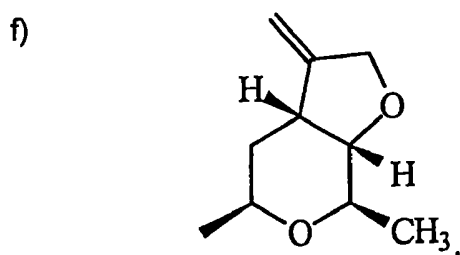
R^{2a} znamená vodík, halogén, hydroxyl, C_{1-10} alkoxy, C_{1-10} alkyltio, C_{1-6} alkoxy C_{1-4} alkoxy, aryl C_{1-6} alkyloxy, aryl C_{3-6} alkenyloxy, azidoskupinu, $NR^{5a}COR^{5a}$ (kde každý z R^{5a} je nezávisle vodík alebo C_{1-6} alkyl), OR^{6a} (kde R^{6a} je cyklický éter, ktorý obsahuje 4 až 8 atómov spojených s atómom kyslíka cez kruhový atóm uhlíka, ktorý je pri kruhovom atóme kyslíka) alebo skupinu $Y^aC(=O)-X^a-R^{7a}$, kde Y^a je kyslík, síra alebo NH, X^a buď väzba, atóm kyslíka alebo substituent NR^{8a} , v ktorom R^{8a} je vodík alebo C_{1-6} alkyl, a R^{7a} je C_{1-10} alkyl, ktorý voliteľne obsahuje jednu alebo dve dvojité väzby, aryl, aryl C_{1-4} alkyl, aryl C_{2-4} alkenyl, halogén C_{1-6} alkyl alebo C_{1-6} alkoxy C_{1-4} alkyl), a R^{3a} znamená vodík alebo R^{2a} a R^{3a} spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené znamenajú $C=O$ alebo $C=NOR^{9a}$ (kde R^{9a} je C_{1-6} alkyl); a

R^{4a} je hydroxyl, C_{1-6} alkoxy alebo $^oC(=O)R^{7a}$ (kde R^{7a} je definovaný vyššie).

Jedno uskutočnenie vynálezu poskytuje zlúčeniny všeobecného vzorca I, kde Z je



alebo



Ďalšie uskutočnenie vynálezu poskytuje farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje antifungálne účinné množstvo zlúčeniny všeobecného vzorca I a farmaceuticky prijateľný nosič. Poskytuje aj farmaceutický prostriedok, ktorý je vyrobený kombináciou zlúčeniny všeobecného vzorca I a farmaceuticky prijateľného nosiča.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu poskytuje poľnohospodársky prostriedok, ktorý obsahuje antifungálne účinné množstvo zlúčeniny všeobecného vzorca I a poľnohospodársky prijateľný nosič. Poskytuje aj poľnohospodársky prostriedok, ktorý je vyrobený kombináciou zlúčeniny všeobecného vzorca I a poľnohospodársky prijateľného nosiča.

Ešte ďalšie uskutočnenie vynálezu poskytuje spôsob ošetrovania hubovej infekcie u zvierat (vrátane ľudí), ktorý zahŕňa podanie antifungálne účinného množstva zlúčeniny všeobecného vzorca I, zvieraťu, ktoré potrebuje takúto liečbu.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu poskytuje spôsob kontroly fytopatogénnych húb na rastlinách, ktorý zahŕňa aplikáciu antifungálne účinného množstva zlúčeniny všeobecného vzorca I na rastlinu.

Ak nie je uvedené inak, platia v prihláške nasledujúce definície:

Výraz "kontrola" alebo "kontrolovanie" zahŕňa profylaktické použitie (tzn. ochranu proti infekcii) a liečebné použitie (tzn. zničenie infekcie).

Výraz "rastliny" zahŕňa celé živé rastliny alebo ich časti, listy, kvety, semená, plody a iné materiály odvodené od rastlín. Výraz zahŕňa aj korene, prostredníctvom aplikácie účinnej zložky do pôdy.

Výraz "prostriedok", poľnohospodársky alebo agrochemický prostriedok, je mienený ako taký, ktorý zahŕňa produkt obsahujúci účinnú zložku (zložky) a inertnú zložku (zložky), ktoré vytvárajú nosič, ako aj akýkoľvek produkt, ktorý je výsledkom priamej alebo nepriamej kombinácie, vytvorenia komplexu alebo agregácie akýchkoľvek dvoch alebo viacerých zložiek alebo disociáciou jednej alebo viacerých zložiek alebo iným typom reakcií alebo interakcií jednej alebo viacerých zložiek. Z toho vyplýva, že prostriedok podľa vynálezu zahŕňa akýkoľvek prostriedok

vyrobený zmiešaním zlúčeniny podľa vynálezu a poľnohospodársky prijateľného nosiča.

"Alkyl", ako skupina alebo časť skupiny, znamená nerozvetvený alebo rozvetvený alkylový reťazec ako metyl, etyl, *n*-propyl, *n*-butyl, izopropyl, *sek*-butyl, *terc*-butyl, *n*-hexyl a *n*-oktyl.

"Aryl", ako skupina alebo časť skupiny, znamená fenyl alebo heteroaryl, z ktorých každý je voliteľne substituovaný jednou až troma skupinami nezávisle vybranými zo skupiny, ktorá zahŕňa halogén, hydroxyl, C₁₋₆alkyl, C₁₋₆alkoxy alebo C₁₋₆alkoxykarbonyl. Heteroarylová skupina môže byť 5- alebo 6-členný heteroaromatický kruh, ktorý obsahuje jeden alebo viacero heteroatómov vybraných zo skupiny, ktorá obsahuje dusík, kyslík a síru. Vhodné príklady heteroarylových skupín zahŕňajú pyridyl, furyl, tienyl a pyrolyl.

"Halogén" znamená fluór, chlór, bróm alebo jód.

Ak je R¹ acyloxyskupina, môže znamenať, napríklad skupinu OCOR¹³, pričom R¹³ je definované vyššie.

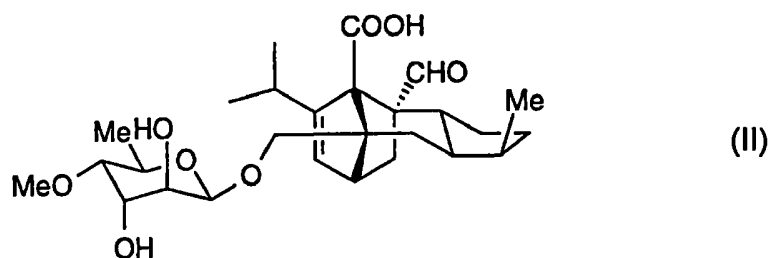
Vhodné soli zlúčeniny všeobecného vzorca I zahŕňajú anorganické zásadité soli, ako soli alkalických kovov (napr. sodné alebo draselné soli), amónne soli a soli na organickom základe. Vhodné soli s organickým základom zahŕňajú soli amínov ako trialkylamín (napr. trietylamín), soli dialkylamínu (napr. dicyklohexylamín), voliteľne substituované benzylamínom (napr. fenylbenzylamín alebo *p*-bróm-benzylamín), etanolamín, dietanolamín, *N*-metylglukózoamín, *N*-metyl-piperidín, pyridín a substituovaný pyridín (napr. kolidín, lutidín, 4-dimetylamino-pyridín) a tri(hydroxymetyl)metylamínové soli a soli aminokyselín (napr. lyzínové alebo arginínové soli).

Metabolicky labilné deriváty zlúčenín všeobecného vzorca I sú zlúčeniny, ktoré sú v ošetrovanom subjekte (teda vo zvierati, v rastline (vrátane listov, kvetov, semien alebo iných častí alebo rastlinných produktov alebo v pôde) konvertované na zlúčeniny všeobecného vzorca I. Príklady takýchto derivátov obsahujú v molekule bežné metabolicky labilné estery vytvorené z karboxylovej kyseliny.

Príprava zlúčenín

Zlúčeniny všeobecného vzorca I je možné pripraviť zo sordarínu a jeho derivátov, zo sordaricínu a z iných zlúčenín sordarínového typu, ktoré boli opísané v literatúre.

Sordarín je kyselina [1R-(1 α ,3 α β ,4 β ,4 α β ,7 β ,7 α α ,8 α β)]8a-[(6-deoxy-4-O-metyl- β -D-altropyranosyloxy)metyl]-4-formyl-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-s-indacén-3a(1H)-karboxylová vzorca II

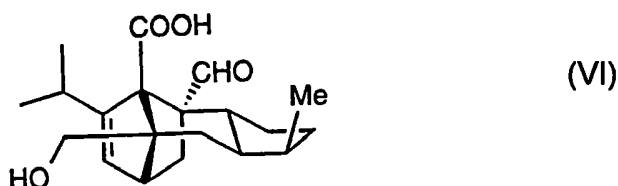


Sordarín je možné získať kultiváciou *Sodaria araneosa* NRRL 3196 (tiež uložená v ATCC pod číslom ATCC 36386) v súlade s postupom opísaným v GB1162027 alebo vo W096/14326. Sordarín je možné izolovať aj z fermentačnej zmesi *Rosellinia subiculata* a neidentifikovanej huby ATCC 74387 ako je opísané nižšie.

Zofimarín je možné získať z fermentačného média zo *Zofieldia marina* SANK 21274 (ATCC 34456) ako je opísané v japonskom Kokai 62040292. BE31405 (I, kde A je (f) a R^a je acetyl) je produkovaná *Penicillium* sp. F3 1405 ako je opísaný v japonskom 06157582. SCH57404 (I, kde A je (f) a R^a je metyl) je produkovaná hubami označenými ako Schering číslo kultúry SCF1082A, ktoré sú publikované v J. Antibiotics, 1995, 48(10):1171-1172.

Východiskové materiály pre sordarínové deriváty (I, kde Z je (a) alebo (b)), sú opísané v PCT prihláške WO96/14326; a východiskové materiály pre sordarínové deriváty (I, kde Z je (c)) sú opísané v PCT prihláške WO96/14327.

Sordaricín (VI) je kyselina [1R-(1 α ,3 α ,4 β ,4 α ,7 β ,7 α ,8 α)]4-formyl-8a-(hydroxymetyl)-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-s-indacén-3a(1H)-karboxylová vzorca VI



Sordaricín je možné pripraviť zo sordarínu ošetrovaním s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Ako je opísané vo W096/14326 sordaricín je možné získať aj fermentáciou mutantu odvodeného od *Sordaria araneosa* NRRL 3196, a biologickou transformáciou sordarínu použitím Koryneformných druhov.

Ako bolo uvedené vyššie, našli sa dva ďalšie organizmy, ktoré produkujú sordarín.

Jedným z druhov húb, ktoré sú používané na výrobu sordarínu je neidentifikovaná sterilná huba GB3109, ktorá bola izolovaná z vnútorných tkanív koreňov pobrežnej kroviny *Conocarpus erectus* (Combretaceae), zbieranej v Manglar de Río Rincón, Península de Osa, Provincia de Puntarenas, Costa Rica, a je označená ako MF6232 v zbierke kultúr Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey. Táto kultúra bola uložená 27. augusta 1996 do trvalej zbierky American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA v súlade s Budapeštianskou dohodou o medzinárodnej identifikácii a uložení mikroorganizmov za účelom patentového konania, a bolo je priradené poradové číslo ATCC 74387.

Huba sa pestovala na rôznych mykologických médiách, v rôznych svetelných režimoch a na sterilných listoch a filtračnom papieri, avšak v žiadnom z uvedených prípadov netvorila rozmnožovacie štruktúry, a teda nemohla byť identifikovaná.

Kolónie huby mali pri kultivácii na agare nasledovnú morfológiu:

Kolónie na ovsenom agare (Difco), pri 23 °C a 12 hodinovej fotoperióde, rastú stredne rýchlo, dosiahnu 85 až 90 mm do 14 dní, pričom postupujúca zóna je pritlačená, súmerná, kolónie majú silne radiálne žliabky, s vlhkým priliehavým mycéliom v strede, zamatovými vybiehajúcimi podkladovými uzlíkmi alebo pásmi hýf, kolónie sú priesvitné až bledoružové, veľmi blízke farbám označeným ako Pale Ochraceous Salmon - mierne oranžovo-žlto-ružová (názvy farieb z Ridgway, R. 1912. Color Standards and Nomenclature, Washington, D.C.), Light Ochraceous Salmon – svetlo oranžovo-žlto-ružová, ružovo sivá - Avellaneous, Cinnamon Drab - červenohnedá, alebo sú biele v najhornejšom vzduchovom mycéliu, opačná strana je svetlo ružovo sivá, nevylučujú žiadne látky, majú fragrantnú vôňu. Nerastú na ovsenom agare pri 37 °C.

Kolónie na V8 juice agare (Stevens, R. B. 1981. Mycology Guidebook. University of Washington Press, Seattle, str. 665) pri 23 °C a 12 hodinovej fotoperióde, rastú pomaly a do 14 dní dosiahnu 37 až 42 mm, na okraji sú ponorené, poväčšine majú väčšinu mycélia pripevnenú, smerom k vonkajšej tretine majú nízke mycélium pokryté chumáčikmi, sú ohraničené, priesvitné až svetlosivo ružové, s podobnou farbou ako majú kolónie na ovsenom agare, opačná strana je priesvitná až svetlo červeno hnedá, približne ako Wood Brown, svetlohnedá - Fawn Color.

Kolónie na pšeničnom agare (Difco) rastú pri 25 °C a 12 hodinovej fotoperióde pomaly, a dosiahnu do 14 dní 33 až 34 mm, okraj majú ponorený a nemajú vzdušné hýfy, sú ohraničené a priesvitné.

Mycélium sa skladá z vysoko rozvetvených, hyalínových hýf s jednoduchými septami.

Druhý hubový kmeň (GB3719) použitý na výrobu sordarínu je kmeň *Rosellina subiculata* (Ascomycotina, Xylariaceae), označený ako MF6239 v zbierke kultúr Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey. Táto kultúra bola uložená 27. augusta 1996 do trvalej zbierky American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA v súlade s Budapeštianskou dohodou o

medzinárodnej identifikácii a uložení mikroorganizmov za účelom patentového konania, a bolo je priradené poradové číslo ATCC 74386.

Asky *Rosellinia subiculata* (GB3719) sa našli na ošúpaných tvrdodrevných konároch na pobreží Navesink River, Monmouth Co., New Jersey. V laboratóriu sa sterilnou mikrotómovou čepeľou odstránili konce niekoľkých askov a asky, parafýzy a askospóry zo stredu sa vybrali s jemnou ihlou a v pásoch sa naniesli na agarový sladový kvasinkový extrakt. Askospóry sa inkubovali cez noc, pokiaľ nezačali pučať a preniesli sa do skúmaviek so sladovým kvasinkovým extraktom, aby sa iniciovalo vytvorenie čistých kolónii.

Morfológia *Rosellinia subiculata* (GB3719) vo všeobecnosti zodpovedá opisu v literatúre (J. B. Ellis & B.M. Everhart. 1892. The North American Pyrenomycetes. publikované autormi, Newfield, New Jersey. str. 165-166; L.E. Petrini. 1993. *Rosellinia* species of the temperate zones. Sydowia 44:169-281). Kľúčovými znakmi, ktoré viedli ku identifikácii huby ako *Rosellinia subiculata* boli: stromatické asky sa vyskytovali jednotlivo, ale agregované alebo fúzované v malých klastroch na myceliálnom subikule na dreve zbavenom kôry; strómy boli hemisférické, masné, hladké, lesklé, čierne, subikulum a tenká myceliálna podložka bola svetlo žltohnedá alebo sa niekedy vyskytovala len ako svetlofarebné vyblednutie dreva v okolí strómy; asky boli valcovité s amyloidnou vrcholovou zátkou; askospóry boli hnedosivé, široko eliptické až mierne v tvare obličky, hladké, bez priveskov alebo puzdier, s priamym ventrálnym zárodočným žliabkom 10 až 12 x 5 až 6 µm.

V agarovej kultúre mali kolónie huby nasledujúcu morfológiu:

Kolónie na ovsenom agare, pri 23 °C a 12 hodinovej fotoperióde, rastú stredne rýchlo, pričom do 14 dní dosiahli 73 až 75 mm, postupujúca zóna je priliehajúca, súmerná, slabo ohraničená, kolónie majú vo vnútornej tretine biele zamatové až chumáčikovité mycélium, a vlhké priliehajúce mycélium vo vonkajších dvoch tretinách, sú priesvitné až biele alebo svetlo ružové, svetlo ružovo vínovo červené - Light Vinaceous Cinnamon na spodnej strane, nie sú vylučované žiadne látky, a majú fragrantnú vôňu. Nerastú na ovsenom agare pri 37 °C.

Kolónie na V8 juice agare, pri 23 °C a 12 hodinovej fotoperióde rastú pomaly a do 14 dní dosiahnu 25 až 35 mm, na okraji sú ponorené, poväčšine majú väčšinu mycélia priliehajúceho, smerom k vnútornej tretine je mycélium chumáčikovité, kolónie sú priesvitné až svetlo sivo ružové, vínovo škoricové - Vinaceous Cinnamon, opačná strana je priesvitná až škoricová, oranžovo škoricová – Orange Cinnamon, škoricová - Cinnamon alebo svetlo červeno hnedá, červenohnedá - Russet, svetlohnedá - Fawn Color, majú fragrantnú vôňu.

Kolónie na pšeničnom agare pri 25 °C a 12 hodinovej fotoperióde rastú pomaly, do 14 dní dosiahnu 29 až 34 mm, majú ponorený okraj, nemajú vzdušné hýfy, nie sú ohraničené, majú priesvitné alebo mierne biele mycélium v mieste inokulácie, a na spodnej strane sú bezfarebné.

Keď sa kultúra prvý krát pestovala v auguste roku 1993, kmeň vytváral obmedzené konidiofóry a konídiá anamorficky podobné *Geniculosporium*, ktoré boli opísané v Petrini 1993. Avšak sporulácia sa už neobjavila, najpravdepodobnejšie kvôli predĺženému skladovaniu a opakovaným transferom. Najmenej v jednom prípade sa pozorovalo vytvorenie niekoľkých zreých peritécií s askami a askospórami, ktoré boli rovnaké ako asky a askospóry pozorované v prirodzenom prostredí, po 5 týždňoch rastu na ovsenom agare. Keď sa inkubovali askospóry na sladovom kvasinkovom agarovom extrakte pri laboratórnej teplote, pučali cez noc. Mycélium je zložené s veľmi rozvetvených hyalínových hýf s jednoduchými septami.

Sordarín sa produkuje kultiváciou kmeňa *Rosellina subiculata* alebo neidentifikovanej huby MF6232 (ATCC74387), ktorá je schopná produkovať uvedenú zlúčeninu na bežnom tuhom médiu alebo v bežnom vodnom médiu. Organizmus sa pestuje v nutričnom médiu, ktoré obsahuje známe nutričné zdroje pre podobné huby, tzn. asimilačné zdroje uhlíka a dusíka plus voliteľne anorganické soli a iné známe rastové faktory. Na účely vynálezu sú aplikovateľné postupy použité na kultiváciu iných podobných húb.

Nutričné médium by malo obsahovať príslušné asimilačné uhlíkové zdroje ako ribóza, glukóza, sacharóza, celobióza alebo fruktóza. Ako zdroj dusíka môžu byť použité chlorid amónny, síran amónny, močovina, dusičnan amónny, dusičnan sodný atď., a to buď samostatne alebo v kombinácii s organickými zdrojmi dusíka,

ako je peptón, extrakt z rybacieho mäsa, kvasinkový extrakt, tekutina z vylúhovanej pšenice, sójový prášok, múka zo semien pšenice, atď. Ak je to nevyhnutné, je možné pridať aj nutričné anorganické soli, aby sa poskytli zdroje sodíka, draslíka, vápnika, amoniaku, fosfátu, síranu, chloridu, bromidu, uhličitanu, zinku, horčíka, mangánu, železa a podobne.

Výroba sordarínu sa môže uskutočňovať pri akejkoľvek teplote, ktorá vedie k uspokojivému rastu produkčného organizmu, napr. 20 °C až 30 °C. Obvykle sa optimálna produkcia požadovanej zlúčeniny získava v pretrepávaných fľašiach po inkubačných periódach 7 až 21 dní. Prevzdušňovanie sa v pretrepávaných fľašiach dosahuje trepaním, napr. miešaním na rotačnom miešači.

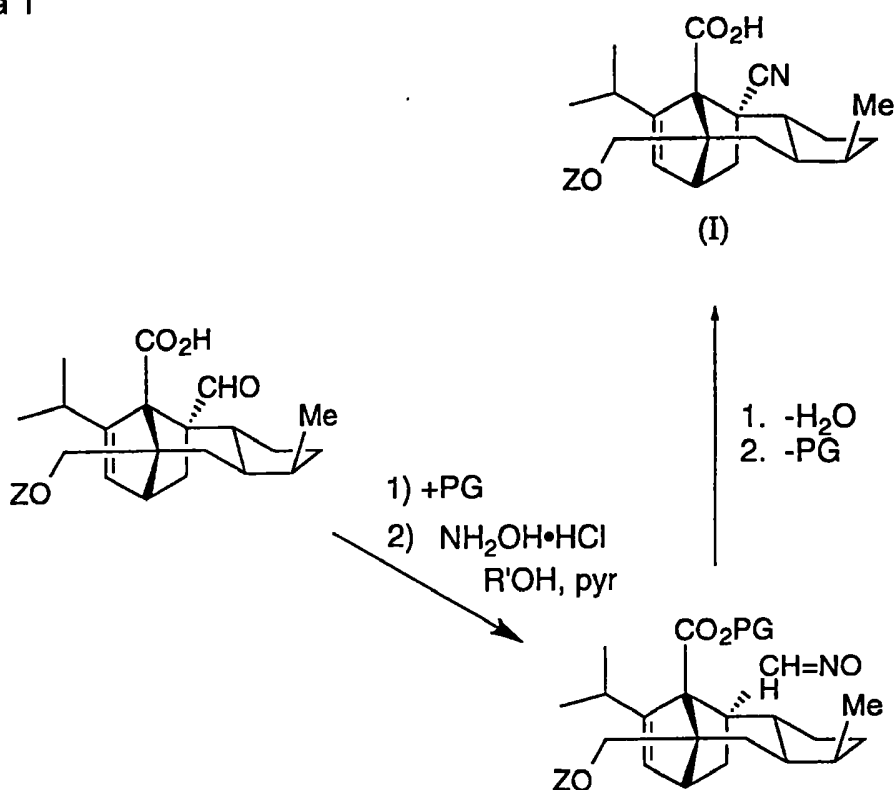
Ak sa fermentácia musí uskutočňovať v tankových fermentoroch, je potrebné vytvoriť vegetatívne inokulum v nutričnom médiu inokuláciou médiovej kultúry zo šikmej kultúry, lyofilizovanej kultúry alebo zmrazenej kultúry organizmu. Potom, ako sa týmto spôsobom získa inokulum, sterilne sa prenesie do média fermentačného tanku. Produkcia požadovanej zlúčeniny v tankových fermentoroch zvyčajne dosiahne optimum po 7 až 21 dňoch inkubovania. Trepanie v tankovom fermentore sa uskutočňuje miešaním a prevzdušňovanie je možné dosiahnuť injekciou vzduchu alebo kyslíka do pretrepávanej zmesi. Produkciu zlúčeniny je možné monitorovať použitím chromatografických alebo spektroskopických techník alebo bežným biologickým testom.

Sordarín je možné jednoducho izolovať z fermentačného média extrakciou celého média s organickým rozpúšťadlom ako metyletylketónom. Zlúčeniny sa môžu purifikovať použitím štandardných spôsobov, ktoré sú dobre známe v oblasti, ako napríklad gélovou filtračnou chromatografiou, chromatografiou na tenkej vrstve, kvapalnou chromatografiou s vysokou rozlišovacou schopnosťou, koncentráciou, precipitáciou a/alebo kryštalizáciou alebo ich kombináciou. Alternatívne je možné celé médium alebo jeho organický extrakt vysušiť sprejovaním alebo vymrazením, a potom nasleduje vyššie opísaná purifikácia.

Zlúčeniny podľa vynálezu (všeobecného vzorca I) je možné pripraviť spôsobom opísaným nižšie. Uvedené podmienky nie sú mienené ako obmedzujúce.

Ako je ilustrované v schéme 1, zlúčeniny vzorca I, kde Z je (a) alebo (b), môžu byť pripravené z východiskových materiálov opísaných v PCT prihláške WO96/14326 alebo z východiskových zlúčenín opísaných v PCT prihláške WO96/14327 pre zlúčeniny všeobecného vzorca I, kde Z je (c). Z karboxylových kyselín východiskového materiálu je možné vytvoriť deriváty s vhodnými ochrannými skupinami (tzn. benzylom alebo *p*-metoxybenzylom) a aldoxím sa vytvára reakciou s hydrochloridom hydroxylamínu v alkoholovom rozpúšťadle s obsahom pyridínu. Aldoxím sa transformuje na nitrilovú skupinu s vhodným dehydratačným činidlom (tzn. (vnútornou soľou hydroxidu (metoxykarbonylsulfamoyl)trietylammónneho alebo chloridom kyanurónovým) a odstráni sa ochranná skupina, čím sa získa zlúčenina všeobecného vzorca I.

Schéma 1



R'OH je nižšie alkylalkoholové rozpúšťadlo;

PG je ochranná skupina karboxylovej kyseliny;

Z je rovnaké ako je definované vyššie alebo vhodne chránený derivát.

Zlúčeninu vzorca I(d) je možné pripraviť ako je ilustrované v schéme 2. Sordarín je vhodne chránený a aldehyd reaguje s hydrochloridom hydroxylamínu v alkoholovom rozpúšťadle v prítomnosti pyridínu. Výsledný aldoxím sa dehydratuje s reakčným činidlom akým je vnútorná soľ (metoxykarbonylsulfamoyl)trietyl-amóniumhydroxidu alebo kynurónový chlorid, čím vzniká nitrilová zlúčenina vzorca IV. Výsledkom odstránenia ochranných skupín (PG) je zlúčenina I(d).

Schéma 2

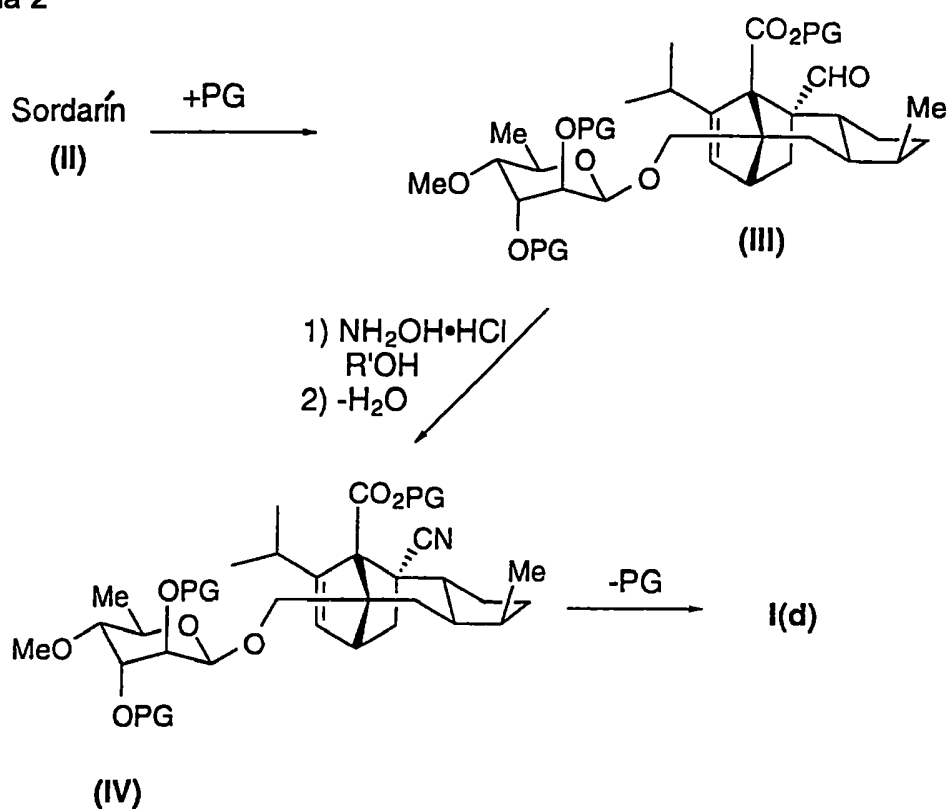
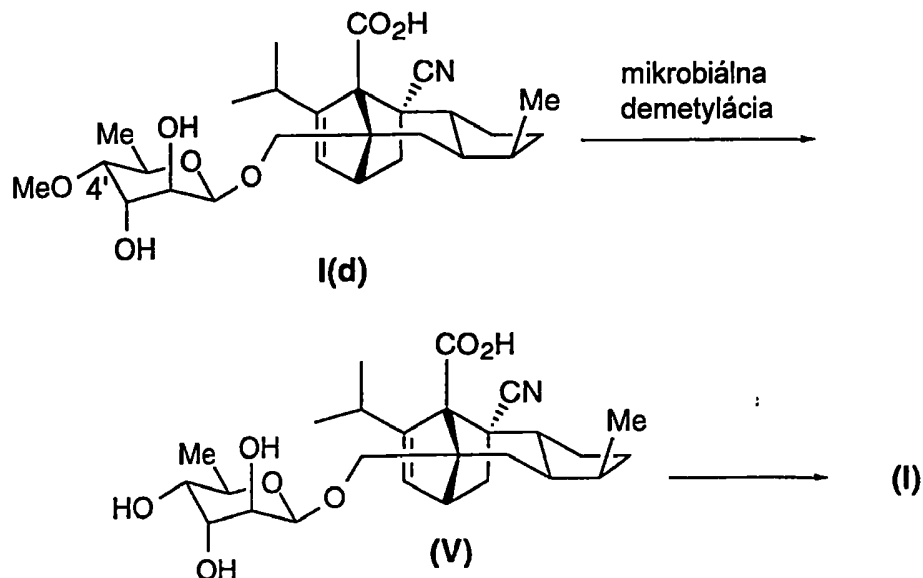


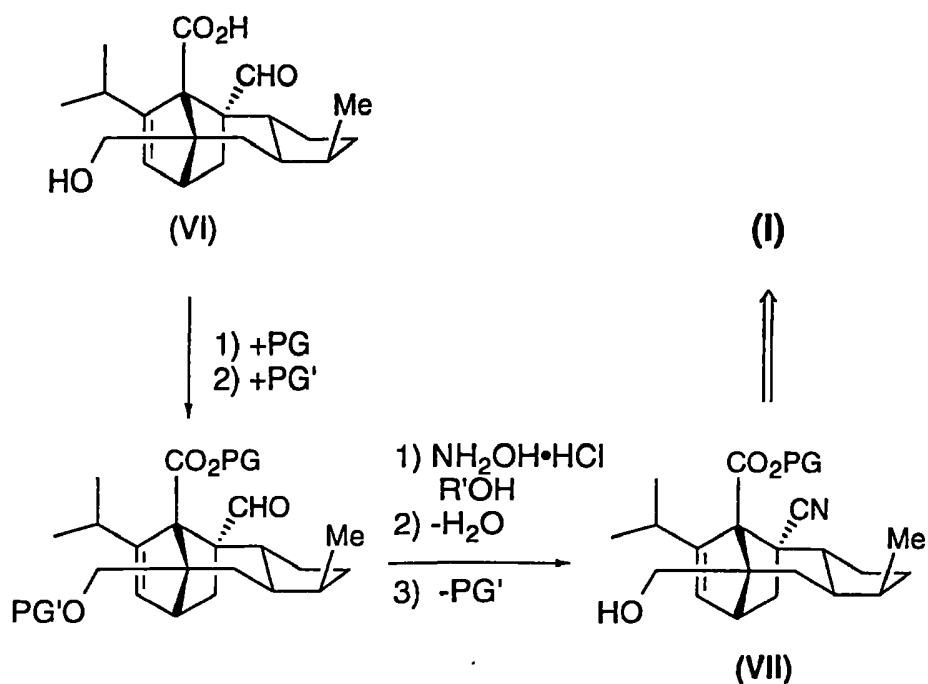
Schéma 3 znázorňuje mikrobiálnu demetyláciu 4'-metoxy skupiny zlúčeniny I(d), čím vzniká zlúčenina V. Demetylácia sa uskutočňuje uvedením zlúčeniny vzorca I(d) do kontaktu s kultúrou kmeňa *Streptomyces avermitilis* vo fermentačnom médiu, ktoré obsahuje asimilačné zdroje uhlíka a dusíka; a izoláciou zlúčeniny V z fermentačného média. Vhodné kmene *Streptomyces avermitilis* zahŕňajú kmeň MA4848, ktorý je uložený v American Type Culture Collection, Rockville, MD ako ATCC 31272. Zlúčenina V sa môže použiť na syntézu zlúčeniny všeobecného vzorca I.

Schéma 3



Alternatívne, ako je znázornené v schéme 4, je možné sordaricín VI použiť ako východiskovú zlúčeninu na syntézu zlúčenín všeobecného vzorca I. Vytvorenie derivátov kyseliny karboxylovej s vhodnou ochrannou skupinou a následná ochrana primárnej hydroxylovej skupiny, umožňuje syntézu nitril-aglykónovej zlúčeniny VII reakciou s hydrochloridom, a potom nasleduje dehydratácia a odstránenie hydroxylovej ochrannej skupiny. Pripojenie vhodného sacharidu alebo modifikovaného sacharidového substrátu spôsobmi známymi priemernému odborníkovi v oblasti, poskytne zlúčeniny všeobecného vzorca I.

Schéma 4



Využitie

Zlúčeniny všeobecného vzorca I sú antifungálne činidlá užitočné ako humánne a živočíšne liečivá, ako aj rastlinné ochranné látky.

Zlúčeniny všeobecného vzorca I sú veľmi účinné fungicídy užitočné na ničenie hubových infekcií u zvierat, vrátane ľudí. Môžu byť použité napríklad na liečbu hubových infekcií spôsobených organizmami takých druhov, akými sú *Candida* (napr. *Candida albicans*, *Candida glabrata*, (*Torulopsis glabrata*), *Candida tropicalis* a *Candida pseudotropicalis*), *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus* Sp. (napr. *Aspergillus flavus* a *Aspergillus fumigatus*), *Coccidioides* (napr. *Coccidioides immitis*), *Paracoccidioides* (napr. *Paracoccidioides brasiliensis*), *Histoplasma* (napr. *Histoplasma capsulatum*) alebo *Blastomyces* (napr. *Blastomyces dermatitidis*). Môžu byť použité aj na liečbu iných hubových infekcií spôsobených druhmi *Trichophyton*, *Microsporum* alebo *Epidermophyton* (napr. *Trichophyton mentographytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* alebo *Epidermophyton floccosum*) alebo na liečbu slizničných infekcií spôsobených *Candida albicans*.

Zlúčeniny všeobecného vzorca I je možné použiť aj na liečbu iných infekcií, ktoré sú spôsobené druhmi vlákňitých húb, ako *Geotrichum* (napr. *Geotrichum clavatum*), *Trichosporon* (napr. *Trichosporon beigeli*), *Blastoschizomyces* (napr. *Blastoschizomyces capitatus*), *Sporothrix* (napr. *Sporothrix schenckii*), *Scedosporium* (napr. *Scedosporium apiospermum*), *Cladosporium* (napr. *Cladosporium carrionii*) a *Pityrosporum ovale*.

Zlúčeniny všeobecného vzorca I je možné použiť aj na liečbu infekcií spôsobených protozoa, ako *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Leishmania*, *Tripanosoma*, *Giardia* a *Trichomonas*.

In vitro zhodnotenie anti-fungálneho účinku zlúčenín podľa vynálezu sa uskutočňovalo v kvapalnom alebo tuhom médiu technikou antifungálneho dvojnásobného sériového riedenia, ktorou sa stanovuje minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) antifungálneho činidla, ktorá inhibuje vývoj rasu po 24 až 48 hodinách pri 35 °C. V praxi sa inokulovali série agarových platní alebo médiové

mikroriediace panely, ktoré obsahovali dvojnásobné riedenia testovaného antifungálneho činidla, so štandardnou kultúrou klinicky relevantného patogénu, napríklad s *Candida albicans*. Agarové platne alebo médiové mikroriediace panely sa potom skúmali z hľadiska prítomnosti alebo absencie rastu huby a zaznamenávali sa príslušné MIC hodnoty. Vizualizácia výsledkov sa uskutočnila za pomoci vitálneho kmeňa Alamar Blue.

In vivo zhodnotenie zlúčenín všeobecného vzorca I sa môže uskutočňovať v sériách dávok podávaním (napr. subkutánne, orálne, intraperitoneálne alebo intravenózne) myšiam inokulovaným intravenózne s kmeňmi *Candida spp.* Obličky testovaných zvierat sa môžu odstrániť a kvantitatívne sa môžu zhodnotiť z hľadiska životaschopných *Candida spp.* a redukcia infekcie sa môže stanoviť relatívne ku neošetreným kontrolným zvieratám.

Čo sa týka antifungálneho účinku, zlúčeniny všeobecného vzorca I sú užitočné na liečbu a/alebo prevenciu rôznych hubových infekcií ľudí a zvierat. Takéto infekcie zahŕňajú povrchové, kutánne, subkutánne a systémové mykotické infekcie, ako infekcie respiračného traktu, infekcie gastrointestinálneho traktu, kardiovaskulárne infekcie, infekcie močového traktu, infekcie CNS, kandidózu a chronickú mukokandidózu (napr. afty a vaginálnu kandidózu) a kožné infekcie spôsobené hubami, kutánne a mukokutánne kandidózy, dermatofytózy vrátane epidermofýciovej a tinea infekcie, atletickú nohu, paronychiu, pityriasis versicolor, erytrazmu, intertrigo, hubový zápal, candida vulvitis, candida balanitis a zápal vonkajšieho ucha. Môžu byť použité aj ako profylaktické činidlá na prevenciu systémových a topických hubových infekcií. Použitie ako profylaktických činidiel môže byť napríklad ako vhodná časť liečebného procesu na selektívnu dekontamináciu čriev pri prevencii infekcie pacientov s oslabeným imunitným systémom (napr. pacientov s AIDS, pacientov, ktorý sa podrobujú rakovinovej terapii alebo pacientov, ktorým sa zaviedli transplantáty). Želateľná môže byť aj prevencia nadmerného rastu húb počas liečby antibiotikami pri niektorých chorobných syndrómoch alebo pri iatrogénnych stavoch.

Zlúčeniny všeobecného vzorca I môžu byť použité aj ako širokospektrálne antifungálne činidlá a sú účinné voči širokému spektru fytopatogénnych húb, najmä húb z tried, ktoré zahŕňajú: *Deuteromycetes* (napr. *Botrytis* spp., *Septoria* spp., *Pyricularia* spp., *Stagnospora* spp., *Helminthosporium* spp., *Fusarium* spp., *Cercospora* spp., *Rhynchosporium* spp., *Pseudocercospora* spp. a *Alternaria* spp.); *Basidiomycetes* (napr. *Puccinia* spp., *Rhizoctonia* spp. a *Hemileia*); *Ascomycetes* (napr. *Venturia* spp., *Podosphaera* spp., *Erysiphe* spp., *Monilinia* spp. a *Uncinula* spp.); a *Oomycetes* (napr. *Phytophthora* spp., *Pernospora* spp., *Bremia* spp., *Pythium* spp., a *Plasmopara* spp.). Vo vyššie uvedenom zozname sú uvedené príklady fytopatogénnych húb, voči ktorým, ako sa ukázalo, sú účinné menované zlúčeniny, ale žiadnym spôsobom nie sú obmedzené. Tieto zlúčeniny majú veľmi výhodné liečebné a preventívne fungicídne vlastnosti na ochranu rastlín, a môžu byť použité na inhibíciu alebo zničenie organizmov vyskytujúcich sa na rastlinách alebo na častiach rastlín (plod, kvet, listy, stonky, hľuzy alebo korene) rôznych úžitkových plodín, pričom časti rastlín, ktorá narastú neskôr sú tiež chránené voči takýmto mikroorganizmom. Môžu byť použité aj ako moridlá na ošetrovanie rastlinného rozmnožovacieho materiálu, najmä semien (plod, hľuza, zrno) a rastlinných rezov (napríklad ryža), na poskytnutie ochrany voči hubovým infekciám a fytopatogénnym hubám, ktoré sa nachádzajú v pôde. Zlúčeniny všeobecného vzorca I podľa vynálezu sa vyznačujú tým, že sú veľmi dobre tolerované rastlinami a sú šetrné voči životnému prostrediu.

Poľnohospodárske zhodnotenie zlúčenín všeobecného vzorca I sa môže uskutočňovať použitím nasledujúcich testov.

1. Pôsobenie proti *Erysiphe graminis* na pšenici

a) Po týždňovej kultivácii sa rastliny pšenice nasprejovali sprejovou zmesou (200ppm účinná zložka/ 20% acetón/ 0,25% TritónX155) tak, že z nich stekala. Po dvoch hodinách sa ošetrované rastliny infikovali s askospórami vytrasenými s inokulačných rastlín. Hubový útok sa zhodnotil po 8 dňovej inkubácii pri 22 °C, pri 50% relatívnej vlhkosti, aby sa stanovila ochrana poskytovaná zlúčeninou.

b) Po týždňovej kultivácii sa pšeničné rastliny infikovali askospórami vytrasenými z inokulačných rastlín. Po 24 hodinách sa na pšeničné rastliny nasprejovala sprejová zmes (200ppm účinná zložka/ 20% acetón/ 0,25% Triton X155). Hubový útok sa zhodnotil po 8 dňovej inkubácii pri 22 °C, pri 50% relatívnej vlhkosti, aby sa stanovila ochrana poskytovaná zlúčeninou.

c) Po týždňovej kultivácii sa pšeničné rastliny infikovali s askospórami vytrasenými z inokulačných rastlín. Po 24 hodinách sa pôda, v ktorej sa pestovali pšeničné rastliny, premočila so zmáčacou zmesou (200ppm účinná zložka/ 20% acetón/ 0,25% Triton X155). Hubový útok sa zhodnotil po 8 dňovej inkubácii pri 22 °C, pri 50% relatívnej vlhkosti, aby sa stanovila ochrana poskytovaná zlúčeninou.

2. Pôsobenie proti *Puccinia recondita* na pšenici

a) Po týždňovej kultivácii sa rastliny pšenice nasprejovali sprejovou zmesou (200ppm účinná zložka/ 20% acetón/ 0,25% TritonX155) tak, že z nich stekala. Po 2 hodinách sa ošetrované rastliny infikovali so spórami. Hubový účinok sa zhodnotil po dennej inkubácii pri 95 až 100% relatívnej vlhkosti, pri 20 °C, potom nasledovalo 7 dní pri 25 °C, pri 50% relatívnej vlhkosti, aby sa stanovila ochrana poskytnutá zlúčeninou.

b) Po týždňovej inkubácii sa pšeničné rastliny infikovali so spórovou suspenziou. Po 24 hodinách sa infikované rastliny nasprejovali so sprejovou zmesou (200ppm účinná zložka/ 20% acetón/ 0,25% Triton X155) tak, že z nich stekala. Hubový útok sa zhodnotil po jednodňovom inkubovaní pri 95 až 100% relatívnej vlhkosti, pri 20 °C, po ktorej nasledovalo 7 dní, pri 25 °C, pri 50% relatívnej vlhkosti, aby sa stanovil stupeň liečebného účinku, ktorý poskytuje zlúčenina.

c) Po týždňovej inkubácii sa pšeničné rastliny infikovali so spórovou suspenziou. Po 24 hodinách sa pôda, v ktorej pšeničné rastliny rástli, zmáčala v zmáčacej zmesi (200ppm účinná zložka/ 20% acetón/ 0,25% Triton X155). Hubový útok sa zhodnotil po jednodňovom inkubovaní pri 95 až 100% relatívnej vlhkosti, pri 20 °C, po ktorej nasledovalo 7 dní, pri 25 °C, pri 50% relatívnej vlhkosti, aby sa stanovil stupeň liečebného účinku, ktorý poskytuje zlúčenina.

Na základe spektra účinku je možné zlúčeniny podľa vynálezu použiť na ochranu alebo zbavenie rastlín fytopatogénnych húb, ktoré ovplyvňujú rôzne užitočné plodiny. Nasledujúce druhy rastlín sú vhodné ako materiál pre použitie uvedených zlúčenín podľa vynálezu: obilniny (napr. pšenica, raž, ovos, jačmeň, ryža, čirok a príbuzné plodiny); repa (cukrová repa a krmná repa); jadroviny, kôstkoviny a mäkké ovocie (napr. jablká, hrušky, slivky, broskyne, mandle, čerešne, jahody, maliny a černice); strukoviny (napr. fazuľa, hrach a sója); olejové rastliny (repka olejná, horčica, mak, olivy, slnečnice, kokosové rastliny, ricínové rastliny, kakaové bôby a podzemnica olejná); Cucurbitaceae (napr. uhorka, akákoľvek dyňová zelenina a melón); vláknité rastliny (napr. bavlna, ľan, konope a juta); citrusové plody (napr. pomaranče, citróny, mandarínky a grapefruity); zelenina (napr. šalát, kapusta, kel, špenát, mrkva, asparágus, paprika, cibuľa, rajčiny a zemiaky); Lauraceae (avokádo, škorica a gáfor); alebo rastliny ako kukurica, tabak, lieskovce, káva, cukrová trstina, čajovník, vínná réva, chmeľ, banánovník a kaučukovník, ako aj okrasné rastliny (kvety, kroviny, listnaté stromy a vždyzelené rastliny, ako ihličnany). Avšak vyššie uvedené rastlinné druhy nepredstavujú obmedzujúci zoznam rastlín vo vzťahu k spektru uvedených zlúčenín.

Zlúčeniny všeobecného vzorca I sú užitočné najmä na kontrolu nasledujúcich rastlinných chorôb:

Erysiphe graminis na obilninách, *Erysiphe cichoracearum* a *Sphaerotheca fuliginea* na Cucurbitaceae, *Podosphaera leucotricha* na jablkách, *Uncinula necator* na vínnej réve, *Puccinia species* na obilninách, *Rhizoctonia solani* na bavľne, *Ustilago species* na obilninách a cukrovej trstine, *Venturia inaequalis* (chrastavitosť) na jablkách, *Helminthosporium species* na obilninách, *Septoria nodorum* na pšenici, *Botrytis cinerea* (sivá pleseň) na jahodách a hrozne, *Cercospora arachidicola* na

podzemnici olejnej, *Pseudocercospora herpotrichoides* na pšenici a jačmeni, *Pyricularia oryzae* na ryži, *Phytophthora infestans* na zemiakoch a rajčinách, *Fusarium* a *Verticillium species* na rôznych rastlinách, *Plasmopara viticola* na hrozne, *Alternaria species* na ovoci a zelenine. Zlúčeniny všeobecného vzorca I je možné použiť aj ako ochranné materiály (napr. na ochranu dreva voči *Paecilomyces variotii*).

Farmaceutické prostriedky

Hoci je možné, aby sa zlúčeniny podľa vynálezu podávali na terapiu ako nespracovaná chemická látka, výhodné je, aby bola účinná zložka prítomná vo farmaceutickom prostriedku. Takže vynález ďalej poskytuje farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje zlúčeninu všeobecného vzorca I alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ spolu s jedným alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi a voliteľne spolu s inými terapeutickými a/alebo profylaktickými zložkami. Nosič (nosiče) musí byť "prijateľný" v tom zmysle, že musí byť kompatibilný s inými zložkami prostriedku a nesmie byť škodlivý pre recipienta.

Zlúčeniny podľa vynálezu zahŕňajú zlúčeniny, ktoré sú špeciálne formulované na orálne, bukálne, parenterálne, implantátové, rektálne, topické, oftalmické alebo genito-urinárne podanie alebo sú vo forme vhodnej na podanie inhaláciou alebo insufláciou.

Tablety a kapsuly na orálne podanie môžu obsahovať bežné vehikulá ako väzobné činidlá, napríklad sirup, akáciovú želatínu, želatínu, sorbitol, traganť, škrobové lepidlo alebo polyvinylpyrolidón; náplne, napríklad laktózu, sacharid, mikrokryštalickú celulózu, kukuričný škrob, fosforečnan vápenatý alebo sorbitol; lubrikanty, napríklad stearan horečnatý, kyselinu steárovú, mastenec, polyetylénglykol alebo kremičitan; dezintegranty, napríklad zemiakový škrob alebo sodný škrobový glykolát alebo kroskarmelózu sodnú; alebo zmäčacie činidlá ako laurylsulfát sodný. Tablety, ktoré zahŕňajú žuvateľné, disperzibilné a šumivé tablety, je možné obaliť spôsobmi, ktoré sú v oblasti dobre známe. Orálne kvapalné prípravky môžu byť napríklad vo forme vodných alebo olejových suspenzií, roztokov, emulzií, sirupov alebo elixírov alebo môžu byť vo forme suchého produktu

na konštitúciu s vodou alebo iným vhodným vehikulom pred použitím. Takéto kvapalné prípravky môžu obsahovať bežné aditíva ako suspendačné činidlá, napríklad sorbitolový sirup, metylcelulózu, glukózový/sacharidový sirup, želatínu, hydroxyetylcelulózu, karboxymetylcelulózu, gél zo stearátu hlinitého alebo hydrogenované jedlé tuky; emulzifikačné činidlá, napríklad lecitín, sorbitan, monooleát alebo akáciovú želatínu; nevodné vehikulá (ktoré môžu zahŕňať jedlé oleje), napríklad mandľový olej, frakcionovaný kokosový olej, olejové estery, propylénglykol alebo etylalkohol; a konzervačné látky, napríklad metyl alebo propyl *p*-hydroxybenzoáty alebo kyselinu sorbovú.

Prostriedok na bukálne podanie môže byť vo forme tabliet alebo pastiliek formulovaných bežným spôsobom.

Prostriedok podľa vynálezu môže byť formulovaný na parenterálne podanie injekciou alebo kontinuálnou infúziou. Injekčné prostriedky môžu byť vo forme dávkovacích jednotiek v ampulách alebo v multidávkových kontajneroch s pridanými konzervačnými látkami.

Prostriedky môžu byť vo forme suspenzií, roztokov alebo emulzií v olejových alebo vodných vehikulách a môžu obsahovať formulačné činidlá, ako suspendačné, stabilizačné a/alebo dispergačné činidlá.

Alternatívne môže byť účinná zložka vo forme prášku na konštitúciu s vhodným vehikulom pred použitím, napr. sterilnou vodou bez pyrogénu.

Na podávanie inhaláciou sú prostriedky podľa vynálezu bežne dodávané vo forme aerosolového spreja zo stlačených vakov, s použitím vhodnej hnacej zmesi, napr. dichlórdifluórmétánu, trichlórfuórmétánu, dichlórtetrafluóretánu, oxidu uhličitého alebo iného vhodného plynu alebo z rozprašovača. V prípade stlačeného aerosolu je možné dávkovú jednotku stanoviť poskytnutím ventilu na dodanie odmeraného množstva.

Alternatívne môžu byť na podanie inhaláciou prostriedky podľa vynálezu vo forme suchej práškovej kompozície, napríklad ako prášková zmes zlúčeniny a vhodnej práškovej bázy, ako laktózy alebo škrobu alebo môže byť v modifikovanej fyzikálnej forme len samotná liečivá látka. Práškový prostriedok môže byť v jednotkovej dávkovej forme, napríklad v kapsulách alebo náplniach, napr. želatíne

alebo v blistrových baleniach, z ktorých sa prášok môže podávať za pomoci inhalátora alebo insuflátora.

Prostriedky môžu byť vo forme čapíkov, napríklad s obsahom bežného čapíkového základu alebo vo forme pesaru, napr. s obsahom bežného pesarového základu.

Prostriedky môžu byť formulované aj na topické podanie vo forme masťi, krémov, gélov, pleťových vôd, šampónov, práškov (vrátane sprejových práškov), pesarov, tampónov, sprejov, mastičiek, aerosolov, kvapiek (napr. očných ušných alebo nosných) alebo náterov.

Masti a krémy môžu byť napríklad formulované s vodným alebo olejovým základom s pridaním vhodného hustiaceho a/alebo gélovacieho činidla. Masti na podanie do oka môžu byť vyrábané sterilným spôsobom použitím sterilných zložiek. Nátery môžu byť formulované napríklad na veterinárne použitie v olejoch s obsahom organických rozpúšťadiel, voliteľne s formulačnými činidlami, napríklad stabilizačným a solubilizačnými činidlami. Pesary a tampóny na zasunutie do vagíny môžu byť formulované použitím bežných techník, a ak je to vhodné, môžu obsahovať šumivé vehikulum. Takéto prostriedky môžu obsahovať aj iné účinné zložky ako kortikosteroidy, antibiotiká alebo antiparazitiká, ak je to vhodné.

Kvapalné prostriedky na intranazálne podanie môžu byť vo forme roztokov alebo suspenzií a môžu obsahovať bežné vehikulá, ako činidlá upravujúce tonicitu, chlorid sodný, dextrózu alebo manitol; konzervačné látky, napríklad benzalkónium chlorid, tiomerzal, fenyletyalkohol; a iné formulačné činidlá, ako suspendačné, tlmiace, stabilizačné, disperzačné a/alebo chuťové činidlá.

Transdermálne podanie sa môže uskutočňovať navrhnutím vhodného systému, ktorý sprostredkuje absorpciu účinnej zlúčeniny cez kožu a typicky by pozostával zo základnej formulácie zabalenej vo vnútri adhezívnej lepivej náplasti, ktorá obsahuje zadné filmy, membrány a vylučovacie línie. Takýto systém môže obsahovať posilňovače absorpcie, ako alkoholy alebo môže fungovať napomáhaním iónofórze.

Prostriedok podľa vynálezu môže byť vo forme prípravku s predĺženým účinkom. Takéto dlhoúčinkujúce prostriedky je možné podávať implantáciou

(napríklad subkutánnou alebo intramuskulárnou) alebo intramuskulárnou injekciou. Takže zlúčenina podľa vynálezu môže byť formulovaná napríklad s vhodnými polymérnymi alebo hydrofóbnymi materiálmi (napríklad ako emulzia v prijateľnom oleji) alebo s iónovými výmennými živcami, alebo ako stredne rozpustný derivát, napríklad ako stredne rozpustná soľ.

Ak prostriedky obsahujú dávkové jednotky, každá jednotka bude výhodne obsahovať 0,001 mg až 1000 mg, výhodne 0,01 mg až 400 mg účinnej zložky, keď sa má zlúčenina podľa vynálezu podávať orálne. Denná dávka používaná na liečbu dospelého človeka bude výhodne v rozsahu od 0,001 mg do 5000 mg účinnej zložky, najvýhodnejšie od 0,01 mg do 2000 mg, pričom sa môže podávať v 1 až 4 denných dávkach, v závislosti napríklad na spôsobe podania a na stave pacienta a na ochorení, ktoré sa lieči.

Zlúčenina sa môže podávať intravenóznou infúziou, napríklad použitím až 50 mg/kg/deň účinnej zložky. Trvanie liečby bude diktované rýchlosťou odpovede, a nie zvoleným počtom dní.

Zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť použité aj v kombinácii s inými terapeutickými činidlami, a vynález tak poskytuje v ďalšom uskutočnení kombináciu, ktorá zahŕňa zlúčeninu podľa vynálezu spolu s iným terapeuticky účinným činidlom.

Takže zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť použité napríklad v kombinácii s jedným alebo viacerými antifungálnymi činidlami, ako polyénovými derivátmi napr. (Amfotericín B, Nystatín, lipidová formulácia Amfotericínu B), azolovým derivátom napr. (Flukonazol, Intrakonazol, Ketokonazol, Mikonazol, Klotrimazol, ZD-08070, UK-109496, SCH 56592), 5-Fluórcytozínovými, Pneumokandínovými alebo Echinokandínovými derivátmi, ako Cilofungín, LY-303366, L-733560, L-743872 alebo s inými zlúčeninami pôsobiacimi na bunkovú stenu, ako Nikkomycín Z a/alebo s jedným alebo viacerými imunomodulačnými činidlami, ako interferón, napr. (IFN-), interleukín napr. (IL-1, IL-2, IL-3 a IL-8) a faktory stimulujúce kolónie, [(G)-CSF, (M)-CSF a (GM)-CSF] a defenzíny. Výhodnými zlúčeninami na použitie so zlúčeninami podľa vynálezu sú najmä Intrakonazol, Flucytozín, Flukonazol alebo Amfotericín B.

Keď sú zlúčeniny podľa vynálezu podávané v kombinácii s iným antifungálnym činidlom, môžu byť zlúčeniny podľa vynálezu a iné fungálne činidlo podávané v doporučenej maximálnej klinickej dávke alebo v nižších dávkach.

Kombinácie uvedené vyššie môžu byť bez problémov poskytnuté na použitie vo forme farmaceutického prostriedku, takže ďalším uskutočnením vynálezu sú farmaceutické prostriedky, ktoré obsahujú kombináciu definovanú vyššie, spolu s farmaceuticky prijateľným nosičom. Jednotlivé zložky takýchto kombinácií môžu byť podávané buď postupne, alebo simultánne, v oddelených alebo kombinovaných farmaceutických prostriedkoch.

Keď sa zlúčenina podľa vynálezu používa v kombinácii s druhým terapeutickým činidlom, môžu sa dávky každej zlúčeniny odlišovať od dávok, ktoré sa aplikujú, keď sa zlúčenina použije za rovnakých podmienok samostatne. Priemerný odborník v oblasti je schopný jednoducho stanoviť príslušné dávky.

Agrochemické prostriedky

Zlúčeniny všeobecného vzorca I je možné použiť buď v nemodifikovanej forme, alebo výhodne spolu s adjuvans, ktoré sú bežne používané v oblasti agrochemických formulácií, a pre tieto účely sú známe najmä ako: emulzifikovateľné koncentráty, pokrývateľné pasty, priamo sprejovateľné alebo riediteľné roztoky, riedený roztok, suspenzie (vrátane suspenzií s vysokým percentom vody, olejových a iných suspenzií), disperzie, olejové disperzie, rozsievacie činidlá, zmáčateľné prášky, rozpustné prášky, prachy, granuly a enkapsulácie. Formulácie sa pripravujú známym spôsobom, napr. homogénnym mixovaním a/alebo mletím účinných zložiek s extendermi, napr. rozpúšťadlami, tuhými nosičmi a, ak je to vhodné, povrchovo aktívnymi zlúčeninami (surfaktantami). Prášky, prachy a rozsievacie činidlá sa môžu pripraviť zmiešaním alebo zomletím účinných zložiek s tuhým nosičom. Granuly, napr. potiahnuté, impregnované alebo homogénne granuly, je možné pripraviť naviazaním účinných zložiek na tuhé nosiče.

Vhodnými rozpúšťadlami sú: aromatické uhľovodíky, výhodne frakcie s obsahom 8 až 12 atómov uhlíka, ako xylénové zmesi alebo substituované

naftalény, chlórované aromatické zlúčeniny, ako chlórbenzény, ftaláty, ako dibutyl- alebo dioktylftalát, alifatické uhľovodíky, ako cyklohexán alebo parafíny, alkoholy a glykoly a ich étery a estery, ako etanol, etylénglykol, etylénglykolmonometyl- alebo monoetyléter, ketóny ako cyklohexanón, amíny, ako etanolamín, silné polárne rozpúšťadlá, ako *N*-metyl-2-pyrolidón, dimetylsulfoxid alebo dimetylformamid, a rastlinné oleje, ako epoxidovaný kokosový olej alebo sójový olej; a voda.

Príkladmi povrchovo aktívnych látok sú: soli aromatických sulfónových kyselín s alkalickými kovmi a s kovmi alkalických zemín, napr. soli kyseliny lignínsulfónovej, kyseliny fenolsulfónovej, kyseliny naftalénsulfónovej a kyseliny dibutylnaftalénsulfónovej, a soli mastných kyselín, alkyl- a alkylarylsulfonáty a sulfáty alkylu, lauryléteru a mastných alkoholov, a soli sulfonovaných hexadekanolov, heptadekanolov a oktadekanolov, soli mastných alkoholových glykoléterov, kondenzačné produkty sulfonovaného naftalénu a naftalénových derivátov s formaldehydom, kondenzačné produkty kyseliny naftalénovej alebo kyseliny naftalénsulfónovej s fenolom a formaldehydom, polyoxyetylénoktylfenolétery, etoxylovaný izooktylfenol, etoxylovaný oktylfenol a etoxylovaný nonylfenol, alkylfenolpolyglykolétery, tributylfenylpolyglykolétery, alkylarylpoliéteralkoholy, izotridecylalkohol, kondenzáty mastného alkoholového etylénoxidu, etoxylovaný ricínový olej, polyoxyetylénalkylové étery, etoxylovaný polyoxypropylén, acetál laurylalkoholpolyglykoléteru, estery sorbitolu, lignín-sulfitové odpadové tekutiny a metylcelulóza.

Príkladmi tuhých nosičov sú minerálne zeminy, ako kremičité kyseliny, kremičité gély, kremičitany, mastenec, kaolín, atapulgový íl, vápenec, vápno, krieda, poliment, spraš, íl, dolomit, kremelina, síran hlinito-vápenatý, síran horečnatý, oxid horečnatý, podkladové plasty, hnojivá, ako síran amónny, fosforečnan amónny a močovina a rastlinné produkty, ako obilná múka, kôrová múka, drevná múka a škrupinová múka, celulózové prášky, atď.

Zlúčeniny všeobecného vzorca I sa môžu zmiešať a aplikovať spolu s inými účinnými zložkami, napríklad herbicídmi, insekticídmi, baktericídmi, nematocídmi, moluskocídmi, rastovými regulátormi, mikronutričnými látkami a hnojivami. Ďalšími zložkami môže byť aj jeden alebo viacero fungicídov patriacich, ale

neobmedzených, na nasledujúce triedy fungicídov: karboxamidy, benzimidazoly, triazoly, hydroxypyridíny, dikarboxamidy, fenylamidy, tiadiazoly, karbamáty, kyano-oxímy, deriváty kyseliny kinamovej, morfolíny, imidazoly, B-metoxiakryláty a pyridíny/pyrimidíny.

Navyše tieto ďalšie účinné zložky môžu byť použité ako zmesi niekoľkých prípravkov, ak je to želateľné, spolu s inými aplikačnými podpornými adjuvans, ktoré sa zvyčajne používajú v oblasti takýchto formulácií.

Vhodné nosiče a adjuvans môžu byť tuhé alebo kvapalné a zodpovedajú látkam, ktoré sa typicky používajú vo formulačnej technológii (napr. prirodzené alebo regenerované minerálne látky, rozpúšťadlá, disperganty a zmáčacie činidlá).

Nasledujúci zoznam fungicídov, s ktorými je možné kombinovať zlúčeniny všeobecného vzorca I, je mienený ako ilustrácia možných kombinácií, ale nezavádza žiadne obmedzenia. Príkladmi fungicídov, ktoré môžu byť kombinované zo zlúčeninami všeobecného vzorca I sú: síra, ditiokarbamáty a ich deriváty, ako dimetylditiokarbamát železitý, dimetylditiokarbamát zinočnatý, etylénbisditiokarbamát zinočnatý, etylénbisditiokarbamát manganatý, etyléndiamínbisditiokarbamát manganato-zinočnatý, tetrametyltiurámové disulfidy, amónny komplex *N,N'*-etylénbisditiokarbamátu zinočnatého, amónny komplex *N,N'*-propylénbisditiokarbamátu zinočnatého, *N,N'*-propylénbisditiokarbamát zinočnatý a *N,N'*-polypropylénbis(tiokarbamyl)disulfid; nitro deriváty, ako dinitro(metylheptyl)-fenylkrotonát, 2-sek-butyl-4,6-dinitrofenyl-3,3-dimetylakrylát, 2-sek-butyl-4,6-dinitrofenylizopropylkarbonát a diizopropyl-5-nitroizoftalát; heterocyklické látky, ako 2-heptadecylimidazol-2-yl-acetát, 2,4-dichlór-6-(*o*-chlóranilino)-striazín, *O,O*-dietylfthalimido-fosfonotioát, 5-amino-1-[bis(dimetylamino)-fosfynyl]-3-fenyl-1,2,4-triazol, 2,3-dikyano-1,4-ditioantrachinón, 2-tio-1,3-ditio[4,5-*b*]chinoxalín, metyl-1-(butylkarbamyl)-2-benzimidazolkarbamát, 2-metoxycarbonylaminobenzimidazol, 2-(fur-2-yl)-benzimidazol, 2-(tiazol-4-yl)benzimidazol, *N*-(1,1,2,2-tetrachlóretyltio)-tetrahydroftalimide, *N*-trichlórmetyltio-tetrahydroftalimid, *N*-trichlórmetyltioftalimid, diamid kyseliny *N*-dichlórfuórmetyltio-*N',N'*-dimetyl-*N*-fenylsírovej, 5-etoxy-3-trichlórmetyl-1,2,3-tiadiazol, 2-tiokyanátome-tyltiobenzotiazol, 1,4-dichlór-2,5-dimetoxybenzén, 4-(2-chlórfenylhydrazón)-3-metyl-5-izoxazolón, 2-tiopyridín-1-oxid, 8-hydroxychinolín

a jeho med'natá soľ, 2,3-dihydro-5-karboxanilido-6-metyl-1,4-oxatín, 2,3-dihydro-5-karboxanilido-6-metyl-1,4-oxatín-4,4-dioxid, 2-metyl-5,6-dihydro-4*H*-pyrán-3-karboxanilid, 2-metylfurán-3-karboxanilid, 2,5-dimetylfurán-3-karboxanilid, 2,4,5-trimetylfurán-3-karboxanilid, 2,5-dimetyl-*N*-cyklohexylfurán-3-karboxamid, *N*-cyklohexyl-*N*-metoxy-2,5-dietylfurán-3-karboxamid, 2-metylbenzanilid, 2-jódbenzanilid, *N*-formyl-*N*-morfolín-2,2,2-trichlóretylacetál, piperazín-1,4-diylbis-(1-(2,2,2-trichlóretyl)-formamid), 1-(3,4-dichlóranilino)-1-formylamino-2,2,2-trichlóretán, 2,6-dimetyl-*N*-tridecylmorfolín a jeho soli, 2,6-dimetyl-*N*-cyklododecylmorfolín a jeho soli, *N*-[3-(*p*-*terc*-butylfenyl)-2-metylpropyl]-*cis*-2,6-dimetylmorfolín, *N*-3-(*p*-*terc*-butylfenyl)-2-metylpropyl]-piperidín, 1-2-(2,4-dichlórfenyl)-4-etyl-1,3-dioxolán-2-yl-etyl]-1*H*-1,2,4-triazol, 1-[2-(2,4-dichlórfenyl)-4-*n*-propyl-1,3,3-dioxolán-2-yl-etyl]-1*H*-1,2,4-triazole, *N*-(*n*-propyl)-*N*-(2,4,6-trichlórfenoxyetyl)-*N*-imidazolylmočovina, 1-(4-chlórfenoxy)-3,3-dimetyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-bután-2-ón, 1-(4-chlórfenoxy)-3,3-dimetyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-bután-2-ol, α -(2-chlórfenyl)- α -(4-chlórfenyl)-5-pyrimidínmetanol, 5-butyl-(2-dimetylamino-4-hydroxy-6-metylpyrimidín, bis-(*p*-chlórfenyl)-3-pyridínmetanol, 1,2-bis-(3-etoxykarbonyl-2-tioureido)-benzén, 1,2-bis-(3-metoxycarbonyl-2-tioureido)-benzén, a rôzne fungicídy, ako dodecylguanidínacetát, 3-[3-(3,5-dimetyl-2-oxycyklohexyl)-2-hydroxyetyl]-glutaramid, hexachlórbenzén, DL-metyl-*N*-(2,6-dimetylfenyl)-*N*-fur-2-ylalanát, metyl-DL-*N*-(2,6-dimetylfenyl)-*N*-(2-metoxycetyl)alanát, *N*-(2,6-dimetylfenyl)-*N*-chlórocetyl-DL-2-aminobutyrolaktón, metyl-DL-*N*-(2,6-dimetylfenyl)-*N*-(fenylacetyl)-alanát, 5-metyl-5-vinyl-3-(3,5-dichlórfenyl)-2,4-dioxo-1,3-oxazolidín, 3-[3,5-dichlórfenyl]-5-metyl-5-metoxymetyl-1,3-oxazolidín-2,4-dión, 3-(3,5-dichlórfenyl)-1-izopropylkarbamylhydantoín, *N*-(3,5-dichlórfenyl)-1,2-dimetylcyklopropán-1,2-dikarboximid, 2-kyano-[*N*-(etylaminokarbonyl)-2-metoximino]-acetamid, 1-[2-(2,4-dichlórfenyl)-pentyl]-1*H*-1,2,4-triazol, 2,4-difluór-a-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmetyl)-benzhydrylalkohol, *N*-(3-chlór-2,6-dinitro-4-trifluórmetyl-fenyl)-5-trifluórmetyl-3-chlór-2-aminopyridín a 1-((bis-(4-fluórfenyl)-metylsilyl)-metyl)-1*H*-1,2,4-triazol.

S ohľadom na povahu prostriedkov, v súlade so zamýšľaným cieľom aplikácie a prevažujúcimi okolnosťami, sa vyberá spôsob aplikácie, ako sprejovanie, atomizácia, prášenie, rozsievanie, natieranie, morenie a polievanie.

Jedným spôsobom aplikácie účinnej zložky alebo agrochemického prostriedku, ktorý obsahuje najmenej jednu zo zlúčenín uvedených v prihláške, je aplikácia na rastliny (tzn. listová aplikácia). Avšak účinná zložka môže do rastliny penetrovať aj cez korene z pôdy (tzn. pôdna aplikácia).

To sa môže uskutočniť aplikáciou kvapaliny do pôdy (zmáčaním) alebo aplikáciou granúl.

Účinná zložka sa môže aplikovať aj na rastlinný propagačný materiál, ako semená (plody, hľuzy alebo zrná) alebo rastlinné odrezky, buď v kvapalnej forme (natieranie), alebo v tuhej forme (morenie).

Osivo sa môže napríklad hnojiť pred vysievaním. Zlúčeniny podľa vynálezu sa môžu aplikovať aj na zrná, buď impregnáciou zŕn s kvapalnou formuláciou, alebo natieraním zŕn tuhovou formuláciou. Prostriedok sa môže aplikovať aj na miesto vysádzania, pri vysádzaní propagačného materiálu, napríklad do brázdy počas siatia.

Výhodné aplikačné pomery sú normálne od 10 g do 50 kg účinnej zložky (a.i.) na hektár, výhodne 100 g až 2 kg a.i./ha, najvýhodnejšie 100 g až 600 g a.i./ha. Účinné zložky, ktoré predstavujú uvedené zlúčeniny sa typicky používajú vo forme prostriedkov a môžu sa aplikovať na rastlinu alebo na časti rastliny, buď naraz, alebo následne s ďalšími účinnými zložkami. Tieto ďalšie účinné zložky môžu byť hnojivá, ďalšie mikronutričné látky alebo iné zlúčeniny, ktoré ovplyvňujú rast rastlín. Môžu to byť však aj selektívne herbicídy, insekticídy, bakteriocídy, nematocídy a moluskocídy, ako aj iné fungicídy.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príprava východiskových zlúčenín

Výroba sordarínu fermentáciou

Na fermentáciu *Rosellinia subiculata* (ATCC 74386) a ATCC 74387 na produkciu sordarínu boli použité nasledujúce médiá.

Násadové médium

Zložka	g/l
Kvasinkový extrakt	4,0
Sladový extrakt	8,0
Glukóza	4,0
Junlon	1,5

Médium sa pripravilo s destilovanou vodou, pH sa pred sterilizáciou nastavilo na 7,0. Médium sa rozdelilo po 50 ml do 250 ml Erlenmeyerových baniek bez zarážok. Použili sa bavlnené uzávery. Sterilizácia sa uskutočňovala pri 121 °C, 20 minút.

Násadové médium 2

		Roztok stopových prvkov	
Zložka	(g/l)	Zložka	(g/l)
Kukuričný výluh (sušený)	2,5	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
Rajčinová pasta	40,0	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,0
Ovsená múka	10,0	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,025
Glukóza	10,0	CaCl ₂ ·H ₂ O	0,1
Roztok stopových prvkov	10,0 ml/l	H ₃ BO ₃	0,056
		(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ ·4H ₂ O	0,019
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
		Stopové prvky sa pripravili v 0,6N HCl	

Médium sa pripravilo s destilovanou vodou, pH sa pred sterilizáciou nastavilo na 6,8. Médium sa rozdelilo po 50 ml do 250 ml Erlenmeyerových baniek bez zarážok. Použili sa bavlnené uzávery. Sterilizácia sa uskutočňovala pri 121 °C, 20 minút.

Tuhé produkčné médium 1

1. Tuhá časť

Pridať 0,675 l vermikulitu do 2-litrovej guľatej banky. Uzavrieť s latexovou zátkou; autoklávať 60 min., plus 30 min. sušiť.

2. Kvapalná časť

Do 500ml fľaše pridať 220 ml nasledujúcich zložiek:

Zložky	g/l
Glukóza	150,0
Glycerol	20,0
Kvasinkový extract	4,0
NaNO ₃	1,0
Glutamát sodný	3,0
Na ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
K-elementy	1,0 ml/l
CaCO ₃	8,0

K-elementy

Zložka	(g/l)
FeCl ₃ .6H ₂ O	5,8
MnSO ₄ .H ₂ O	0,1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,015
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,012
ZnCl ₂	0,02
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,005
H ₃ BO ₃	0,01
KCl	0,02
HCl (koncentrovaná)	2,0 ml/l

Médium sa pripravilo s destilovanou vodou, pH sa pred sterilizáciou nastavilo na 7,0. Glukóza sa autoklávovala oddelene. Médium sa naplnilo do 500ml fľaší a autoklávovalo sa pri 121 °C 15 minút.

Kvapalné produkčné médium 1

Zložka	g/l
Glycerol	75,0
Glukóza	75,0
Rajčinová pasta	5,0
NZ amín Typ A	4,0
Ardamín PH	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25
KCl	0,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
CaCO ₃	10,0

Médium sa pripravilo s destilovanou vodou, pH sa pred sterilizáciou nastavilo na 7,0. Médium sa rozdelilo po 50 ml do 250 ml Erlenmeyerových baniek bez zarážok. Použili sa bavlnené uzávery. Sterilizácia sa uskutočňovala pri 121 °C, 20 minút.

Tuhé produkčné médium 2

1. Tuhá časť

Pridať 0,675 l vermikulitu do 2-litrovej guľatej banky. Uzavrieť s latexovou zátkou; autoklávovať 60 min., plus 30 min. sušiť.

2. Kvapalná časť

Do 500ml fľaše pridať 220 ml nasledujúcich zložiek:

Zložka	g/l
Sacharóza	60,0
Glukóza	80,0
Glycerol	60,0
Kyselina citrónová	15,0
NZ amín Typ A	5,0
NaNO ₃	1,0
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
CaCO ₃	0,5
K-elementy	1 ml/l

K-elementy

Zložka	(g/l)
FeCl ₃ ·6H ₂ O	5,8
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,015
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,012
ZnCl ₂	0,02
SnCl ₂ ·2H ₂ O	0,005
H ₃ BO ₃	0,01
KCl	0,02
HCl (koncentrovaná)	2,0 ml/l

Médium sa pripravilo s destilovanou vodou, pH sa pred sterilizáciou nastavilo na 7,0. Médium sa rozdelilo po 220 ml do 500 ml fľaši a autoklávovali sa pri 121 °C, 15 minút.

Kvapalné produkčné médium 2

Zloženie je podobné ako zloženie kvapalnej časti tuhého produkčného média 1. Médium sa pripravilo s destilovanou vodou, pH sa pred sterilizáciou nastavilo na

7,0. Glukóza sa autoklávovala oddelene. Médium sa naplnilo po 50 ml do 250 ml Erlenmeyerových baniek. Fľaše sa uzavreli bavlneným úzáverom a autoklávovali sa pri 121 °C 15 minút.

Produkcia Sordarínu fermentáciou *Rosellina subiculata* (MF6239, ATCC 74386)

1. Kultúra

Časť šikmého agaru obsahujúceho kultúru sa asepticky preniesla do násadového média 1 (50 ml v 250ml fľašiach bez zarážok). Na získanie biomasy sa inkubovala táto kultúra na 2-palcovom rotačnom miešači, pri 220 otáčkach za minútu, 5 dní pri 25 °C, a 85% relatívnej vlhkosti (rh). Časti biomasy sa preniesli do sterilných skúmaviek obsahujúcich glycerol a zmrazili sa (ako zmrazené vegetatívne mycéliá (FVM)). Tieto mycéliá sa udržiavali v konečnej koncentrácii 10-15% glycerolu, pri -75 °C. Sekundárne FVMs sa pripravili z primárneho FVM prenosom 1,0 ml roztopeného primárneho FVM do násadového média 2, inkubovaním 7 dní pri 25 °C, 220 otáčkach za minútu a zmrazením ako bolo opísané vyššie.

2. Násada

Zmrazená skúmavka (FVM) s kmeňom MF6239 sa roztopila na laboratórnu teplotu a použila sa na inokuláciu násadových kultúr s 1,0 ml na 50 ml násadového média 2. Tieto kultúry rástli na rotačnom miešači (220 otáčok za minútu) 7 dní, pri 25 °C, 85% rh.

3. Produkcia

Na tuhom produkčnom médiu

Alikvot (10 až 12 ml) násady sa umiestnil do 220 ml kvapalnej časti tuhého produkčného média 1. Táto fľaša sa silne zvrátila, aby sa dispergovala biomasa. Obsahy sa vliali do 2-litrovej okrúhlej kultivačnej nádoby, ktorá obsahovala 0,675 l vermikulitu s veľkými časticami. Obsahy okrúhlej fľaše sa pretrepali/zmiešali, aby sa

zaistila homogénna inokulácia a pokrytie. Kruhové fľaše sa inkubovali horizontálne, pričom sa otáčali rýchlosťou približne 4 otáčky za minútu na Wheaton otáčacom zariadení, pri 22 °C, 70% rh, 17 dní, na získanie sekundárneho metabolitu vo fermentačnom médiu.

V kvapalnom produkčnom médiu

Násadové kultúry sa inokulovali ako je opísané vyššie. Alikvot násady (1,5 ml) sa použil na inokuláciu každej produkčnej fľaše, ktorá obsahovala 50 ml kvapalného produkčného média 1 na 250ml fľašu. Fľaše sa inkubovali na rotačnom miešači (220 otáčok za minútu) 7 až 21 dní, pri 25 °C, 50 až 85% rh.

Produkcia Sordarínu fermentáciou MF6232 (ATCC 74387)

1. Kultúra

Časť šikmého agaru obsahujúceho MF6232 sa asepticky preniesla do násadového média 1 (50 ml v 250ml fľašiach bez zarážok). Na získanie biomasy sa inkubovala táto kultúra na 2-palcovom rotačnom miešači, pri 220 otáčkach za minútu, 3 dni pri 25 °C, a 85% relatívnej vlhkosti (rh). Časti biomasy sa preniesli do sterilných skúmaviek obsahujúcich glycerol a zmrazili sa (ako FVM). Tieto mycélia sa udržiavali v konečnej koncentrácii 10 až 15% glycerolu, pri -75 °C. Sekundárne FVMs sa pripravili z primárneho FVM prenosom 1,0 ml roztopeného primárneho FVM do násadového média 2 (zloženie je uvedené nižšie), inkubovaním 7 dní pri 25 °C, 220 otáčkach za minútu a zmrazením ako bolo opísané vyššie.

2. Násada

Zmrazená skúmavka (FVM) s kmeňom MF6232 sa roztopila na laboratórnu teplotu a použila sa na inokuláciu násadových kultúr s 1,0 ml na 50 ml násadového média 2. Tieto kultúry rástli na rotačnom miešači (220 otáčok za minútu) 7 dní, pri 25 °C, 85% rh.

3. Produkcia

Na tuhom produkčnom médiu

Alikvot (10 až 12 ml) násady sa umiestnil do 220 ml tuhého produkčného média 2. Táto fľaša sa silne zvířila, aby sa dispergovala biomasa. Obsahy sa vliali do 2-litrovej okrúhlej kultivačnej nádoby, ktorá obsahovala 0,675 l vermikulitu s veľkými časticami. Obsahy okrúhlej fľaše sa pretrepali/zmiešali, aby sa zaistila homogénna inokulácia a pokrytie. Kruhovú fľašu sa inkubovali horizontálne, pričom sa otáčali rýchlosťou približne 4 otáčky za minútu na Wheaton otáčacom zariadení, pri 22 °C, 70% rh, 21 dní, na získanie sekundárneho metabolitu vo fermentačnom médiu.

V kvapalnom produkčnom médiu

Násadové kultúry sa inokulovali ako je opísané vyššie. Alikvot násady (1,5 ml) sa použil na inokuláciu každej produkčnej fľaše, ktorá obsahovala 50 ml kvapalného produkčného média 2 na 250ml fľašu. Fľaše sa inkubovali na rotačnom miešači (220 otáčok za minútu) 7 až 21 dní, pri 25 °C, 50 až 85% rh.

Produkcia Sordarínu vo veľkom meradle prostredníctvom MF6232 (ATCC 74387)

Kvapalná časť tuhého produkčného média 1 sa použila tak v násadových, ako aj produkčných fermentoroch. Cerelóza sa pridala po sterilizácii, v násadovom fermentačnom médiu bola v množstve 30 g/l, zatiaľ čo v produkčnom fermentačnom médiu bola v množstve 150 g/l. Násadové fermentory sa inokulovali s 2 l kultúry vypestovanej v pretrepávaných fľašiach. Umožnilo sa, aby tieto fermentačné zmesi rástli pri 25 °C 30 hodín, pokiaľ nebola rýchlosť príjmu kyslíka približne 3 mmol/L za hodinu. 30 hodinová, 25 litrová fermentačná násadová kultúra sa preniesla do produkčného fermentora.

Rast v produkčnom fermentore dosiahol 8 až 10 mmol/l/h po 50 hodinách a poklesol medzi 5 a 7 mmol/l/h ku koncu kultivácie. Rozpustený kyslík sa kontroloval

zvýšením premiešavania. pH média sa kontrolovalo a vo všeobecnosti pokleslo na 5,3 po 200 hodinách. Teplota bola 25 °C.

Po 280 hodinách rastu sa ukončila fermentácia a začali prípravy na izoláciu. Pomocou hydroxidu sodného sa nastavilo pH na približne 12 a dávka sa udržiavala pri fermentačnej teplote 20 hodín. Pred prenesením do bubna na ďalšie spracovanie sa potom s kyselinou sírovou nastavilo pH na 6.0.

Izolácia Sordarínu

Izolácia I

Metyletylketónový extrakt fermentačnej kultúry MF6232 (ATCC 74387) zodpovedajúci 64 ml celkového média sa *in vacuo* koncentroval do sucha (365 mg). Tento materiál sa rozpustil v 2 dieloch metanolu a v 98 dieloch metylénchloridu v konečnom objeme 4,6 ml. 4,3ml časť (341 mg) sa naniesla na 60ml silicagélovú 60 (0,040 až 0,0630 mm, 230 až 400 mesh, E. Merck) kolónu na bleskovú chromatografiu, ktorá bola ekvilibrovaná s 2% metanolom v metylénchloride. Kolóna sa eluovala krokovým gradientom, vždy s 240 ml 2%, 5%, 10% a 30% metanolu v metylénchloride a potom nasledovalo 120 ml metanolu. Pre každý rozpúšťadlový systém sa zozbieralo šesťnásť 15ml frakcií. Biologickým testom sa stanovili frakcie 39 až 56 ako frakcie bohaté na produkt.

In vacuo sa koncentrovala zásoba surovej frakcie do sucha (103,1 mg). 34,4mg podiel tejto vzorky sa ďalej purifikoval prostredníctvom HPLC separácie (Zorbax Rx-C8, 5 µm, 9,4 mm x 250 mm, eluovaný mobilnou fázou pozostávajúcou zo zmesi 20% acetonitrilu a 80% vodného 0,01M K₂HPO₄, pH nastavené na pH 6,9 s koncentrovanou H₃PO₄, rýchlosť prietoku 4 ml/min., pri 40 °C, detekcia diódovým radom). Izolovali sa mililitrové frakcie. Zhromaždili sa frakcie bohaté na produkt 16 až 20 a koncentrovali sa *in vacuo* na približne dvadsaťpäť percent pôvodného objemu. Koncentrát sa dvojnásobne extrahoval s rovnakým objemom etylacetátu a etylacetátové vrstvy sa premývali s rovnakým objemom soľného roztoku, vysušili sa na bezvodnom Na₂SO₄ a koncentrovali sa *in vacuo*, čím vzniklo 3,7 mg sordarínu.

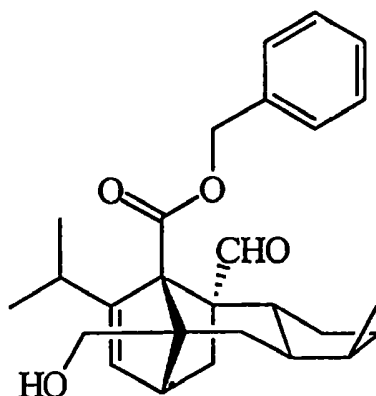
Izolácia II

Metyletylketónový extrakt dávky -004Y fermentačnej kultúry MF6232 (ATCC74387) zodpovedajúci 980 ml celkového média sa *in vacuo* zakoncentroval do sucha (4,9 g). Tento materiál sa rozpustil v 1 dieli metanolu a v 9 dieloch metylénchloridu do konečného objemu 21,5 ml. 21 ml podiel (4,8 g) sa aplikoval na 500ml silikagélovú 60 (0,040 až 0,0630 mm, 230 až 400 mesh, E. Merck) chromatografickú kolónu ekvilibrovanú 2% metanolom v metylénchloride. Kolóna sa eluovala s rýchlosťou prietoku 25 ml/min krokovým gradientom, ktorý začínal litrovými dávkami 2 a 5 percentného metanolu v metylénchloride a nasledovali dva litre 15 percentného metanolu. Kolóna sa doplnila jedným litrom 30% a jedným litrom 10% metanolu. Izolovali sa dvadsaťpäťlitrové frakcie. Frakcie bohaté na produkt 75 až 85 a 111 až 121 sa stanovili biologickým testom a frakcie obsahujúce zlúčeninu všeobecného vzorca I sa stanovili RP HPLC analýzou v kyslých podmienkach.

Zásoby surových frakcií 75 až 85 a 111 až 121 sa oddelene zakoncentrovali *in vacuo* do sucha (69,3 mg, respektíve 95,3 mg). Dva 34mg diely zásoby 75 až 85 sa ďalej purifikovali dvoma identickými HPLC separáciami (Zorbax Rx-C8, 7 μ m, 21,2 mm x 250 mm, eluovanie prebiehalo s mobilnou fázou pozostávajúcou zo zmesi 40 % acetonitrilu a 60 % H₂O s celkovým 0,1% H₃PO₄, rýchlosť prietoku 20 ml/min, pri 25 °C, 220 nm). Izolovali sa desaťmililitrové frakcie. Spojili sa na produkt bohaté frakcie 27 až 31 z oboch kôl a *in vacuo* sa zakoncentrovali na približne štyridsať percent pôvodného objemu. Koncentrát sa extrahoval s rovnakým objemom etylacetátu a premýval sa rovnakým objemom soľného roztoku, vysušil sa na bezvodnom Na₂SO₄ a koncentroval sa *in vacuo*, čím vzniklo 27 mg sordarínu. Dva 46mg podiely zásoby 111 až 121 sa tiež ďalej purifikovali HPLC za rovnakých podmienok, ako bolo uvedené vyššie. Skombinovali sa frakcie 25 až 28 z oboch kôl a pripravili sa ako bolo opísané vyššie, čím vzniklo ďalších 17 mg sordarínu.

Medziprodukt 1

[1*R*-(1 α ,3 α ,4 β ,4 α ,7 β ,7 α ,8 α)]-Benzyl-4-formyl-8a(hydroxymetyl)-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylát (benzylester sordaricínu)

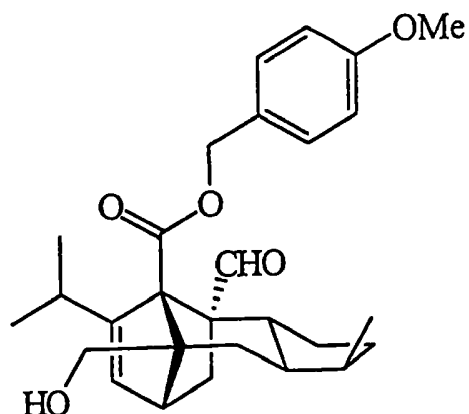


Sordarín (2 mg) sa rozpustil v 1 ml acetónu. Pridala sa koncentrovaná HCl (0,2 ml). Zmes sa jeden deň miešala pri laboratórnej teplote. Po rozriedení s vodou a vodnom spracovaní (CH_2Cl_2) sa organická frakcia vysušila na Na_2SO_4 , prefiltrovala sa a *in vacuo* sa zakoncentrovala. Zmes sa rozpustila v 2 ml DMF, do ktorej sa pridalo 0,1 ml benzylbromidu, a následne nadbytok tuhého NaHCO_3 . Zmes sa cez noc miešala pri laboratórnej teplote a zakoncentrovala sa *in vacuo*. Do zmesi sa pridal chloroform a táto sa potom filtrovala, aby sa odstránil NaHCO_3 . Filtrát sa koncentroval *in vacuo* a purifikoval sa preparatívnou chromatografiou na tenkej vrstve (PTLC), čím vzniklo 1,0 mg benzylesteru sordaricínu.

^1H NMR (CDCl_3): δ 0,51 (3H, d, $J = 6,9$), 0,82 (3H, d, $J = 6,6$), 0,91 (1H, m), 1,0 (3H, d, $J = 6,6$), 1,18 (1H, d, $J = 12,6$), 1,50-2,00 (9H, m), 2,24 (1H, m), 2,51 (1H, m), 3,48 (1H, d, $J = 11,0$), 3,87 (1H, d, $J = 11,0$), 5,11 (1H, d, $J = 11,7$), 5,31 (1H, d, $J = 11,7$), 6,04 (1H, d, $J = 2,1$), 7,31-7,40 (5H, m), 9,62 (1H, s).

Medziprodukt 2

[1*R*-(1 α ,3 α ,4 β ,4 α ,7 β ,7 α ,8 α)]-4-Metoxybenzyl-4-formyl-8a(hydroxymetyl)-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylát (*p*-metoxybenzylester sordaricínu)

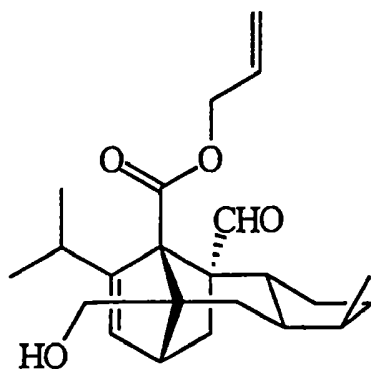


Použil sa rovnaký postup ako pri príprave benzylesteru sordaricínu, pričom namiesto benzylbromidu bol použitý 4-metoxybenzylchlorid.

^1H NMR (CDCl_3): δ 0,51 (3H, d, $J = 6,9$), 0,82 (3H, d, $J = 6,9$), 1,00 (3H, d, $J = 6,9$), 0,90-2,00 (11H, m), 2,23 (1H, m), 2,49 (1H, t, $J = 3,8$), 3,79 (3H, s), 4,61 (2H, s), 5,05 (1H, d, $J = 11,7$), 5,26 (1H, d, $J = 11,7$), 6,03 (1H, d, $J = 3,2$), 6,88 (2H, d, $J = 8,7$), 7,28 (2H, d, $J = 8,7$), 9,60 (1H, s).

Medziprodukt 3

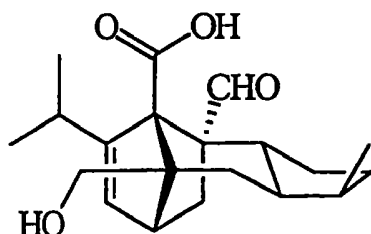
[1*R*-(1 α ,3 $\alpha\beta$,4 β ,4 $\alpha\beta$,7 β ,7 $\alpha\alpha$,8 $\alpha\beta$)]Allyl-4-formyl-8 α -(hydroxymetyl)-4,4 α ,5,6,7,7 α ,8,8 α -oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 α (1*H*)-karboxylát (alkylester sordaricínu)



Použil sa rovnaký postup ako pri príprave benzylesteru sordaricínu, pričom namiesto benzylbromidu bol použitý alkylbromid. Týmto spôsobom sa získala zlúčenina uvedená ako názov medziproduktu.

Medziprodukt 4

Kyselina [1*R*-(1 α ,3 $\alpha\beta$,4 β ,4 $\alpha\beta$,7 β ,7 $\alpha\alpha$,8 $\alpha\beta$)]-4-formyl-8a-(hydroxymetyl)-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová (sordaricín)

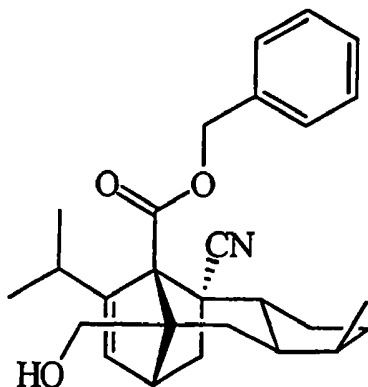


Ku MeOH roztoku benzylesteru sordaricínu (0,6 mg) sa pridal Pearlmanov katalyzátor. Zmes sa miešala pod vodíkom (balónový tlak) 15 minút. Po filtrácii cez bavlnu sa zmes zakoncentrovala *in vacuo* a získalo sa 0,4 mg sordaricínu.

¹H NMR (CDCl₃): δ 0,82 (3H, d, J = 6,8), 0,98 (3H, d, J = 6,6), 1,01 (3H, d, J = 6,9), 1,23 (1H, m), 1,25 (1H, d, J = 12,6), 1,582,10 (9H, m), 2,34 (1H, m), 2,41 (1H, t, J = 3,6), 3,45 (1H, d, J = 11,0), 4,14 (1H, d, J = 11,0), 6,05 (1H, d, J = 3,0), 9,75 (1H, s).

Medziprodukt 5

[1*R*-(1 α ,3 $\alpha\beta$,4 β ,4 $\alpha\beta$,7 β ,7 $\alpha\alpha$,8 $\alpha\beta$)]Benzyl-4-kyano-8a-(hydroxymetyl)-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylát



Benzylester sordaricínu (161,2 mg) sa rozpustil v 6 ml *N,N*-dimetylformamidu a pridal sa *p*-metoxybenzylchlorid (1 ml) a následne nadbytok hydridu sodného (50 mg 60% disperzie v minerálnom oleji). Zmes sa miešala cez noc. Zmes sa nariedila s éterom a jemne sa premyla vodou. Éterová vrstva sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom a *in vacuo* sa odstránili prchavé látky. Zvyšok sa purifikoval silikagélou chromatografiou, čím vzniklo 192,5 mg (93%) *p*-metoxybenzyléteru.

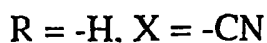
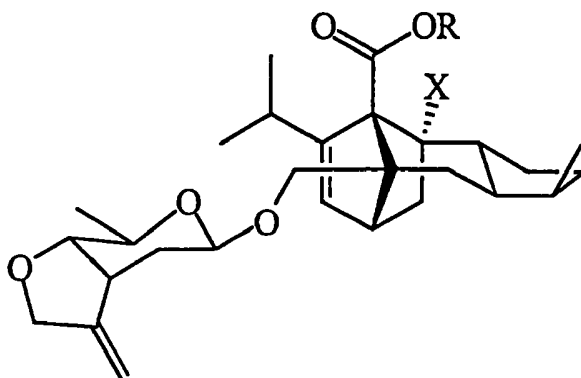
Éter získaný vyššie (150 mg) sa rozpustil v 5 ml suchého etanolu a pridali sa 3 ml suchého pyridínu. Pridal sa hydrochlorid hydroxylamínu (96 mg) a zmes sa zahrievala na 70 °C 3 hodiny. Reakčná zmes sa ochladila a zakoncentrovala *in vacuo*. Zvyšok sa rozpustil v éteri, premyl sa s vodou a vysušil sa na bezvodnom sírane sodnom. Zvyšok, ktorý sa získal po odstránení éteru *in vacuo*, sa purifikoval prostredníctvom PTLC, čím vzniklo 143,4 mg aldoxímu (93%).

Oxím (143 mg) sa rozpustil v 5 ml toluénu, do ktorého bol pridaný nadbytok vnútornej soli hydroxidu (metoxykarbonylsulfamoyl)-trietylamónneho (700 mg). Zmes sa miešala pri 70 °C 2 hodiny. Po zakoncentrovaní *in vacuo* sa zvyšok purifikoval prostredníctvom PTLC, čím vzniklo 116,6 mg nitrilu (84%).

Vyššie uvedený nitril (67,5 mg) sa rozpustil v 5 ml dichlórmetánu, do ktorého sa pridalo DDQ (43 mg) a 0,5 ml vody. Zmes sa miešala pri laboratórnej teplote 2 hodiny. Po vodnom spracovaní a purifikácii prostredníctvom PTLC, 47,6 mg (91%) sa získala zlúčenina uvedená v názve.

Nasledujúce príklady sú poskytnuté na podrobnejšiu ilustráciu vynálezu, a žiadnym spôsobom neobmedzujú rozsah vynálezu.

Príklad 1



Časť A

Zlúčenina (1 ekvivalent) opísaná vyššie uvedeným vzorcom, v ktorom $R = -CH(C_6H_5)_2$ a $X = -CHO$, a ktorej príprava je opísaná vo WO 96/14326 sa rozpustila v etanole a pridal sa rovnaký objem pyridínu a následne hydrochloridu hydroxylamínu (10 ekvivalentov). Reakčná zmes sa miešala v dusíkovej atmosfére približne 20 minút, až kým sa neuskutočnila dostatočná reakcia, čo sa zhodnotilo analytickou TLC. Zmes sa koncentrovala za zníženého tlaku a rozdelila sa medzi vodou a dichlórmetánom. Organická fáza sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovala sa a zakoncentrovala sa *in vacuo*. Zvyšok sa purifikoval prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát), čím vznikol produkt.

Časť B

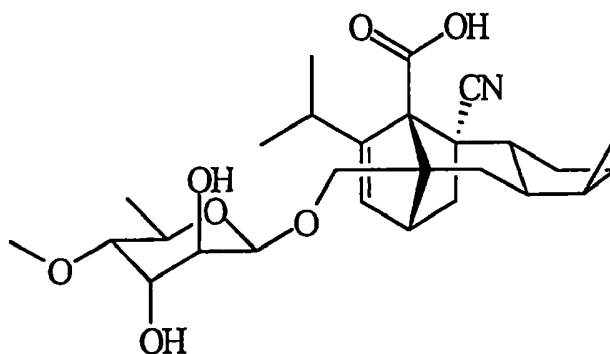
Produkt z časti A (1 ekvivalent) sa rozpustil v toluéne a pridal sa Burgessová soľ (5 ekvivalentov). Zmes sa miešala v dusíku, pri 60 °C približne hodinu, alebo až kým nezreagovalo dostatočné množstvo východiskového materiálu. Reakčná zmes sa ochladila a *in vacuo* sa odstránili prchavé látky. Výsledkom purifikácie prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát) bol produkt.

Časť C

Produkt z časti B sa rozpustil v 2% kyseline trifluóroctovej v dichlórmetáne (w/w) pri 0 °C a zmes sa miešala približne 4 hodiny, alebo pokiaľ neprebehla dostatočná reakcia. Za zníženého tlaku sa odstránili prchavé látky a výsledkom purifikácie produktu prostredníctvom PTLC bola zlúčenina.

Príklad 2

Kyselina [1*R*-(1 α ,3 α ,4 β ,4 α ,7 β ,7 α ,8 α)]-8a-[(6-deoxy-4-O-metyl- β -D-altropyranosyloxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová (4-kyano-4-deformylsordarín)



Sordarín (50 mg) sa rozpustil v 3 ml *N,N*-diemetylformamidu a pridalo sa 0,3 ml benzylbromidu a následne 200 mg hydroxidu sodného (60% disperzia v minerálnom oleji). Zmes sa miešala pri laboratórnej teplote cez noc. Po vodnom spracovaní (dietyléter) a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester 2',3'-di-O-benzylsordarínu.

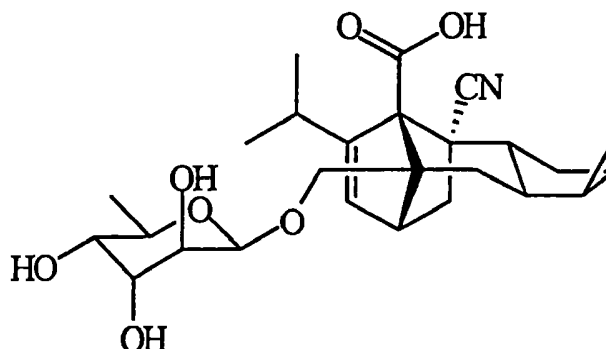
Roztok benzylesteru 2',3'-di-O-benzylsordarínu (1 ekvivalent) sa pripravil v zmesi etanolu a pyridínu (2:1). Do zmesi sa pridal nadbytok hydrochloridu hydroxylamínu a zahrievala sa na 70 °C s miešaním počas 2 hodín. Zmes sa zakoncentrovala *in vacuo* a uskutočnilo sa vodné spracovanie (dichlórmetán). Výsledkom purifikácie prostredníctvom PTLC bol benzylester 2',3'-di-O-benzyl-4-aldoxím-sordarínu.

Do roztoku benzylesteru 2',3'-di-O-benzyl-4-aldoxím-sordarínu v toluéne sa pridal nadbytok vnútornej soli (metoxykarbonylsulfamoyl)trietylamóniumhydroxid (Burgessovo činidlo). Zmes sa miešala v dusíkovej atmosfére pri 70 °C 2 hodiny. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a po purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester 2',3'-di-O-benzyl-4-kyano-4-deformylsordarínu.

Roztok vyššie uvedeného benzylesteru sa pripravil v metanole. Pridal sa hydroxid paládnatý na uhlíku (Pearlmanov katalyzátor) a nádoba sa prepláchla s vodíkovým plynom. Zmes sa silno premiešavala v atmosfére vodíka 15 minút. Zmes sa prefiltrovala a roztok sa zakoncentroval *in vacuo*, čím vznikla zlúčenina uvedená v názve príkladu. MS (CI): $m/z = 507,5$ ($M+NH_4$)⁺

Príklad 3

Kyselina [1*R*-(1 α ,3 α β ,4 β ,4 α β ,7 β ,7 α ,8 α β)]-8a-[(6-deoxy- β -D-altropyranozyloxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová (4-kyano-4-deformyl-4'-demetylsordarín)



Jeden ml zmrazeného mycélia *Streptomyces avermitilis* MA 4848 (ATCC 31272) sa inokuloval do každej z 8 Erlenmeyerových baniek zo zarážkami, ktoré obsahovali 40 ml BaSa média [na liter: 20 g kvasinkového extraktu (Difco), 20 g Hykázy (voľná soľ, Sheffield), 20 g dextrózy, 2 g KNO₃, 10 ml stopových prvkov (ako sú definované nižšie). pH 7,0, autoklávované 20 min]. Fľaše sa inkubovali 24 hodín, pri 27 °C, pri 220 otáčkach za minútu. PH je 6,7 až 6,8. Mycélia sa mikroskopicky skúmali, či neobsahujú nemyceliálne kontaminanty.

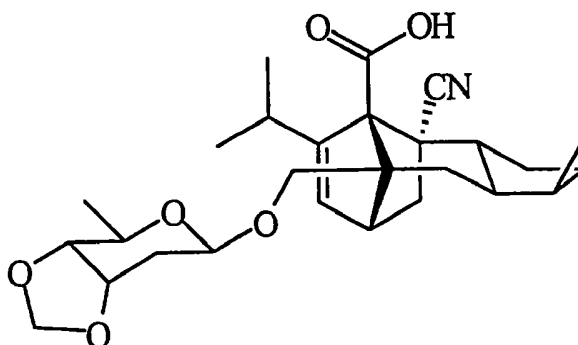
Stopové prvky	1 liter
NaCl (12,5% roztok)	4 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (12,5% roztok)	4 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	25 mg
MnSO ₄ .H ₂ O (0,5% roztok)	1 ml
ZnSO ₄ .7H ₂ O (1% roztok)	1 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (2% roztok)	1 ml

Štyridsať mg zlúčeniny uvedenej v názve príkladu 2 (4-kyano-4-deformyl-sordarín) sa rozpustilo v 0,40 ml 80% etanolu a 50 μ l sa pridalo do každej fľaše.

Zmes sa inkubovala 18 hodín pri 27 °C. Konverzia sa ukončila ako bolo stanovené analytickou HPLC. Médium (200 ml) sa nariedilo s rovnakým objemom metanolu (200 ml) na extrakciu a tuhé zložky sa odstránili centrifugáciou. Supernatant sa zakoncentroval *in vacuo*, aby sa odstránila väčšina metanolu a zvyšný roztok (približne 200 ml) sa s NaOH nastavil na pH 11. Tento roztok sa extrahoval dva krát s dichlórmetánom (200 ml). Vodná vrstva sa nastavila na pH 2,5 s nariedenou kyselinou sírovou a extrahovala sa dva krát s dichlórmetánom. Kombinované dichlórmetánové vrstvy sa premyli s vodou, soľným roztokom a vysušili sa na bezvodnom sírane sodnom. Síran sodný sa odstránil filtráciou a dichlórmetán sa odstránil *in vacuo*, čím vznikla tuhá látka (53 mg). Zvyšok sa purifikoval použitím preparatívnej RP HPLC na Phenomenex Primesphere C8 (5 μ , 9,4 x 250 mm). Použila sa mobilná fáza pozostávajúca zo zmesi acetonitrilu a vody (34:66) s obsahom 0,1% kyseliny fosforečnej, s rýchlosťou prietoku 3,5 ml/min, pri 40 °C. Zlúčenina z názvu príkladu sa eluovala v 14,4 minúte. Bohaté hraničné frakcie sa skombinovali a acetonitril sa odstránil v prúde dusíka. Zvyšný vodný roztok sa extrahoval s dichlórmetánom ako bolo opísané vyššie, pričom výťažkom bolo 7,2 mg zlúčeniny z názvu príkladu.

^1H NMR (1,5 mg in 0,125 ml CD_3OD): δ 0,790 (d, 6,8, 3H), 1,059 (d, 6,8, 3H), 1,161 (d, 6,8, 3H), 1,14-1,32 (m), 1,257 (d, 6,4, 3H), 1,650 (m, 1H), 1,74-1,86 (m), 2,00-2,18 (m), 2,432 (dd, 4,4, 12,8, 1H), 2,670 (br heptet, 6,8, 1H), 2,836 (brdd, 3,6, 1H), 3,450 (dd, 4,0, 9,2, 1H), 3,67 (m, 2H), 3,721 (d, 9,6, 1H), 3,871 (dd, 3,6, 3,6, 1H), 3,914 (d, 9,6, 1H), 4,572 (brs), 6,225 (brd, 3,2), IR (tenký film na ZnSe): 2958, 2234, 1713, 1071 cm^{-1} , MS: 475,2607 (M $^{+}$)

Príklad 4



Časť A

Digitoxóza (0,500 g, 3,37 mmol) sa umiestnila do fľaše a azeotropoval sa so suchým benzénom. Materiál sa rozpustil v 5 ml suchého pyridínu a pridalo sa 5 ml bezvodného anhydridu. Reakčná zmes sa miešala 18 hodín. Chromatografická analýza na tenkej vrstve (silikagél, zmes etylacetátu a hexánov 1:2) ukázala kompletne vymyznutie digitoxózy. Prchavé látky sa odstránili *in vacuo*, čím vzniklo 1,013 g svetložltého oleja.

^1H NMR (CDCl_3): δ 1,11 (d, 3H), 1,96-2,16 (m, 2H), 2,02 (s, 3H), 2,11 (s, 6H), 4,06 (m, 1H), 4,61 (dd, 1H), 5,49 (bq, 1H), 6,02 (dd, 1H), MS: 215,1 ($\text{M}-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) $^+$

Časť B

Peracetyldigitoxóza pripravená ako bolo uvedené v časti A (9,31 g, 33,9 mmol) sa pridala do 150 ml vody a pridalo sa 50 ml ľadovej kyseliny octovej. Reakčná zmes sa miešala pri teplote okolia 3 dni. Rozpúšťadlo sa odstránilo *in vacuo* a surový zvyšok sa purifikoval bleskovou chromatografiou (silikagél, zmes etylacetát a hexán 1:1), čím vzniklo 7,37 g (94%) svetložltého sirupu. Produkt, 3,4-diacetoxydigitoxóza existuje ako zmes anomérov.

Časť C

3,4-Diacetoxydigitoxóza (1,23 g, 5,3 mmol) sa umiestnila do fľaše a pridalo sa 25 ml bezvodného dichlórmétanu v dusíkovej atmosfére. Ďalej sa pridal uhličitan céznatý (0,35 g, 1,1 mmol) a nasledoval trichlóracetonitril (7,2 g, 50 mmol). Reakčná zmes sa miešala približne jednu hodinu, prefiltrovala sa a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. V následných reakciách sa výsledný surový trichlóracetimidát (2,00 g) použil v surovom stave.

^1H NMR (CDCl_3): δ 1,34 (d, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,11 (m, 1H), 2,29 (ddd, 1H), 4,17 (m, 1H), 4,80 (dd, 1H), 5,52 (m, 1H), 6,20 (dd, 1H), 8,76 (s, 1H).

Časť D

Medziprodukt 1 (1,6 g, 3,8 mmol) sa azeotropoval benzénom a vysušená zlúčenina sa rozpustila v 10 ml dichlórmetánu. Pridal sa bezvodný bromid zinočnatý (0,340 g, 1,5 mmol) a zmes sa ochladila na 0 °C. Roztok produktu z časti C (2,8 g, 7,5 mmol) v 5 ml dichlórmetánu sa pridal cez striekačkovú pumpu v priebehu jednej hodiny. Reakčná zmes sa vliala do vodného roztoku hydrogénuhličitanu sodného a extrahovala sa s dichlórmetánom. Organická vrstva sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovala sa a rozpúšťadlo sa odstránilo *in vacuo*. Surový materiál sa purifikoval bleskovou chromatografiou (silikagél, zmes etylacetátu a hexánu 1:4), čím sa získalo 2,09 g (86%) požadovaného produktu vo forme čistého sirupu. Produkt bol zmesou izomérov v pomere 2:3. MS: 654,2 (M+NH₄)

Časť E

Produkt z časti D (2,09 g, 3,3 mmol) sa rozpustil v 50 ml metanolu a pridal sa uhličitan draselný (0,20 g). Reakčná zmes sa miešala 2 hodiny pri teplote okolia. Uhličitan draselný sa odstránil filtráciou a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. Surový produkt sa purifikoval bleskovou chromatografiou (silikagél, eluované najprv so zmesou etylacetátu a hexánov 1:2, potom zmesou etylacetátu a hexánov 1:1), čím sa získalo 0,84 g (49%) požadovaného deacetylovaného β-anoméru spolu s 0,48 g (26%) deacetylovaného α-anoméru.

α-Anomér: čiastočný ¹H NMR (CDCl₃): δ 0,51 (d, 3H), 0,80 (d, 3H), 0,85-0,95 (m), 1,00 (d, 3H), 1,02 (m), 1,14 (d, 3H), 2,77 (t, 1H), 3,44 (d, 1H), 3,58 (m), 3,93 (dd, 1H), 3,27 a 3,98 (AB kvartet, 2H), 4,75 (m, 1H), 5,18 (AB kvartet, 2H), 6,02 (m, 1H), 7,37 (m, 5H), 9,67 (s, 1H), MS: 570,5 (M+NH₄)

β-Anomér: čiastočné ¹H NMR (CDCl₃): δ 0,51 (d, 3H), 0,81 (d, 3H), 0,85-1,1(m), 1,00 (d, 3H), 1,13 (d, 3H), 2,83 (t, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,60 a 3,87 (AB kvartet, 2H), 4,10 (bs, 1H), 4,58 (dd, 1H), 5,17 (AB kvartet, 2H), 6,01 (d, 1H), 7,35 (m, 5H), 9,69 (s, 1H), MS: 423,3 (M+H-digitoxóza)

Časť F

β -anomér z časti E (35,6 mg) sa rozpustil v 3 ml dibrómmetánu a pridali sa 3 ml 50% vodného hydroxidu sodného a následne bromid tetrabutylamónny (4,2 mg, 0,013 mmol). Zmes sa silno premiešavala 18 hodín. Reakčná zmes sa extrahovala dichlórmetánom a organická fáza sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovala sa a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. Zvyšok sa purifikoval prostredníctvom PTLC (9:1 zmes hexán/ etylacetát), čím sa získalo 16,4 mg (45%) bielej tuhej látky.

Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,52 (d, 3H), 0,90 (d, 3H), 0,9 (m), 1,00 (d, 3H), 1,04 (m), 1,13 (d, 3H), 2,71 (t, 1H), 3,38 (m, 1H), 3,60 a 3,89 (AB kvartet, 2H), 3,64 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,48 (dd, 1H), 4,85 (s, 1H), 5,14 (s, 1H), 5,18 (AB kvartet, 2H), 6,01 (d, 1H), 7,36 (m, 5H), 9,71 (s, 1H).

Časť G

Produkt z časti F (9,7 mg, 0,017 mmol) sa rozpustil v 1 ml pyridínu a pridal sa etanol a následne hydrochlorid hydroxylamínu (12 mg, 0,17 mmol). Zmes sa zahrievala na 70 °C a miešala sa 1 hodinu. Zmes sa ochladila a rozpúšťadlo sa odstránilo *in vacuo*. Zvyšok sa rozdelil medzi vodou a dichlórmetánom. Kombinované organické fázy sa vysušili na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovali sa a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (4:1/hexán:etylacetát) bolo 8,6 mg (87%) produktu vo forme tuhej látky.

Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,52 (d, 3H), 0,81 (d, 3H), 0,9 (m), 0,98 (d, 3H), 1,01(m), 1,23 (d, 3H), 1,34 (d, 1H), 2,62 (t, 1H), 3,36 (m, 1H), 3,60 (d, 1H), 3,64 (dd, 1H), 3,87 (d, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,49 (dd, 1H), 4,85 (s, 1H), 5,15 (s, 1H), 5,18 (AB kvartet, 2H), 5,96 (d, 1H), 7,36 (m, 5H), 7,46 (bs, 1H), 7,81 (s, 1H).

Časť H

Produkt z časti G (8,6 mg, 0,015 mmol) sa rozpustil v 2 ml toluénu a pridalo sa Burgessovo činidlo (18 mg, 0,074 mmol). Reakčná zmes sa miešala v atmosfére

suchého dusíka, pri 60 °C približne jednu hodinu. Pridalo sa ďalšie Burgessovo činidlo a zmes sa miešala ďalších 20 minút. Reakčná zmes sa ochladila a *in vacuo* sa odstránili prchavé látky. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (4:1/hexán:etylacetát) je 7,3 mg (86%) produktu vo forme tuhej látky.

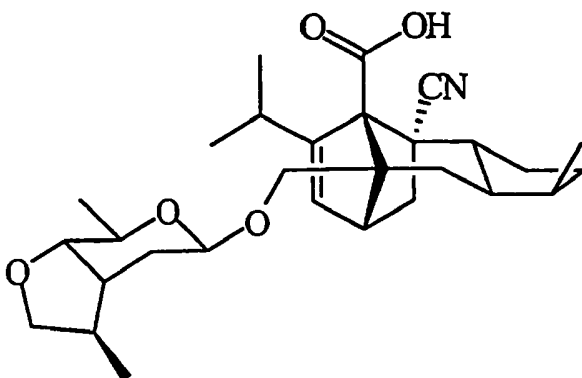
Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,39 (d, 3H), 0,88 (d, 3H), 0,95 (m), 1,14 (d, 3H), 1,23 (d, 3H), 2,62 (m, 1H), 2,72 (t, 1H), 3,36 (m, 1H), 3,59 (d, 1H), 3,63 (dd, 1H), 3,88 (d, 1H), 4,11 (m, 1H), 4,48 (dd, 1H), 4,85 (s, 1H), 5,14 (s, 1H), 5,18 (AB kvartet, 2H), 6,12 (m, 1H), 7,34 (m, 3H), 7,46 (m, 2H).

Časť I

Produkt z časti H (7,3 mg, 0,013 mmol) sa rozpustil v 2 ml metanolu a pridal sa Pearlmanov katalyzátor (2 mg). Reakčná nádoba sa prepláchla vodíkom a miešala so vo vodíkovej atmosfére 2 hodiny. Zmes sa prefiltrovala cez celitovú podložku a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*, čím vzniklo 6,1 mg (100 %) zlúčeniny uvedenej v názve príkladu.

Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,77 (d, 3H), 1,01 (d, 3H), 1,18 (d, 3H), 1,28 (d, 3H), 2,23 (dt, 1H), 2,35 (dd, 1H), 2,67 (m, 2H), 3,39 (m, 1H), 3,54 (d, 1H), 3,63 (dd, 1H), 3,99 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,57 (dd, 1H), 4,85 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 6,16 (d, 1H). MS: 489,2 ($\text{M}+\text{NH}_4$). IR: 2240 cm^{-1}

Príklad 5



Časť A

β -anomér z časti E príkladu 4 (0,84 g, 1,5 mmol) sa rozpustil v 100 ml toluénu. Pridal sa dibutyltínoxid (0,568 g, 2,3 mmol) v dusíku a zmes sa zahrievala

do refluxu a miešala sa 4 hodiny. Zmes sa ochladila na laboratórnu teplotu a pridal sa alylbromid (0,544 g, 4,5 mmol) a nasledoval fluorid tetrabutylamónny (2,3 ml 1,0M roztoku v THF, 2,3 mmol). Reakčná zmes sa zahriala na 50 °C. Po 1,5 dni sa zmes ochladila a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. Výsledkom purifikácie bleskovou chromatografiou (krokový gradient: 9:1 až 4:1 až 2:1 / hexán:etylacetát) bolo 0,454 g (51%) UV aktívneho produktu.

Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,51 (d, 3H), 0,81 (d, 3H), 0,9 (m), 1,00 (d, 3H), 1,05 (m), 1,22 (d, 3H), 2,21 (m, 1H), 2,72 (t, 1H), 3,01 (dd, 1H), 3,60 (d, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,87 (d, 1H), 3,98 (m, 1H), 4,10 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 4,59 (dd, 1H), 5,10 (m), 5,18 (AB kvartet, 2H), 5,26 (d, 1H), 5,86 (m, 1H), 6,01 (d, 1H), 7,37 (m, 5H), 9,66 (s, 1H).

Časť B

Produkt z časti A (288 mg, 0,49 mmol), trifenyľfosfín (511 mg, 1,95 mmol) a imidazol (133 mg, 1,95 mmol) sa umiestnili do fľaše a rozpustili sa v 40 ml čerstvo destilovaného tetrahydrofuránu. Pridal sa tuhý jód (371 mg, 1,46 mmol) a zmes sa miešala v dusíkovej atmosfére pri laboratórnej teplote 1,5 hodiny. Pridala sa 1N kyselina chlorovodíková a zmes sa extrahovala s etylacetátom. Organická fáza sa premyla s vodou, s roztokom tiosulfátu sodného a potom soľným roztokom. Organická fáza sa potom vysušila na sírane sodnom, prefiltrovala sa a zakoncentrovala sa *in vacuo*. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (9:1/hexán:etylacetát) bolo 211 mg (61%) produktu.

Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,51 (d, 3H), 0,80 (d, 3H), 0,9 (m), 1,00 (d, 3H), 1,05 (m), 1,33 (d, 3H), 1,22 (d, 1H), 2,51 (dd, 1H), 2,70 (t, 1H), 3,13 (t, 1H), 3,25 (m, 1H), 3,59 a 3,82 (AB kvartet, 2H), 4,01 (m, 1H), 4,38 (dd, 1H), 5,18 (AB kvartet, 2H), 5,20 (s, 1H), 5,30 (d, 1H), 5,96 (m, 1H), 6,00 (d, 1H), 7,37 (m, 5H), 9,69 (s, 1H), MS: 725,0 (M+Na)

Časť C

Do 8 ml suchého toluénu sa pridal hydrid tri-*n*-butylcínu (0,267 ml, 0,993 mmol). Roztok sa zahrieval do refluxu približne 2 hodiny. Produkt z časti B (211 mg, 0,301 mmol) sa rozpustil v 10 ml suchého toluénu a pridával sa prostredníctvom striekačkovej pumpy do refluxujúceho roztoku hydridu tri-*n*-butylcínu počas 2 hodín. Pridal sa ďalší ekvivalent hydridu tri-*n*-butylcínu a zmes sa refluxovala ďalších 30 minút, čo bol čas, kedy sa spotreboval východiskový materiál, ako bolo stanovené analytickou TLC. Zmes sa ochladila a prchavé látky sa odstránili za zníženého tlaku. Výsledkom purifikácie prostredníctvom PTLC bol žltý olej. Materiál sa ďalej purifikoval preparatívnou HPLC (Zorbax RxC18, 5 % voda/95 % acetonitril, $\lambda=220$ nm), čím vznikli dva produkty, 23,0 mg (13%) β -izoméru a α -izomér.

β -izomér: Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,50 (d, 3H), 0,80 (d, 3H), 0,89 (m), 0,98 (d, 3H), 1,02 (d, 3H), 1,20 (d, 3H), 2,22 (m, 1H), 2,72 (t, 1H), 3,29 (m, 2H), 3,58 (d, 1H), 3,65 (t, 1H), 3,82 (d, 1H), 3,99 (t, 1H), 4,41 (dd, 1H), 5,19 (AB kvartet, 2H), 6,01 (m, 1H), 7,36 (m, 5H), 9,72 (s, 1H).

α -izomér: Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,47 (d, 3H), 0,79 (d, 3H), 0,89 (m, 1H), 0,93 (d, 3H), 0,98 (d, 3H), 1,21 (d, 3H), 2,21 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,66 (t, 1H), 3,39 (t, 1H), 3,54 (d, 1H), 3,65 (t, 1H), 3,77 (d, 1H), 3,82 (t, 1H), 4,64 (m, 1H), 5,18 (s, 2H), 5,99 (m, 1H), 7,32 (m, 5H), 9,69 (s, 1H).

Časť D

β -izomér z časti C (5,6 mg, 0,0097 mmol) sa rozpustil v 0,5 ml etanolu a pridalo sa 0,5 ml pyridínu a nasledoval hydrochlorid hydroxylamínu (6,7 mg, 0,097 mmol). Reakčná zmes sa miešala v dusíkovej atmosfére približne 20 minút. Zmes sa zakoncentrovala za zníženého tlaku a rozdelila sa medzi vodou a dichlórmetánom. Organická fáza sa vysušila na bezvodnom síradne sodnom, prefiltrovala sa a *in vacuo* sa zakoncentrovala. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (4:1/hexán:etylacetát) bolo 6,6 mg (kvantitatívne) produktu. Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,51 (d, 3H), 0,81 (d, 3H), 0,98 (d, 3H), 1,02 (d, 3H), 1,20 (d, 3H), 2,23 (m, 1H), 2,63 (t, 1H), 3,29 (m, 2H), 3,58 (d, 1H), 3,65 (t, 1H), 3,82

(d,1H), 3,99 (t, 1H), 4,41 (dd, 1H), 5,19 (s, 2H), 5,95 (m, 1H), 7,35 (m, 5H), 7,47 (s, 1H), 7,81 (s, 1H).

Časť E

Produkt z časti D (6,6 mg, 0,011 mmol) sa rozpustil v 1 ml toluénu a pridala sa Burgessova soľ (13,3 mg, 0,055 mmol). Zmes sa miešala pod dusíkom pri 60 °C 1 hodinu. Reakčná zmes sa ochladila a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. Výsledkom purifikácie prostredníctvom PTLC (9:1/hexán:etylacetát) bolo 5,1 mg (81%) produktu.

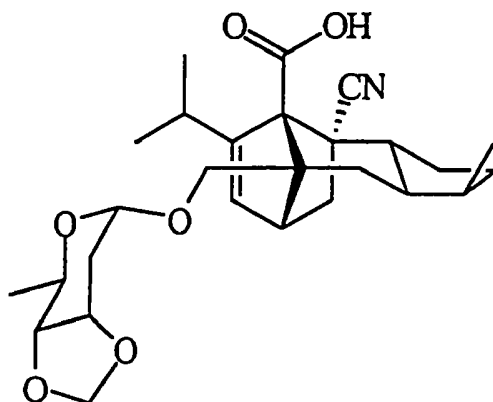
Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,39 (d, 3H), 0,86 (d, 3H), 1,01 (d, 3H), 1,15 (d, 3H), 1,20 (d, 3H), 2,27 (dd, 1H), 2,63 (m, 1H), 2,73 (t, 1H), 3,29 (m, 1H), 3,58 (d, 1H), 3,65 (t, 1H), 3,83 (d,1H), 3,99 (t, 1H), 4,41 (dd, 1H), 5,27 (AB kvartet, 2H), 6,13 (m, 1H), 7,33 (m, 3H), 7,46 (m, 2H).

Časť F

Produkt z časti E (5,1 mg, 0,0087 mmol) sa rozpustil v 1 ml metanolu a pridal sa približne 1 mg hydroxidu paládnateho (Pearlmanov katalyzátor). Reakčná nádoba sa prepláchla vodíkovým plynom a zmes sa silno premiešavala vo vodíkovej atmosfére 30 minút. Katalyzátor sa odstránil filtráciou cez celitovú podložku a filtrát sa zakoncentroval za zníženého tlaku, čím vzniklo 3,8 mg (88 %) zlúčeniny uvedenej v názve príkladu vo forme bielej tuhej látky.

Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,77 (d, 3H), 1,01 (d, 3H), 1,04 (d, 3H), 1,02 (d, 3H), 1,17 (d, 3H), 1,22 (d, 3H), 3,67 (t, 1H), 3,98 (t, 1H), 4,05 (d, 1H), 4,55 (dd, 1H), 6,17 (m, 1H).

Príklad 6



Časť A

α -Anomér z časti E príkladu 4 (18,3 mg, 0,033 mmol) sa rozpustil v 1,5 ml dibrómmetáne. Do roztoku sa pridalo 1,5 ml 50% vodného hydroxidu sodného a následne bromid tetrabutylamónny (2,1 mg, 0,006 mmol). Zmes sa silno miešala 24 hodín a pridalo sa ďalších 6 mg bromidu tetrabutylamónneho a zmes sa miešala ďalších 24 hodín. Reakcia sa zastavila pridaním 9,4 ml 2N kyseliny chlorovodíkovej a zmes sa rozdelila medzi vodou a dichlórmetánom. Spojené organické fázy sa vysušili na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovali sa a zakoncentrovali sa *in vacuo*. Výsledný zvyšok sa purifikoval prostredníctvom PTLC (4:1/hexán:etylacetát), čím vzniklo 3,1 mg (17%) produktu.

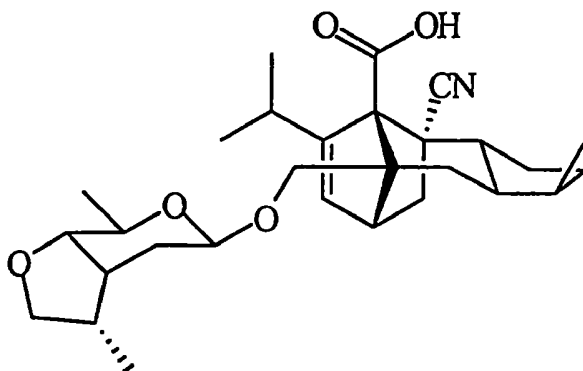
Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,51 (d, 3H), 0,81 (d, 3H), 0,9 (m), 1,00 (d, 3H), 1,05 (m), 1,13 (d, 3H), 2,78 (t, 1H), 3,63 (m, 2H), 3,23 and 3,91 (AB kvartet, 2H), 4,05 (m, 1H), 4,62 (m, 1H), 4,94 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 5,18 (AB kvartet, 2H), 5,99 (d, 1H), 7,35 (m, 5H), 9,69 (s, 1H).

Časť B

Produkt z časti A (3,1 mg, 0,0055 mmol) sa rozpustil v 1 ml metanolu a pridal sa približne 1 mg hydroxidu paládnateho na uhlíku (Pearlmanov katalyzátor). Reakčná nádoba sa prečistila vodíkovým plynom a miešala sa vo vodíkovej atmosfére 40 minút. Katalyzátor sa odstránil filtráciou cez celit. Výsledkom zakoncentrovania filtrátu za zníženého tlaku bolo 3,1 mg (kvantitatívny výťažok) zlúčeniny uvedenej v názve príkladu.

Čiastočné ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,80 (d, 3H), 0,95 (d, 3H), 1,01 (d, 3H), 1,27 (d, 3H), 2,39 (m), 2,78 (t, 1H), 3,76 (m, 4H), 4,06 (m, 1H), 4,71 (m, 1H), 4,87 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 6,02 (d, 1H), 9,73 (s, 1H).

Príklad 7



Časť A

α -Izomér z príkladu 5, časti C (1 ekvivalent) sa rozpustil v etanole a pridal sa rovnaký objem pyridínu a následne hydrochlorid hydroxylamínu (10 ekvivalentov). Reakčná zmes sa miešala v dusíkovej atmosfére približne 20 minút alebo pokiaľ sa neuskutočnila dostatočná reakcia, čo bolo posúdené analytickou TLC. Zmes sa zakoncentrovala za zníženého tlaku a rozdelila sa medzi vodou a dichlórmétanom. Organická fáza sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovala sa a zakoncentrovala sa *in vacuo*. Zvyšok sa purifikoval prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát), čím vznikol produkt.

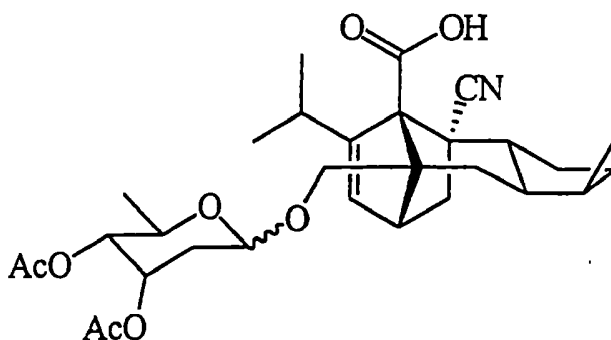
Časť B

Produkt z časti A (1 ekvivalent) sa rozpustil v toluéne a pridala sa Burgessova soľ (5 ekvivalentov). Zmes sa miešala pod dusíkom pri 60 °C približne 1 hodinu, až kým nezreagovalo dostatočné množstvo východiskového materiálu. Reakčná zmes sa ochladila a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. Výsledkom purifikácie prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát) bol produkt.

Časť C

Produkt z časti B sa rozpustil v metanole a pridalo sa katalytické množstvo hydroxidu paládnateho na uhlíku (Pearlmanov katalyzátor). Reakčná nádoba sa prepláchla s vodíkovým plynom a zmes sa silne miešala v atmosfére vodíka približne 30 minút alebo pokiaľ úplne nezreagoval východiskový materiál. Katalyzátor sa odstránil filtráciou cez celitovú podložku a filtrát sa zakoncentroval za zníženého tlaku, čím vznikla zlúčenina uvedená v názve príkladu.

Príklad 8



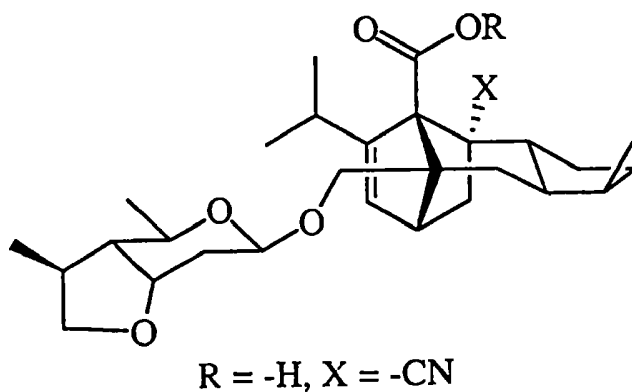
Časť A

Medziprodukt 5 (16,3 mg, 0,039 mmol) sa azeotropoval s benzénom trikrát a vysušená zlúčenina spolu s bezvodným bromidom horečnatým (2,0 mg, 0,0078 mmol) sa dali do fľaše pod dusík. Pridal sa suchý dichlórmetán (1,0 ml) a zmes sa ochladila na 0 °C. 3,4-Diacetyldigitoxózo-1-trichlóracetimidát (pripravený ako bolo opísané v príklade 4, časti C) (29,2 mg, 0,078 mmol) sa rozpustil v 0,075 ml suchého dichlórmetánu a pridával sa do reakčnej zmesi jednu hodinu. Reakčná zmes sa cez noc nechala zahriať na teplotu okolia. Zmes sa vliala so nasýteného vodného hydrogenuhličitanu sodného a extrahovala sa s dichlórmetánom. Organická fáza sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovala sa a *in vacuo* sa odstránili prchavé látky. Výťažkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (jedenkrát s 9:1 potom s 4:1/hexán:etylacetát) bolo 17,0 mg (69%) produktu ako zmes α - a β -izomérov v pomere približne 1:2.

Časť B

Produkt z časti A sa rozpustil v metanole a pridal sa hydroxid paládnatý na uhlíku (Pearlmanov katalyzátor). Reakčná nádoba sa prepláchla s vodíkovým plynom a silno sa pretrepávala približne 30 minút, alebo pokiaľ nezostal žiadny východiskový materiál. Katalyzátor sa odstránil filtráciou a zlúčenina z názvu príkladu sa získala po odstránení prchavých látok z filtrátu. MS: 561,4 ($M+NH_4$)

Príklad 9



Časť A

Zlúčenina (1 ekvivalent) opísaná vyššie uvedeným vzorcom, v ktorom $R = -CH(C_6H_5)_2$ a $X = -CHO$, a ktorej príprava je opísaná vo WO 96/14326, sa rozpustila v etanole a pridal sa rovnaký objem pyridínu a následne hydrochlorid hydroxylamínu (10 ekvivalentov). Reakčná zmes sa miešala v dusíkovej atmosfére približne 20 minút, alebo pokiaľ neprebehla dostatočná reakcia, čo sa posúdilo analytickou TLC. Zmes sa koncentrovala za zníženého tlaku a rozdelila sa medzi vodou a dichlórmetánom. Organická fáza sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovala sa a zakoncentrovala sa *in vacuo*. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát) bol produkt.

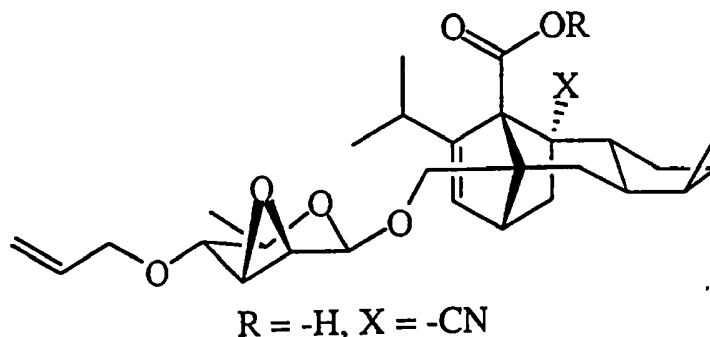
Časť B

Produkt z časti A (1 ekvivalent) sa rozpustil v toluéne a pridala sa Burgessova soľ (5 ekvivalentov). Zmes sa miešala pod dusíkom pri 60 °C približne 1 hodinu alebo pokiaľ nezreagovalo dostatočné množstvo východiskového materiálu. Reakčná zmes sa ochladila a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. Výsledkom purifikácie prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát) bol produkt.

Časť C

Produkt z časti B sa rozpustil v metanole a pridalo sa katalytické množstvo hydroxidu paládnateho na uhlíku (Pearlmanov katalyzátor). Reakčná nádoba sa prepláchla vodíkovým plynom a zmes sa silno pretrepávala v 1 atmosfére vodíka približne 30 minút alebo pokiaľ úplne nezreagoval východiskový materiál. Katalyzátor sa odstránil filtráciou cez celitovú podložku a filtrát sa zakoncentroval za zníženého tlaku, čím vznikla zlúčenina uvedená v názve príkladu.

Príklad 10



Časť A

Zlúčenina (1 ekvivalent) opísaná vyššie uvedeným vzorcom, v ktorom $R = -CH(C_6H_5)_2$ a $X = -CHO$, a ktorej príprava je opísaná vo WO 96/14326, sa rozpustila v etanole a pridal sa rovnaký objem pyridínu a následne hydrochlorid hydroxylamínu (10 ekvivalentov). Reakčná zmes sa pretrepávala v dusíkovej atmosfére približne 20 minút alebo pokiaľ sa neuskutočnila dostatočná reakcia, čo bolo posúdené analytickou TLC. Zmes sa zakoncentrovala za zníženého tlaku a rozdelila sa medzi vodou a dichlórmetánom. Organická fáza sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovala sa a zakoncentrovala sa *in vacuo*. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát) bol produkt.

Časť B

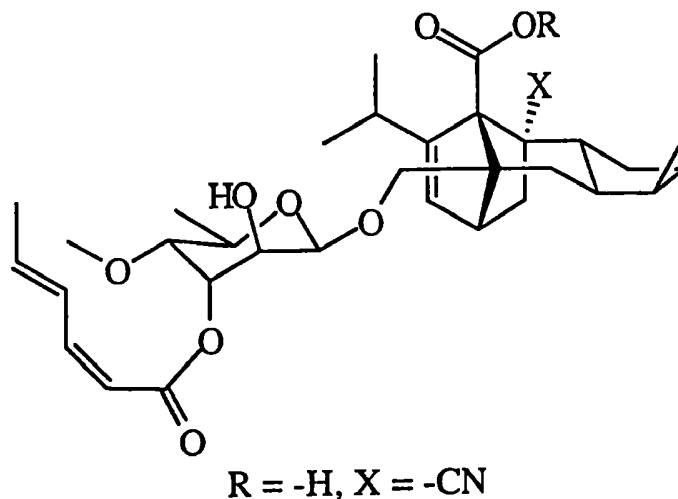
Produkt z časti A (1 ekvivalent) sa rozpustil v toluéne a pridala sa Burgesova soľ (5 ekvivalentov). Zmes sa miešala pod dusíkom pri 60 °C približne 1 hodinu alebo pokiaľ nezreagovalo dostatočné množstvo východiskového materiálu. Reakčná zmes sa ochladila a *in vacuo* sa odstránili prchavé látky. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát) bol produkt.

Časť C

Produkt z časti B sa rozpustil v 2% kyseline trifluóroctovej v dichlórmetáne (hmotnostné %) pri 0 °C a reakčná zmes sa miešala približne 4 hodiny, pokiaľ

neprebehla dostatočná reakcia. Prchavé látky sa odstránili za zníženého tlaku a produkt sa purifikoval prostredníctvom PTLC, čím vznikla zlúčenina uvedená v názve príkladu.

Príklad 11



Časť A

Zofimarín (1 ekvivalent) (kde $R = -H$ a $X = -CHO$) sa rozpustil v suchom DMF s obsahom 5% (v/v) *p*-metoxybenzylbromidu. Potom sa pridal nadbytok $NaHCO_3$ a zmes sa miešala pri laboratórnej teplote približne 18 hodín, alebo pokiaľ nebolo spotrebované podstatné množstvo zofimarínu. Zmes sa zakoncentrovala *in vacuo* a purifikovala sa preparatívnou chromatografiou na tenkej vrstve (PTLC), čoho výsledkom bol produkt, v ktorom $R = -CH_2C_6H_4-p-OCH_3$ a $X = -CHO$.

Časť B

Produkt z časti A (1 ekvivalent) sa rozpustil v etanole a pridal sa rovnaký objem pyridínu a následne hydrochlorid hydroxylamínu (10 ekvivalentov). Reakčná zmes sa miešala v dusíkovej atmosfére približne 20 minút alebo pokiaľ sa neuskutočnila dostatočná reakcia, čo sa posudzovalo analytickou TLC. Zmes sa zakoncentrovala za zníženého tlaku a rozdelila sa medzi vodou a dichlórmetánom. Organická fáza sa vysušila na bezvodnom sírane sodnom, prefiltrovala sa a

zakoncentrovala sa *in vacuo*. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát) bol produkt.

Časť C

Produkt z časti B (1 ekvivalent) sa rozpustil v toluéne a pridala sa Burgessova soľ (5 ekvivalentov). Zmes sa miešala pod dusíkom pri 60 °C približne 1 hodinu alebo pokiaľ nezreagovalo dostatočné množstvo východiskového materiálu. Reakčná zmes sa ochladila a prchavé látky sa odstránili *in vacuo*. Výsledkom purifikácie zvyšku prostredníctvom PTLC (hexán:etylacetát) bol produkt.

Časť D

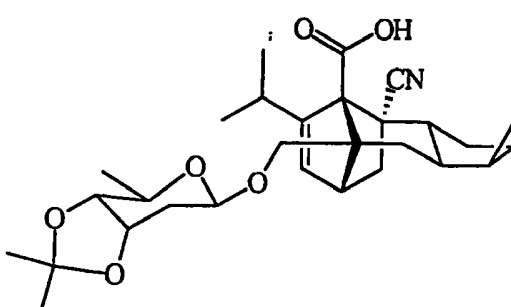
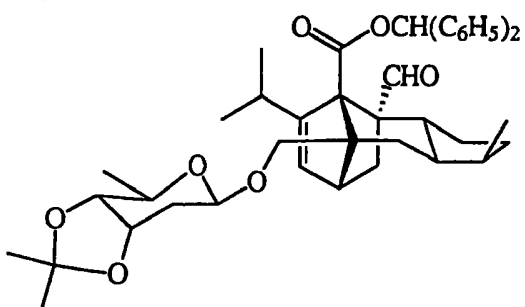
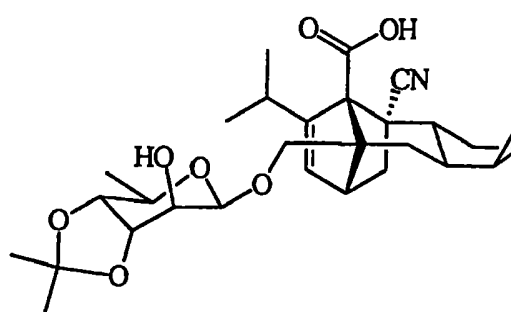
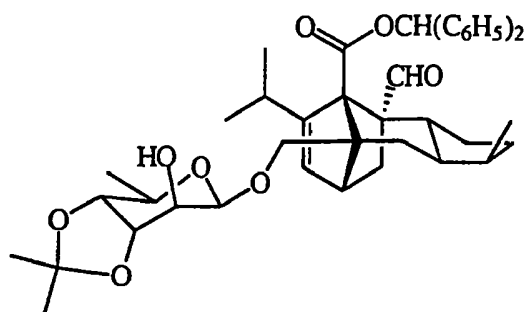
Produkt z časti C sa rozpustil v 2% kyseline trifluóroctovej v dichlórmetáne (w/w) pri 0 °C a zmes sa premiešavala približne 4 hodiny alebo pokiaľ neprobegla dostatočná reakcia. Prchavé látky sa odstránili za zníženého tlaku a produkt sa purifikoval prostredníctvom PTLC, čím vznikla zlúčenina uvedená v názve príkladu.

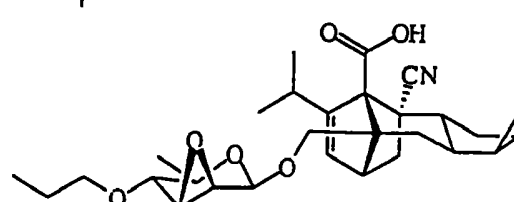
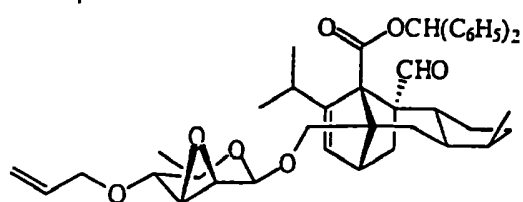
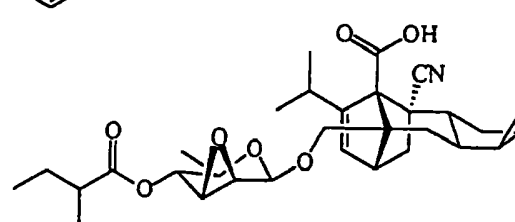
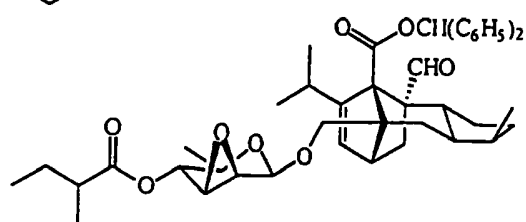
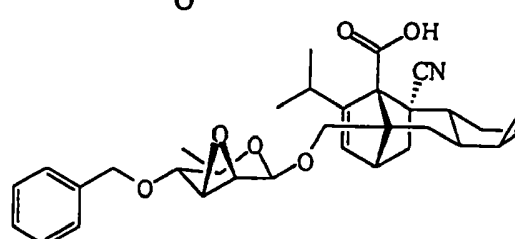
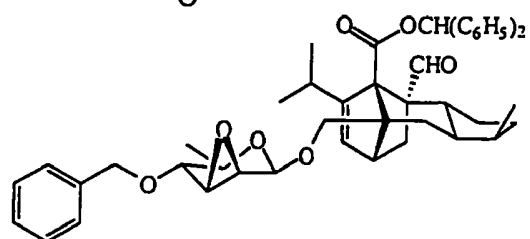
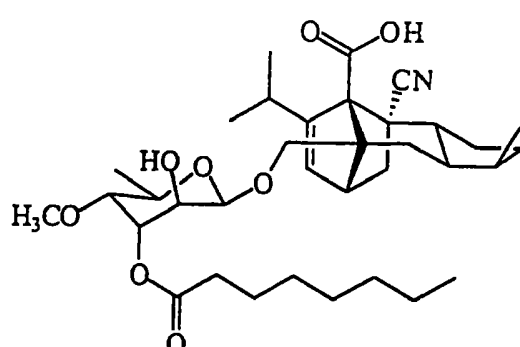
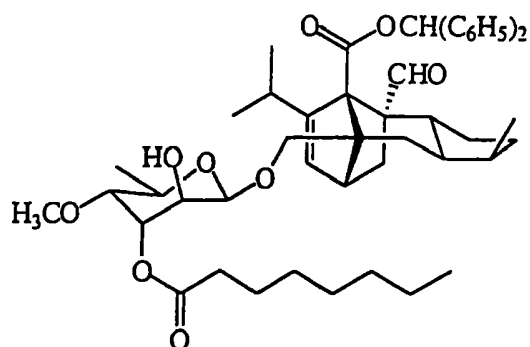
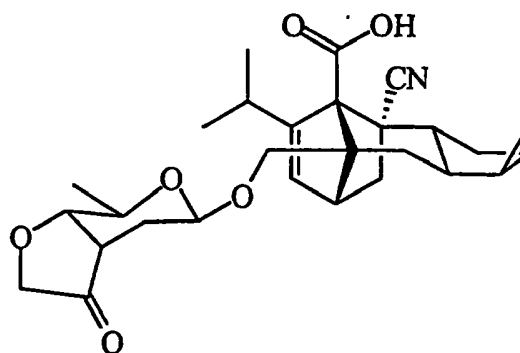
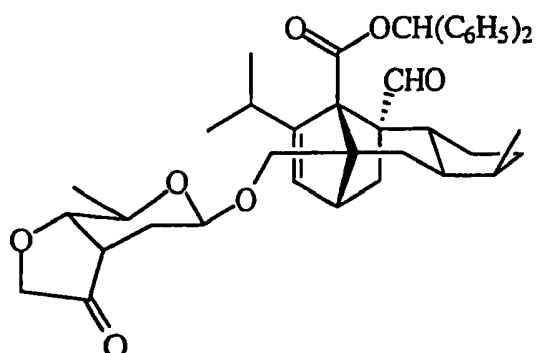
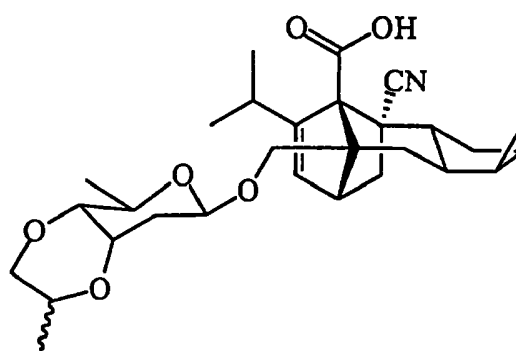
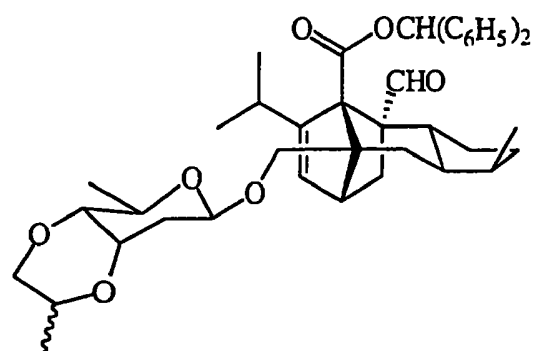
Príklady 12 až 19

Nasledujúce zlúčeniny je možné pripraviť analogicky, ako je uvedené v príklade 9.

Východisková zlúčenina

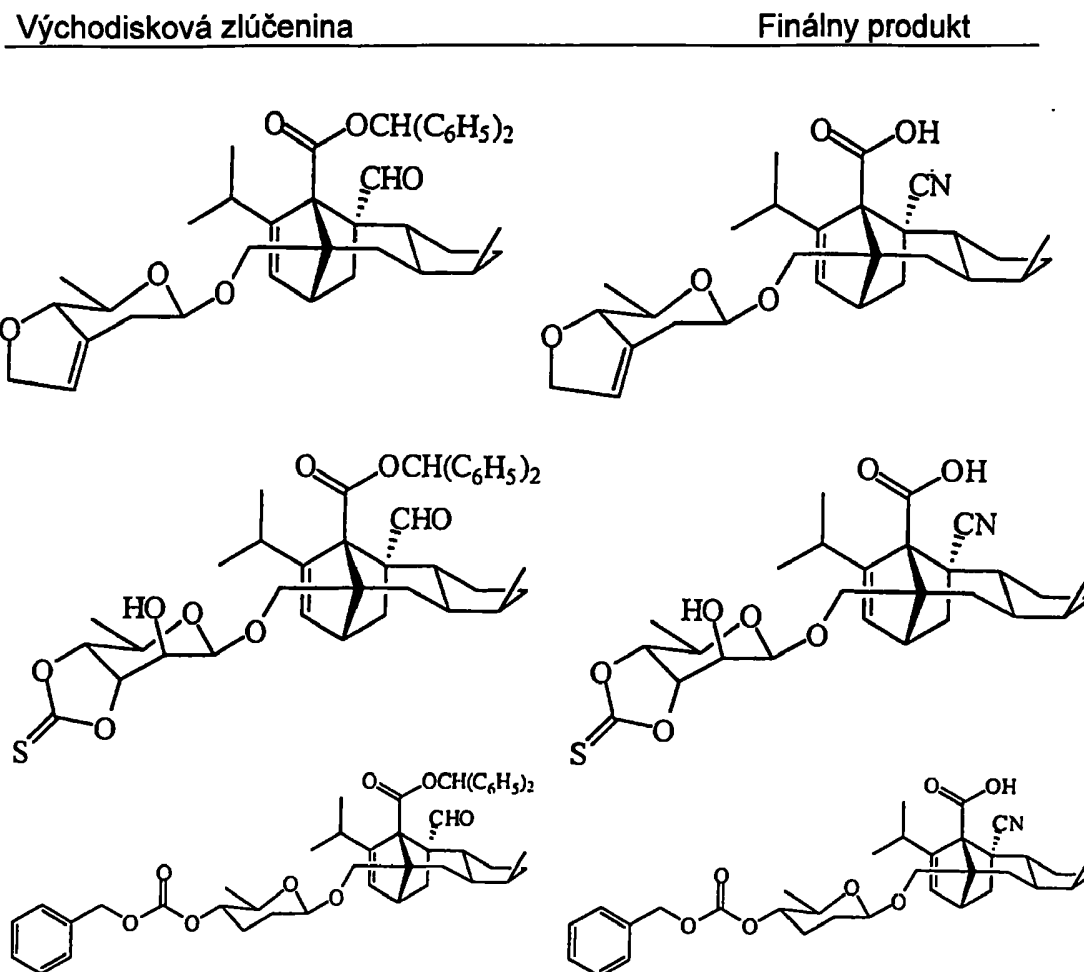
Finálny produkt





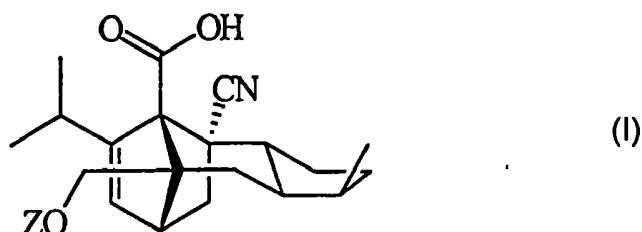
Príklady 20 až 22

Nasledujúce príklady je možné pripraviť analogickým spôsobom ako bolo uvedené v príklade 1

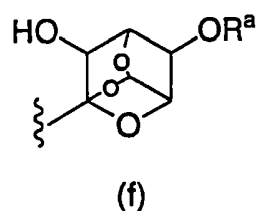
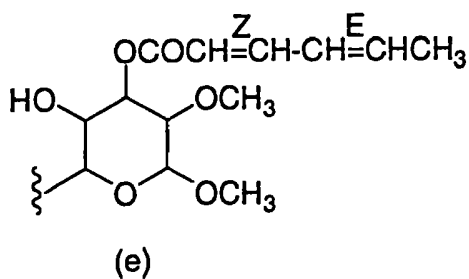
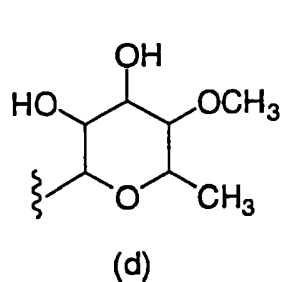
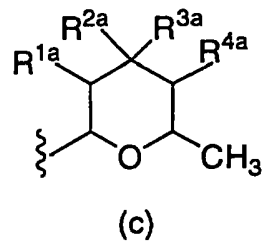
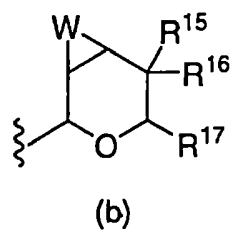
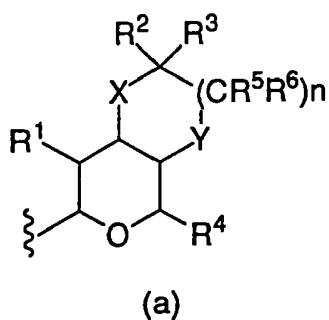


PATENTOVÉ NÁROKY

1. 4-Kyano-4-deformylsordarinové deriváty všeobecného vzorca I



kde Z je tetrahydropyránová skupina vybraná z



a

a jej soli a solváty (napr. hydráty) alebo metabolicky labilné deriváty,
kde

R^a znamená C(O)CH₃ alebo CH₃;

R¹ znamená vodík, halogén, hydroxyl, C₁₋₄alkoxy alebo acyloxy;

R^2 a R^3 znamenajú nezávisle vodík, C_{1-6} alkyl alebo C_{1-4} alkoxy C_{1-4} alkyl alebo R^2 a R^3 spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené, znamenajú $C=O$, $C=S$ alebo C_{3-8} -cykloalkyl;

R^4 znamená vodík alebo CH_2R^7 (kde R^7 je vodík, hydroxyl, C_{1-4} alkoxy alebo skupinu $OCOR^8$, v ktorej R^8 je C_{1-4} alkyl alebo aryl);

R^5 a R^6 sú každý nezávisle vodík, C_{1-6} alkyl alebo C_{1-4} alkoxy C_{1-4} alkyl alebo R^5 a R^6 spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené znamenajú $C=O$, $C=S$ alebo C_{3-8} -cykloalkyl;

n je nula alebo 1;

X a Y znamenajú každý nezávisle kyslík, síru alebo CR^9R^{10} (kde R^9 a R^{10} každý nezávisle znamená vodík, C_{1-6} alkyl, C_{1-4} alkoxy alebo C_{1-4} alkoxy C_{1-4} alkyl; alebo R^9 a R^{10} spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené znamenajú $C=O$, $C=S$, C_{3-8} -cykloalkyl alebo $C=CHR^{11}$, kde R^{11} znamená vodík alebo C_{1-4} alkyl); alebo ak X alebo Y je kyslík a n je nula, potom $-Y-CR^2R^3$ alebo $-X-CR^2R^3$ môžu znamenať aj $-N=CR^3$ alebo $NR^{12}-CR^2R^3$ (kde CR^2 a R^3 sú $C=O$ a R^{12} je C_{1-4} alkyl, acylová skupina COR^{13} , kde R^{13} je C_{1-6} alkyl), alebo keď Y je kyslík a n je nula X môže znamenať skupinu CR^{11} (kde R^{11} má významy definované vyššie), ktorá je pripojená na pyránový kruh dvojitou väzbou;

R^{15} znamená vodík, halogén, azidoskupinu, C_{1-6} alkyl, hydroxy, C_{1-6} alkoxy (voliteľne substituované 1 alebo 2 hydroxyskupinami alebo ketalovými skupinami alebo 1 alebo 2 C_{1-3} alkoxy skupinami), aryl C_{1-4} alkoxy, C_{3-6} alkenyloxy, skupinu $OCOR^{18}$ (kde R^{18} je aryl C_{1-4} alkoxy alebo C_{1-10} alkylová skupina voliteľne obsahujúca jednu alebo dve dvojité väzby) alebo C_{1-6} alkoxykarbonyl C_{1-4} alkoxy a R^{16} znamená vodík alebo R^{15} a R^{16} môžu spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené, znamenať $C=O$ alebo $C=CH_2$;

R^{17} znamená CH_2R^{19} , kde R^{19} je vodík, hydroxyl, C_{1-14} alkoxy alebo skupinu $OCOR^{20}$, v ktorej je R^{20} C_{1-4} alkyl; a

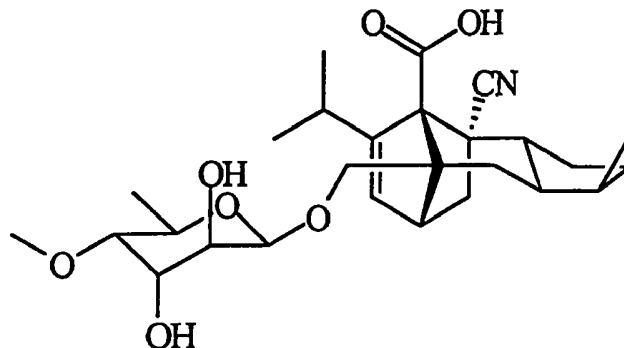
W znamená kyslík, síru alebo CH_2 ;

a čiarkovaná čiara v skupine (a) znamená voliteľnú prítomnosť ďalšej väzby;

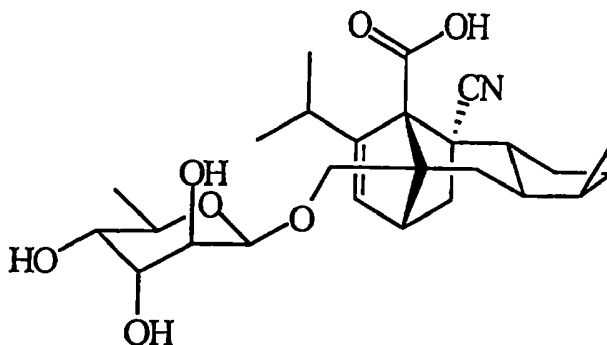
R^{1a} znamená vodík, halogén, hydroxyl alebo C_{1-4} alkoxy;

R^{2a} znamená vodík, halogén, hydroxyl, C_{1-10} alkoxy, C_{1-10} alkyltio, C_{1-6} alkoxy C_{1-4} alkoxy, aryl C_{1-6} alkoxy, aryl C_{3-6} alkenyloxy, azidoskupinu, $NR^{5a}COR^{5a}$ (kde každý z R^{5a} je nezávisle vodík alebo C_{1-6} alkyl), OR^{6a} (kde R^{6a} je cyklický éter, ktorý obsahuje 4 až 8 atómov spojených s atómom kyslíka cez kruhový atóm uhlíka, ktorý je pri kruhovom atóme kyslíka) alebo skupinu $Y^aC(=O)-X^a-R^{7a}$, kde Y^a je kyslík, síra alebo NH, X^a buď väzba, atóm kyslíka alebo substituent NR^{8a} , v ktorom R^{8a} je vodík alebo C_{1-6} alkyl, a R^{7a} je C_{1-10} alkyl, ktorý voliteľne obsahuje jednu alebo dve dvojité väzby, aryl, aryl C_{1-4} alkyl, aryl C_{2-4} alkenyl, halogén C_{1-6} alkyl alebo C_{1-6} alkoxy C_{1-4} alkyl), a R^{3a} znamená vodík alebo R^{2a} a R^{3a} spolu s atómom uhlíka, na ktorý sú pripojené znamenajú C=O alebo C=NOR^{9a} (kde R^{9a} je C_{1-6} alkyl); a R^{4a} je hydroxyl, C_{1-6} alkoxy alebo $^oC(=O)R^{7a}$ (kde R^{7a} je definovaný vyššie).

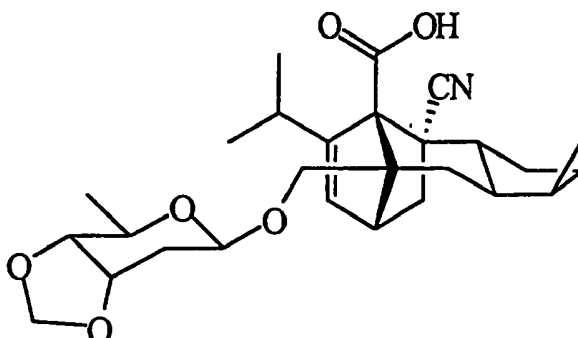
2. 4-Kyano-4-deformylsordarínový derivát podľa nároku 1 štruktúrneho vzorca



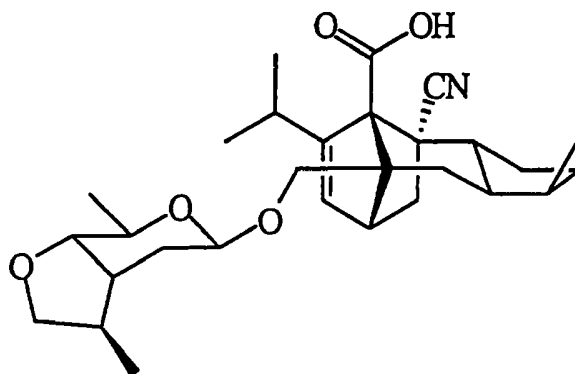
3. 4-Kyano-4-deformylsordarínový derivát podľa nároku 1 štruktúrneho vzorca



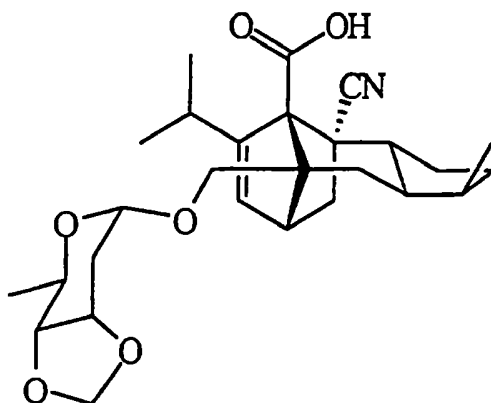
4. 4-Kyano-4-deformylsordarínový derivát podľa nároku 1štruktúrneho vzorca



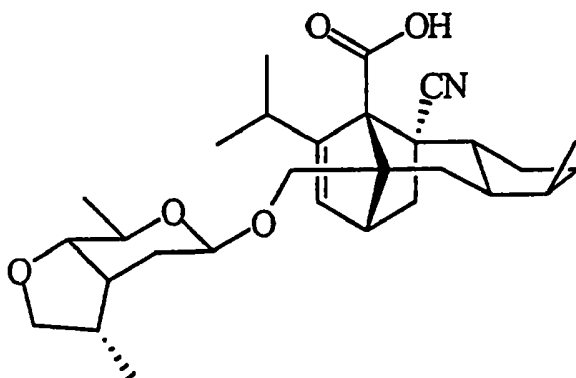
5. 4-Kyano-4-deformylsordarínový derivát podľa nároku 1 štruktúrneho vzorca



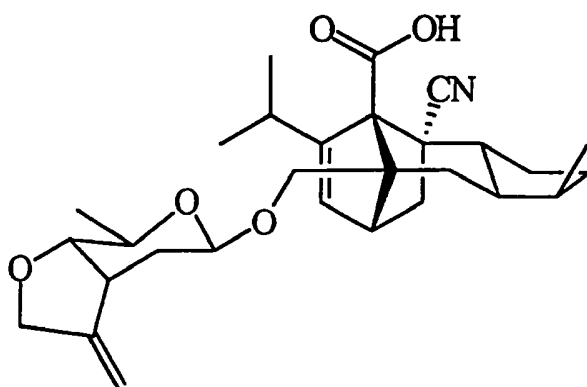
6. 4-Kyano-4-deformylsordarínový derivát podľa nároku 1 štruktúrneho vzorca



三



8. 4-Kyano-4-deformylsordarínový derivát podľa nároku 1 štruktúrneho vzorca



9. Spôsob prípravy 4-kyano-4-deformyl-4'-demethylsordarínu, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa uvedenie 4-kyano-4-deformylsordarínu do kontaktu s kultúrou kmeňa *Streptomyces avermitilis* vo fermentačnom médiu obsahujúcom asimilovateľné zdroje uhlíka a dusíka; a izoláciu 4-kyano-4-deformyl-4'-demethylsordarínu z fermentačného média.

10. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje 4-kyano-4-deformylsordarínový derivát podľa nároku 1 a farmaceuticky prijateľný nosič.

11. Agrochemický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje 4-kyano-4-deformylsordarínový derivát podľa nároku 1 a poľnohospodársky prijateľný nosič.

12. Použitie 4-kyano-4-deformylsordarínového derivátu podľa nároku 1 na výrobu liečiva na liečenie alebo prevenciu hubovej infekcie u živočíchov.

13. Spôsob kontroly fytopatogénnych húb, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa podávanie antifungálne účinného množstva 4-kyano-4-deformyl-sordarínového derivátu podľa nároku 1 rastline, ktorá potrebuje takúto kontrolu.