



H U 0 0 0 2 2 6 8 1 4 B 1

(19) **HU****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Magyar Szabadalmi Hivatal(11) Lajstromszám: **226 814**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 96 00908**(22) A bejelentés napja: **1994. 10. 07.**(40) A közzététel napja: **1997. 05. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2009. 11. 30.**(51) Int. Cl.: **C07D 217/26** (2006.01)**C07D 401/06** (2006.01)**C07D 495/04** (2006.01)**C07F 9/62** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 94/11307(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9509843**

(30) Elsőbbségi adatok:

08/133,543 1993. 10. 07. **US****08/133,696** 1993. 10. 07. **US****08/190,764** 1994. 02. 02. **US**

(72) Feltalálók:

Hammond, Marlys, Pasadena, Kalifornia (US);
Dressman, Bruce A., Indianapolis, Indiana (US);
Fritz, James E., Greenwoode, Indiana (US);
Hornback, William J., Indianapolis, Indiana (US);
Kaldor, Stephen W., Indianapolis, Indiana (US);
Kalish, Vincent J., San Diego, Kalifornia (US);
Munroe, John E., Indianapolis, Indiana (US);
Reich, Siegfried Heinz, San Diego, Kalifornia (US);
Tatlock, John H., Poway, Kalifornia (US);
Shepherd, Timothy A., Indianapolis, Indiana (US);
Rodriguez, Michael J., Indianapolis, Indiana (US);
Jungheim, Louis N., Indianapolis, Indiana (US)

(73) Jogosult:

Agouron Pharmaceuticals, Inc., La Jolla,
Kalifornia (US)

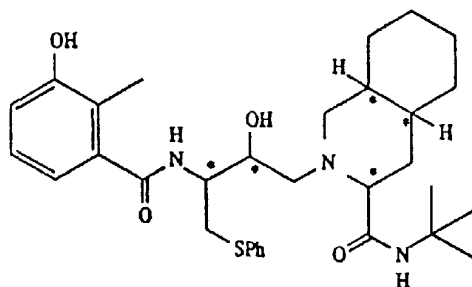
(74) Képviselő:

Kmethy Boglárka, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest(54) **HIV-proteáz-inhibitor hatású dekahidroizokinolin-karboxamid-származékok és alkalmazásuk**

(57) Kivonat

A találmány (1/I) képletű vegyületre, sztereoizomerjére és gyógyászatilag elfogadható sóikra vonatkozik. A találmány tárgya továbbá a vegyületet és gyógyászatilag

elfogadható vivőanyagot tartalmazó gyógyászati készítmény, valamint a vegyület alkalmazása HIV-proteáz gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.



(1/I)

HU 226 814 B1

A találmány új kémiai vegyületekre vonatkozik, amelyek hasznosak HIV-proteáz gátlása tekintetében. A találmány továbbá ilyen vegyületek vírusellenes szerként való alkalmazására is vonatkozik.

A szerzett immunhiányos állapot (AIDS) viszonylag nem túl régen felismert betegség vagy állapot. Az AIDS a szervezet immunrendszerének fokozatos leromlását, valamint a központi és perifériás idegrendszer fokozódó károsodását okozza. Az 1980-as évek kezdetén történt felismerése óta az AIDS gyorsan terjedt, és mára a népesség viszonylag korlátozott részében járványos arányokat ért el. Széles körű kutatások eredményeként felismerték, hogy a betegségért a humán T-limfotrop retrovírus III (HTLV-III) a felelős, amit újabban a humán immunhiányt előidéző vírusként vagy HIV-ként jelöltek.

A HIV a retrovírusokként ismert vírusok osztályába tartozik. A retrovírus genomját olyan RNS alkotja, amely reverz átírást követően DNS-sé konvertálódik. A retrovírusnak ez a DNS-e stabilan beépül a gazdasejtek kromoszómájába, és – a gazdasejtek replikációs folyamatai révén – új retrovírusrészeket termel, és a fertőzést más sejtekre is átviszi. A HIV különös affinitást mutat a humán T-4 limfocitasejthez, amely életfontosságú szerepet játszik a test immunrendszerében. E fehér vértestsejtek HIV-fertőzése csökkenti ezt a sejtpopulációt. Esetenként az immunrendszer működésképtelenné és különböző betegségekkel, így többek között a Kaposi-szarkómával és a nyirokrendszeri rákkal szemben hatástalanná válik.

Bár a HIV képződésének és hatásának pontos mechanizmusa még nem ismert, a vírus azonosítása bizonyos előrehaladáshoz vezetett e betegség szabályozásában. Így az azidotimidin (AZT) hatóanyagot hatásosnak találták a HIV retrovírusos genomja reverz átírásának gátlása szempontjából, ami az AIDS-fertőzötteknek – ha gyógyulást nem is – befolyásolási lehetőséget nyújt. A kutatás olyan hatóanyagok irányában folyik, amelyek képesek gyógyítani vagy legalább javított mértékben szabályozni a halálos HIV vírust.

A retrovírusos replikációt általában poliproteinek posztranszlációs képzése jellemzi. Ez vírusok által kódolt HIV-proteázenzim útján megy végbe. Ennek során érett polipeptidek keletkeznek, amelyek ezt követően részt vesznek a fertőző vírus képződésében és funkcionálásában. Ha ez a molekuláris folyamat gátlást szenved, a HIV normál termelődése megáll. A HIV-proteáz gátló anyagok ezért HIV-ellenes szerként hathatnak.

A HIV-proteáz a HIV struktúrprotein *pol* gén eredetű transzlációs termékek egyike. Ez a retrovírus-proteáz más struktúrpolipeptideket diszkrét helyeken sajátosan hasítva frissen aktivált struktúrproteineket szabadít fel és tesz alkalmassá a virion replikációjához. A HIV-proteáz alkalmas vegyületek útján történő gátlása így megakadályozhatja fertőzött T-limfociták provírusos integrációját a HIV-1 életciklusának korai szakaszában, valamint gátolhatja a késői szakaszban a vírus proteolitikus folyamatait. Ezenkívül a proteázinhibitorok előnye lehet a jelenleg elérhető hatóanyagokhoz ké-

pest könnyebb előállíthatóság, a vírusban hosszabb élettartam és kisebb toxikusság, amire a retrovírus-proteázhoz mutató sajátosságok következtében nyílt mód.

5 Az EP-A-0 560 368 számú bejelentés szubsztituált pipekolinsavszármazékokra mint HIV-proteáz inhibitorokra vonatkozik. A vegyületekről azt írják, hogy gátolják a HIV által indukált citopatogén hatásokat humán sejtekben.

10 Az EP-A-0 539 192 számú bejelentés HIV-proteáz-inhibitor tulajdonságokkal rendelkező oligopeptid analógokra vonatkozik. Ismertetik ezek gyógyászati elfogadható sóit és az ezeket tartalmazó gyógyászati készítményeket is.

15 Az EP-A-0 346 847 számú bejelentés vírusos eredetű proteázokat gátló aktivitással rendelkező aminosavszármazékokra vonatkozik. Ismertetik ezek gyógyászati elfogadható sóit és az ezeket tartalmazó gyógyászati készítményeket is.

20 A találmány ennek megfelelően kémiai anyagok olyan új osztályát biztosítja, amelyek gátolhatják és/vagy blokkolhatják a HIV-proteáz aktivitását, megállíthatják a HIV vírus burjánzását. A találmány továbbá e vegyületeket tartalmazó gyógyászati készítmény, valamint e vegyületek alkalmazása HIV-proteáz gátló anyagnaként.

A találmány az (1/I) képletű vegyületre és gyógyászati elfogadható sóira vonatkozik, amelyek gátolják a humán immunhiányos vírus (HIV) 1. típusa (HIV-1) vagy 2. típusa (HIV-2) által kódolt proteázt. Ezek a vegyületek hasznosak HIV-fertőzés kezelésében és a szerzett immunhiányos állapot (AIDS) kezelésében. A találmány szerinti vegyületek, gyógyászati elfogadható sóik és a gyógyászati készítmények használhatók egyedül vagy egyéb vírusellenes, immunmoduláló anyagokkal, antibiotikumokkal vagy vakcinákkal együtt.

A találmány (1/I) képletű vegyületre és gyógyászati elfogadható sóira vonatkozik.

40 Egy előnyös megvalósítási mód a fenti vegyület (1/II) képletű sztereoizomerére és gyógyászati elfogadható sóira vonatkozik.

Egy különösen előnyös megvalósítási módban a sztereoizomer sója lényegében tiszta.

45 Egy további előnyös megvalósítási módban a sztereoizomer lényegében tiszta.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány (1/III) képletű vegyületre vonatkozik.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja (1/IV) képletű sztereoizomerre vonatkozik.

Egy különösen előnyös megvalósítási módban a sztereoizomer lényegében tiszta.

A találmány egy további megvalósítási módja gyógyászati készítményre vonatkozik, amely a találmány szerinti vegyületet és gyógyászati elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

A találmány egy másik megvalósítási módja a fenti vegyületek bármelyikének alkalmazására vonatkozik HIV-proteáz gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.

A találmány új, a fentiekben definiált képletű vegyületeket biztosít, amelyek hasznosak HIV-fertőzés és/vagy AIDS kezelésében.

A leírásban a hőmérsékletre vonatkozó adatok °C egységben értendők. A használt anyagokra vonatkozó mérési adatok tömegegységben vannak adva a folyadékok kivételével, amelyek térfogategységben vannak meghatározva.

A találmány szerinti vegyületekben legalább két aszimmetriacentrum van, amelyeket az (1/I) általános képletben csillag jelöl.

Ezen aszimmetriacentrumok következtében a találmány szerinti vegyületek előfordulhatnak a lehetséges sztereoizomer alakok bármelyikében, és használhatók a sztereoizomerek elegyeiként, amelyek lehetnek optikailag aktív vagy racém elegyek, vagy használhatók lényegileg tiszta sztereoizomerek alakjában, így legalább 95%-os tisztaságban. Valamennyi aszimmetrikus forma, egyedi sztereoizomer és azok kombinációi is a találmány körébe tartoznak.

Az egyes sztereoizomereket előállíthatjuk a fenti eljárásokkal megfelelő prekursoraiból, a racém elegyek rezolválásával vagy a diasztereomerek elválasztása útján. A rezolválást lefolytathatjuk rezolválószer jelenlétében, kromatográfiás eljárás vagy ismételt kristályosítás vagy ezen eljárásoknak a technika állásából ismert kombinációja útján. A rezolválás részleteit a szakirodalom tárgyalja [Jacques és munkatársai: Enantiomers, Racemates, and Resolutions, John Wiley & Sons, 1981].

A találmány szerinti vegyületek előnyösen lényegében tiszták, azaz 50%-ot meghaladó tisztaságúak. A vegyületek előnyösebben legalább 75%-os, még előnyösebben legalább 90%-os, még előnyösebben legalább 95%-os, különösen előnyösen legalább 97%-os és legelőnyösebben legalább 99%-os tisztaságúak.

A fentiek értelmében a találmány az (1/I) képletű vegyületek gyógyászatilag elfogadható sóit is magában foglalja. A találmány szerinti vegyületek tartalmazhatnak kellően savas, kellően bázikus vagy mindkét funkciós csoportot, és ennek megfelelően reagálhatnak számos szerves vagy szervetlen bázissal, valamint szervetlen vagy szerves savval gyógyászatilag elfogadható só képződése közben.

A gyógyászatilag elfogadható só kifejezésen az (1/I) képletű vegyületek olyan sóit értjük, amelyek élő szervezetek számára lényegileg nem toxikusak. Gyógyászatilag elfogadható sókra példák a találmány szerinti vegyületek ásványi vagy szerves savakkal vagy szervetlen bázisokkal lejátszódó reakciója során képződő sók. A reagenseket savaddíciós sók esetén általában mindkét anyagra nézve megfelelő oldószerben, így dietil-éterben vagy benzolban egyesítjük, míg bázisokkal képzett addíciós sók esetén vizet vagy alkoholokat használunk. A sók 1 óra és 10 nap közötti időtartam alatt általában kicsapódnak az oldatból, és szűrés vagy egyéb szokásos eljárás útján izolálhatók. Az ilyen sók savaddíciós és bázisokkal képzett addíciós sóként ismertek.

Savaddíciós sók képzésére alkalmazható savak lehetnek szervetlen savak, így hidrogén-klorid, hidrogén-

bromid, hidrogén-jodid, kénsav, foszforsav és hasonló, továbbá szerves savak, így para-toluolszulfonsav, metánszulfonsav, oxálsav, para-bróm-fenil-szulfonsav, szénsav, borostyánkősav, citromsav, benzoésav, ecetsav és hasonló.

Gyógyászatilag elfogadható sókra példák a szulfát, piro-szulfát, hidrogén-szulfát, szulfít, hidrogén-szulfít, foszfát, monohidrogén-foszfát, dihidrogén-foszfát, metafoszfát, pirofoszfát, klorid, bromid, jodid, acetát, propionát, dekanóát, kaprilát, akrilát, formiát, izobutirát, kaproát, heptanoát, propiolát, oxalát, malonát, szukcinát, szuberát, szebacát, fumarát, maleát, butin-1,4-dioát, hexin-1,6-dioát, benzoát, klór-benzoát, metil-benzoát, dinitro-benzoát, hidroxibenzoát, metoxibenzoát, ftalát, szulfonát, xilolszulfonát, fenil-acetát, fenil-propionát, fenil-butirát, citrát, laktát, g-hidroxibutirát, glikolát, tartarát, metánszulfonát, propánszulfonát, naftalin-1-szulfonát, naftalin-2-szulfonát, fenil-glikolát és hasonló.

A gyógyászatilag elfogadható savaddíciós sók közül előnyösek az ásványi savakkal, így a hidrogén-kloriddal és hidrogén-bromiddal képzett, valamint szerves savakkal, így maleinsavval és metánszulfonsavval képzett sók.

Bázisokkal képzett addíciós sók magukban foglalják a szervetlen és szerves bázisokból, így az ammónium- vagy alkálifém- vagy alkáliföldfém-hidroxidokból, karbonátokból, hidrogén-karbonátokból és hasonlókból származtatott sókat. A találmány szerinti sók előállításánál során hasznos bázisok, így többek között a nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónium-hidroxid, kálium-karbonát, nátrium-karbonát, nátrium-hidrogén-karbonát, kálium-hidrogén-karbonát, kalcium-hidroxid és kalcium-karbonát. Különösen előnyösek a kálium- és nátriumsók alakjában lévő vegyületek.

Megjegyezzük, hogy a találmány szerinti sók részét képező ellenionok anyagi természete nem kritikus mindaddig, amíg a só egésze gyógyászatilag elfogadható, és az ellenion a só egészének minőségét nem befolyásolja hátrányosan.

A találmány szerinti vegyületek a következők:

az (1/I) képletű 2-[2'-hidrox-3'-(fenil-tio-metil)-4'-aza-5'-oxo-5'-(2''-metil-3''-hidrox-phenil)-pentil]-dekahidroizokinolin-3-N-terc-butil-karboxamid,

az (1/III) képletű 2-[2'-hidrox-3'-(fenil-tio-metil)-4'-aza-5'-oxo-5'-(2''-metil-3''-hidrox-phenil)-pentil]-dekahidroizokinolin-3-N-terc-butil-karboxamid-metánszulfonsav-só.

A fenti képletekkel leírt vegyületek mindegyikében öt aszimmetriacentrum van, így azok 32 egyedi sztereoizomer csoportjából választható vegyületeket és két vagy több sztereoizomerből képzett tetszőleges elegyet határoznak meg.

E vegyületek előnyös sztereoizomerei a következők:

a (1/II) képletű [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-hidrox-3'-(fenil-tio-metil)-4'-aza-5'-oxo-5'-(2''-metil-3''-hidrox-phenil)-pentil]-dekahidroizokinolin-3-N-terc-butil-karboxamid,

a (1/IV) képletű [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-hidrox-3'-(fenil-tio-metil)-4'-aza-5'-oxo-5'-(2''-metil-

3''-hidroxi-fenil)-pentil]-dekahidroizokinolin-3-N-terc-butil-karboxamid-metánszulfonsav-só, vagy a fentiekben felsorolt legelőnyösebb vegyületek gyógyszerilag elfogadható sói.

A találmány szerinti általános képletű vegyületeket előállíthatjuk az A általános reakcióvázlatnak megfelelően, ahol

- D jelentése nitrogénatom,
- G jelentése oxigénatom,
- Q₁ jelentése t-butil-csoport,
- Q₂ jelentése hidrogénatom,
- B jelentése dekahidroizokinolin-gyűrű,
- Q₃ jelentése fenil-tio-csoport,
- Q₉ jelentése hidrogénatom,
- E jelentése szénatom,
- Q₄ jelentése metilcsoport,
- Q₅ jelentése hidroxilcsoport,
- A jelentése benzolgyűrű.

Az A reakcióvázlaton feltüntetett reakció szokásos kapcsolási reakció, amelyet általánosan alkalmaznak amidok vagy peptidok szintézise során. A reakciót úgy folytatjuk le, hogy megfelelően helyettesített (II) általános képletű aminot aprotikus oldószerben vagy oldószerek elegyében megfelelően helyettesített (III) általános képletű karbonsavval reagáltatjuk. A reakciót rendszerint aktivátor jelenlétében vagy aktivátor nélkül, előnyösen aktivátor jelenlétében folytatjuk le, ennek során kapcsolószer is jelen van. E reakció számára jellegzetes aprotikus oldószerek a tetrahydrofuran és a dimetilformamid vagy ilyen oldószerek elegyei. A reakció-hőmérséklet általában -30 °C és 25 °C között van. Az aminreagenst a karbonsavhoz viszonyítva általában ekvimoláris mennyiségben használjuk, ahol a kapcsolószer is ekvimoláris mennyiségben vagy csekély feleslegben van jelen. Jellegzetes kapcsolószer többek között a karbodiimidek, így a diciklohexil-karbodiimid (DCC) és az N,N'-dietil-karbodiimid; az imidazolok, így karbonil-diimidazol; továbbá bisz(2-oxo-3-oxazolidinil)-foszfinil-klorid (BOP-C1) vagy N-(etoxi-karbonil)-2-etoxi-1,2-dihidrokinolin (EEDQ). E reakcióhoz az előnyös kapcsolószer a DCC. Ezt a reakciót előnyösen aktivátorral folytatjuk le; előnyös aktivátor a hidroxil-benzotriazol-hidrát (HOBT·H₂O).

A reakció befejeződése után – kívánt esetben – a vegyületet elválaszthatjuk a technika állása szerint ismert eljárásokkal, így a vegyületet kikristályosíthatjuk és szűréssel összegyűjthetjük, vagy a reakcióelegyben lévő oldószert eltávolíthatjuk extrakció, bepárlás vagy dekantálás útján. Kívánt esetben a vegyületet tovább tisztíthatjuk szokásos eljárásokkal, így kristályosítás útján vagy szilárd hordozón, így szilikagélén vagy timföldön lefolytatott kromatográfiás eljárással.

A (II) általános képletű kiindulási vegyületeket a B általános reakcióvázlaton feltüntetett eljárásokkal állíthatjuk elő. A B reakcióvázlatban szereplő általános képletekben

VA jelentése amino-védőcsoport;
B, D, G, Q₁, Q₂, Q₃ és Q₉ jelentése megegyezik az (I) általános képletnél megadott jelentésekkel; és
ZZ jelentése halogénatom.

A B reakcióvázlat szerinti eljárást úgy valósítjuk meg, hogy az 1–7. reakciókat a megadott sorrendben kivitelezünk. A reakció befejeződése után a közterméket – kívánt esetben – ismert eljárásokkal izolálhatjuk, így a vegyületet kristályosíthatjuk és szűréssel összegyűjthetjük, vagy a reakcióelegyben lévő oldószert extrakció, bepárlás vagy dekantálás útján eltávolíthatjuk. Kívánt esetben a közterméket tovább tisztíthatjuk szokásos eljárásokkal, így kristályosítás útján vagy szilárd hordozón, így szilikagélén vagy timföldön lefolytatott kromatográfiás eljárással, mielőtt a reakcióvázlat következő lépését lefolytatjuk.

A B. 1 reakciót úgy folytatjuk le, hogy egy védett aminocsoportot tartalmazó, (IV) általános képletű reagenst szokásos körülmények között a megfelelő vegyes anhidriddé alakítunk. Többek között védett aminocsoportot tartalmazó karbonsavat reagáltathatunk 1–6 szénatomos alkil-klór-hangyasav-észterrel, így izobutil-klór-hangyasav-észterrel, előnyösen savmegkötő anyag jelenlétében. Előnyös savmegkötő anyagok a trialkil-aminok, még előnyösebben trietil-amint használunk. A reakciót általában aprotikus oldószerben, így etil-acetátban folytatjuk le. Az oldószer megválasztása nem kritikus mindaddig, amíg az alkalmazott oldószer a lefolytatott reakció szempontjából inert, és a reagensek a kívánt reakció lejátszódásához kellően szolubilizált állapotban vannak. A kapott vegyes anhidridet előnyösen további izolálás vagy tisztítás nélkül használjuk fel a B.2 reakcióban.

A B.2 reakciót két lépésben folytatjuk le. Először diazo-metán előállítására éter típusú oldószer, előnyösen dietil-éter rétegével borított nátrium-hidroxid-oldatot reagáltatunk N-metil-N-nitro-N-nitrozo-guanidin nagy feleslegével. A nátrium-hidroxidot előnyösen vizes oldat alakjában használjuk, amelynek koncentrációja 4–6 mol/l. A reakció befejeződését követően a szerves fázist szárítószer, így vízmentes kálium-hidroxid felett szárítjuk. A megfelelő α-diazo-karbonil előállítására ezt az oldatot a fenti B. 1 reakcióban kapott vegyes anhidriddel reagáltatjuk. A diazo-metán-reagenst ebben a reakcióban előnyösen izolálás vagy tisztítás nélkül használjuk. A reakciót általában -50 °C és -10 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen -20 °C-os névleges hőmérsékleten folytatjuk le.

A B.3 reakcióban α-halogén-karbonil előállítására a B.2 reakcióban előállított α-diazo-karbonilt H-ZZ általános képletű savval – amely képletben ZZ jelentése halogénatom – reagáltatjuk általában aprotikus oldószerben, így dietil-éterben. A megfelelő α-klór-karbonil előállítására használt előnyös sav a hidrogén-klorid. A reakciót általában -30 °C és 0 °C közötti hőmérsékleten folytatjuk le. Az oldószer megválasztása nem kritikus mindaddig, amíg az alkalmazott oldószer a lejátszódó reakcióra nézve inert és a kívánt reakció lejátszódásához a reagensek kellően szolubilizált állapotban vannak. A reagensként használt savat általában vízmentes gáz alakjában kis részletekben adagoljuk a reakció befejeződéséig. A reakció lejátszódását vékonyréteg-kromatográfiás eljárással követhetjük.

A B.4 reakcióban a megfelelő α -klór-hidroxi-vegyület előállítására a B.3 reakcióban előállított vegyület karbonilcsoportját a technika állásából ismert szokásos eljárásokkal redukáljuk. A B.3 reakcióban előállított vegyületet többek között oldószerek elegyében redukálószerrel egyesíthetjük. Jellemző redukálószer többek között a nátrium-[tetrahidrido-borát](1-), lítium-[tetrahidrido-borát](1-), cink-[tetrahidrido-borát](1-), diizobutil-alumínium-hidrid és nátrium-bisz(2-metoxi-etoxi)-alumínium-hidrid. Előnyös redukálószer a nátrium-[tetrahidrido-borát](1-). Jellegzetes oldószerelegyek többek között aprotikus és aprotikus elegyek, így tetrahidrofuran és víz elegye. Az oldószer megválasztása nem kritikus mindaddig, amíg az alkalmazott oldószer a lejátszódó reakcióra nézve inert és a kívánt reakció lejátszódásához a reagensek kellően szolubilizált állapotban vannak. A reakciót általában $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ot meghaladó hőmérsékleten, előnyösen $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ névleges hőmérsékleten folytatjuk le.

A B.5 reakcióban a megfelelő epoxid előállítására a B.4 reakcióban előállított α -klór-hidroxi-vegyületet erős bázissal kezeljük a technika állásából ismert szokásos körülmények között. Az α -klór-hidroxi-vegyületet többek között reagáltathatjuk alkohol típusú oldószerben, így etanolban nátrium-hidroxid/etanol eleggyel. A reakciót jellemzően $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tól az oldószer forráspontjáig terjedő hőmérsékleten folytatjuk le. A reakció előnyös hőmérséklete a szobahőmérséklet.

A B.6 reakcióban a B.5 reakció szerint előállított epoxidot (V) általános képletű heterociklusos reagenssel reagáltatjuk jellemzően alkohol típusú oldószerben $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten. Az oldószer megválasztása nem kritikus mindaddig, amíg az alkalmazott oldószer a lejátszódó reakcióra nézve inert és a kívánt reakció lejátszódásához a reagensek kellően szolubilizált állapotban vannak. E reakcióhoz használt jellemző oldószerek alkoholok, előnyösen izopropanol vagy etanol. A reakciót előnyösen $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ névleges hőmérsékleten folytatjuk le.

A B.7 reakció aminosav-vegyületet szokásos lehasítási reakciója a technika állásából ismert eljárásokat és módszereket használva a fenti A reakcióvázlatban használt megfelelő aminosav előállítására. A kapott aminosav reagáltathatjuk tisztítás nélkül, azonban előnyösen előzőleg tisztítjuk.

A B.6 reakció lépés kiindulási anyagként használt (V) általános képletű vegyületeket ismert eljárásokkal és módszerekkel állíthatjuk elő. A heterociklusos reagenseket jellemző módon a megfelelő, védett aminosav-vegyületet tartalmazó aminosavakból állítottuk elő savas aktiválást követően alkil-aminallal lefolytatott kezelés útján. Ezt a reakciót általában savmegkötő anyag, így N-metil-morfolin jelenlétében folytatjuk le. Az aminosav-vegyületnek a kémiai gyakorlatban szokásos aminosav-vegyület lehasítás útján történő eltávolítása a kívánt heterociklusos reagenseket eredményezi.

Az A reakcióvázlatban használt (III) általános képletű karbonsavat – amennyiben kereskedelmi forgalomban nem szerezhető be – ismert eljárásokkal előállíthatjuk. Közlekedési utat ezt a reagenst előállíthatjuk ke-

reskedelmi forgalomban kapható karbociklusos vagy heterociklusos vegyületek további helyettesítése és/vagy oxidálása útján. Így a (VII) általános képletű karbociklusos vagy heterociklusos vegyületeket ismert eljárásokkal oxidálhatjuk. A (VII) általános képletű vegyületet sajátos esetekben reagáltathatjuk oxidálószerrel, így szelén-dioxiddal vagy kálium-permanganáttal $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten a reagensekre nézve egyaránt inert oldószerben, így vízben vagy difenil-éterben.

A (III) általános képletű vegyületek további előállítására eljárása során megfelelően helyettesített karboxilezett karbociklusos vagy heterociklusos csoportot karboxi-vegyülettel védünk, majd a karbociklusos vagy heterociklusos csoportot ismert eljárásokkal tovább helyettesítjük. A karboxi-vegyületet ezután ismert eljárásokkal eltávolítva a kívánt (III) általános képletű karbonsavreagenst kapjuk.

A karboxi-vegyület kifejezésen a leírásban a karboxicsoporthoz olyan helyettesítőket értjük, amelyeket általában a karboxicsoporthoz blokkolására vagy védelmére használnak, miközben a vegyületen lévő egyéb funkcionális csoportokat reagáltatnak. Ilyen karboxi-vegyületekre példa többek között a metil-, p-nitro-benzil-, p-metil-benzil-, p-metoxi-benzil-, 3,4-dimetoxi-benzil-, 2,4-dimetoxi-benzil-, 2,4,6-trimetoxi-benzil-, 2,4,6-trimetil-benzil-, pentametil-benzil-, 3,4-metilén-dioxi-benzil-, benzhidril-, 4,4'-dimetoxi-benzhidril-, 2,2',4,4'-tetrametoxi-benzhidril-, terc-butil-, terc-amil-, tritil-, 4-metoxi-tritil-, 4,4'-dimetoxi-tritil-, 4,4',4''-trimetoxi-tritil-, 2-fenil-prop-2-ol-, trimetil-szilil-, terc-butil-dimetil-szilil-, fenacil-, 2,2,2-triklór-etil-, b-[di(n-butil)-metil-szilil]-etil-, p-toluolszulfonil-etil-, 4-nitro-benzil-szulfonil-etil-, allil-, cinnamil- és 1-(trimetil-szilil-metil)-prop-1-en-3-ol-csoport. A karboxicsoporthoz védelmére előnyösen úgy járunk el, hogy azt amidcsoporttá alakítjuk, majd a kívánt karboxicsoporthoz biztosítására az amidcsoportot hidrolízis útján visszaállítjuk. Ilyen csoportokra további példák találhatók a szakirodalomban [E. Haslam: Protective Groups in Organic Chemistry, 5. fejezet (szerkesztő: J. G. W. McOmie, Plenum Press, New York, N. Y., 1973 és T. W. Greene: Protective Groups in Organic Synthesis, 5. fejezet, John Wiley and Sons, New York, N. Y., 1981)].

A karboxicsoporthoz védelmére szolgáló előnyös eljárás szerint a karboxicsoporthoz savval aktiváljuk, majd amidot képezünk. A karboxicsoporthoz aktivált karboxicsoporthoz alakítására többek között savhalogenid, acil-anhidrid vagy acil-imidazollal alakíthatjuk előnyösen savmegkötő anyag jelenlétében. Szokásosan kereskedelmi forgalomban beszerezhető savkloridot használunk, ezáltal elkerülhetővé válik további savas aktiválás szükségessége. Előnyös savmegkötő anyagok a trialkil-aminok, még előnyösebben trietil-amin használunk. A reakciót szokásosan aprotikus oldószerben, így többek között dietil-éterben vagy metilén-kloridban folytatjuk le. Az előnyös oldószer a metilén-klorid. Az oldószer megválasztása nem kritikus mindaddig, amíg az alkalmazott oldószer a lejátszódó reakcióra nézve inert és a kívánt reakció lejátszódásához a

reagensek kellően szolubilizált állapotban vannak. Az aktivált karboxicsoprotot ezután $R^{11}-NH_2$ általános képletű aminnal, így anilinnal reagáltatjuk aprotikus oldószerben, ennek során (VIII) általános képletű amidot kapunk, amelyet ismert eljárásokkal tovább helyettesíthetünk.

A (VIII) általános képletű amidreagenst tovább helyettesíthetjük a (b) általános képletű csoport orto-helyzetű deprotonálása útján, ezáltal a megfelelő aniont kapjuk, ezt követően számos reagenssel, így alkil-halogenidekkel vagy halogénezőszerekkel, így brómmal lefolytatott reakció következhet. Az amidreagenst általában kétszeresen deprotonáljuk, ehhez az amidreagenshez viszonyítva 2 ekvivalens mennyiségű erős bázist, így n-butil-lítiumot vagy szek-butil-lítiumot használunk adott esetben fémekkel koordinációs vegyületet képező szer, így tetrametil-etilén-diamin (TMEDA) jelenlétében. A reakciót általában aprotikus oldószerben, előnyösen éterben, így többek között dietil-éterben vagy tetrahidrofuranban folytatjuk le $-78^\circ C$ és $25^\circ C$ közötti hőmérsékleten.

A kívánt, (III) általános képletű helyettesített karbonsavreagens előállítására a kapott vegyületet ezután ismert eljárásokkal hidrolizálhatjuk. A hidrolízist többek között lefolytathatjuk oly módon, hogy az amidreagenst erős ásványi savval, szerves savval vagy ásványi sav és szerves sav elegyével kezeljük $100^\circ C$ és $160^\circ C$ közötti hőmérsékleten. Az ebben a reakcióban általánosan használható savak többek között a hidrogén-bromid, ecetsav és hidrogén-klorid. A reakció meggyorsítására adott esetben használhatunk lezárt csövet.

A (III) általános képletű helyettesített karbonsavreagens előállításának harmadik módszere szerint anilint diazotálunk, majd a kapott diazóniumsót befagyaszttjuk. Az anilinreagens aminocsoportját sajátosan salétromossavval lefolytatott reakció útján alakítjuk diazóniumsóvá. Salétromossavat előállíthatunk *in situ* oly módon, hogy nátrium-nitritet erős sav, így sósav vagy kénsav vizes oldatával kezelünk. Ezt a reakciót általában $5^\circ C$ -nál alacsonyabb hőmérsékleten folytatjuk le. A kívánt helyettesített aromás rendszer előállítására a diazóniumsót ezután alkalmas reagenssel kezeljük. Erre a kezelésre alkalmas reagensek többek között a víz, cianidok, halogenidek és a kénsav vizes oldata. A kívánt reakció kedvező befolyásolása érdekében a reakcióelegyet általában melegítjük.

A technika állásából számos reakció ismert, amelyek a karbociklusos vagy heterociklusos gyűrűkön lefolytatandó kívánt helyettesítésekhez felhasználhatók. A szakirodalom számos aromás elektrofil és nukleofil helyettesítő reakciót ismertet [March J.: Advanced Organic Chemistry, 3. kiadás, 11. és 13. fejezet, Wiley, 1985].

A (III) általános képletű vegyületeket ezenkívül előállíthatjuk megfelelően helyettesített karbociklusos vagy heterociklusos vegyületek karboxilezésével is. A karboxilezést számos reagenssel lefolytathatjuk. A karbociklusos vagy heterociklusos reagenst többek

között reagáltathatjuk foszfénnel, oxalil-kloriddal, karbamid-hidrokloriddal vagy N,N-dietil-karbamoil-kloriddal Friedel–Crafts-katalizátorok jelenlétében. E reakció változatai közé tartozik karbociklusos vagy heterociklusos reagens reagáltatása alkil-tiol-klor-hangyasav-észterrel (RSCOCI) vagy karbamoil-kloriddal (H_2NCOCl) amid, illetve tiol-észter előállítására. Az amidot vagy tiol-észtert a kívánt karboxicsoprot előállítására ezután hidrolizálhatjuk (lásd a fenti irodalmi hivatkozás 491. oldalán).

A Friedel–Crafts-katalizátorokra példák többek között a Lewis-savak, így az alumínium-bromid ($AlBr_3$), alumínium-klorid ($AlCl_3$), vas(III)-klorid ($FeCl_3$), bór-triklorid (BCl_3) és bór-trifluorid (BF_3), továbbá a szakirodalom is számos alkalmas katalizátort ismertet [March J.: Advanced Organic Chemistry, 3. kiadás, Wiley, 1985; Oláh: Friedel–Crafts and Related Reactions, Interscience, New York, 1963–1965; és Oláh: Friedel–Crafts Chemistry, Wiley, New York, 1973].

A következőkben a találmányt előállítási példákkal és példákkal szemléltetjük. Ezek a példák csupán a szemléltetés célját szolgálják, ezért nem korlátozó jellegűek.

A magmágneses rezonanciaspektrum, elektronüt-közéses tömegspektrum, térdeszorpciós tömegspektrum, gyors atomokkal végzett bombázás útján mért tömegspektrum, infravörös spektrum, ultraibolya spektrum, nagynyomású folyadékkromatográfia és vékonyréteg-kromatográfia rövidítései a következők: NMR, EIMS, MS(FD), MS(FAB), IR, UV, HPLC és TLC. Megjegyezzük, hogy az IR-spektrumra vonatkozóan felsorolt abszorpciós maximumok nem tartalmazzák az összes maximumot, hanem csak a jellegzetesebb értékeket.

Az NMR-spektrumokkal kapcsolatban a következő rövidítéseket használjuk: szingulett (s), duplett (d), kettős duplett (dd), triplett (t), kvartett (q), multipllett (m), kettős multipllett (dm), széles szingulett (br.s), széles duplett (br.d), széles triplett (br.t), széles multipllett (br.m). J a herz (Hz) egységben megadott kapcsolási együtthatót jelzi. Egyéb utalás hiányában az NMR adatok szabad bázis alakjában lévő találmány szerinti vegyületekre vonatkoznak.

Az NMR-spektrum adatait Bruker Corp. 270 MHz típusú berendezésen vagy General Electric QE-300 300 MHz típusú berendezésen mértük. A kémiai eltolódás adatait δ értékekben fejeztük ki (a tetrametil-szilántól számítva ppm egységben). Az MS(FD) spektrumot Varian-MAT 731 Spektrometer típusú berendezéssel vettük fel karbon dendrit emittert használva. Az EIMS spektrumot CEC 21-110 típusú berendezéssel mértük (gyártó cég: Consolidated Electrodynamic Corporation). Az MS(FAB) spektrum meghatározására VG ZAB-3 Spektrometer típusú berendezést használtunk. Az IR-spektrumot Perkin-Elmer 281 típusú berendezéssel mértük. Az UV spektrumot Cary 118 típusú berendezéssel határoztuk meg. TLC lefolytatására E. Merck gyártmányú szilikagéllemezeket használtunk. Az olvadáspontra megadott értékek korrekciót nem tartalmaznak.

Referencia előállítási példa

A) 2R-N-(Benzil-oxi-karbonil)-amino-3-naft-2-il-tio-propánsav

1,28 g (8,00 mmol) naftalin-2-ol 30 ml tetrahidrofuranban lévő oldatához nitrogénatmoszféra alatt lassan 1,77 g 60 tömeg%-os nátrium-hidridet adtunk. 15 perc időtartamú keverés után 20 ml tetrahidrofuranban lévő N-(benzil-oxi-karbonil)-szerin-β-lakton oldatát adtuk lassan az elegyhez. A reakcióelegyet 1 óra alatt hagytuk szobahőmérsékletre lehűlni, majd csökkentett nyomáson betöményítve maradékot kaptunk. Ezt a maradékot etil-acetátban oldottuk és egymást követően 0,5 mol/l koncentrációjú nátrium-hidrogén-szulfát-oldattal és telített sóoldattal mostuk. A kapott fázisokat elválasztottuk, és a szerves fázist vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, szűrtük, majd csökkentett nyomáson betöményítve maradékot kaptunk. Ezt a maradékot elárasztásos kromatográfiás eljárással tisztítva 2,08 g halvány-sárga színű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés: 68%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 3,42–3,61 (br.m, 2H), 5,53–5,76 (br.s, 1H), 4,85–5,08 (br.m, 2H), 5,54–5,76 (br.s, 1H), 7,06–7,97 (m, 12H).

[α]_D –55,72° (c 1,0, MeOH).

IR (KBr): 3348, 3048, 1746, 1715, 1674, 1560, 1550, 1269, 1200, 1060 cm⁻¹.

MS (FD): m/e 381 (M⁺), 381 (100).

A C₂₀H₁₉NO₄S összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
Számított:	66,12	5,02	3,67
Mért:	66,22	5,04	3,86

B) 3R-1-Diazo-2-oxo-3-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-4-(naft-2-il-tio)-bután

A referencia előállítási példa A) lépése 15,38 g (40,3 mmol) cím szerinti vegyületének 230 ml etil-acetátban lévő (–30 °C-ra hűtött) hideg oldatához nitrogénatmoszféra alatt fecskendő segítségével 5,62 ml (40,3 mmol) trietil-amint adtunk lassan. A kapott oldatához fecskendővel 7,84 ml (60,5 mmol) izobutil-klór-szénsav-észtert adtunk. Egy külön reakcióedényben 170 ml dietil-éter és 170 ml 5 mol/l koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldat kétfázisú elegyéhez óvatosan 10 g N-(metil)-N-(nitro)-N-(nitrozo)-guanidint adtunk óvatosan intenzív gázfejlődés közben. A reakció befejeződése után a szerves fázist a vizes fázisról nátrium-hidroxidra dekantáltuk és megszáritottuk. A fenti diazo-metán előállítását és addíciót azonos mennyiségű dietil-éter és nátrium-hidroxid, valamint 30 g N-(metil)-N-(nitro)-N-(nitrozo)-guanidin alkalmazásával megismételtük. A kapott diazo-metán-reagenst a fentiek szerint előállított vegyes anhidridoldathoz adtuk, és a reakcióelegyet hagytuk hidegen (–30 °C hőmérsékleten) 20 percig reagálni. Amint a reakció – vékonyréteg-kromatográfiás eljárás (TLC) szerint – befejeződött, a diazo-metán feleslegének eltávolítására tüzi polírozású Pasteur-pipettán keresztül nitrogént buborékkoltattunk az oldaton át, majd az oldatot csökkentett nyomáson betöményítve maradékot kaptunk. Ezt a maradékot (metilén-kloridban lévő 10 térfogat% etil-acetát eluenssel lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással tisztítva 13,62 g sárga olajat kaptunk (kitermelés: 83%).

tásos kromatográfiás eljárással tisztítva 13,62 g sárga olajat kaptunk (kitermelés: 83%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 3,32–3,46 (m, 2H), 4,40–4,67 (m, 1H), 5,00–5,09 (m, 2H), 5,44 (s, 1H), 5,76 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,25–7,86 (m, 12H).

C) 3R-1-Klór-2-oxo-3-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-4-(naft-2-il-tio)-bután

A referencia előállítási példa B) lépése 13,62 g (33,59 mmol) termékének 230 ml dietil-éterben készített hideg (–20 °C hőmérsékletű) oldatán rövid (2 másodperc) ideig vízmentes sósavgázt fúvattunk keresztül, ami gázfejlődést eredményezett. Ezt az eljárást megismételtük ügyelve arra, hogy feleslegben ne vigyünk be sósavat. A reakció teljes lejátszódása után – amit TLC útján követtünk – az oldatot csökkentett nyomáson betöményítve maradékot kaptunk. Ezt a maradékot (metilén-kloridban lévő 10 térfogat% etil-acetát eluenssel lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással tisztítva 12,05 g halvány cserszínű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés: 87%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 3,41 (dd, J=12,6 Hz, 1H), 3,53 (dd, J=12,6 Hz, 1H), 4,18 (AB q, J=41,9 Hz, J=15,9 Hz, 2H), 4,77 (dd, J=9, 3 Hz, 1H), 5,04 (AB q, J=12 Hz, J=10,4 Hz, 2H), 5,59 (d, J=7 Hz, 1H), 7,24–7,85 (m, 12H).

[α]_D –80,00° (c 1,0, MeOH).

IR (CHCl₃): 3426, 3031, 3012, 1717, 1502, 1340, 1230, 1228, 1045 cm⁻¹.

MS (FD): m/e 413 (M⁺), 413 (100).

A C₂₂H₂₀NO₃SCI összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
Számított:	63,84	4,87	3,38
Mért:	64,12	4,95	3,54

D) [3R-(3R,4S*)]-1-Klór-2-hidroxi-3-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-4-(naft-2-il-tio)-bután*

A referencia előállítási példa C) lépése 530 mg (1,28 mmol) termékének 10 ml tetrahidrofuranban és 1 ml vízben készített hideg (0 °C hőmérsékletű) oldatához 73 mg (1,92 mmol) nátrium-[tetrahidrido-borát](1–)-ot adtunk. Amikor TLC a reakció befejeződését jelezte, 10 ml vizes telített ammónium-klorid-oldat és 500 µl 5 mol/l koncentrációjú sósavoldat útján az oldat pH-ját 3-ra állítottuk be. A kapott oldatot metilén-kloriddal kétszer extraháltuk, az egyesített szerves fázisokat vízzel mostuk, vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, szűrtük, majd csökkentett nyomáson betöményítve maradékot kaptunk. Ezt a maradékot (metilén-klorid eluálószerrel lefolytatott) radiális kromatográfiás eljárással tisztítva 212 mg cserszínű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés 40%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 3,40 (s, 2H), 3,61–3,71 (m, 2H), 3,97–3,99 (m, 2H), 4,99 (s, 2H), 5,16 (br.s, 1H), 7,21–7,83 (komplex, 12H).

MS (FD): m/e 415 (M⁺), 415 (100).

[α]_D –47,67° (c 0,86; MeOH).

IR (CHCl₃): 3630, 3412, 3011, 1720, 1502, 1236, 1044 cm⁻¹.

A $C_{22}H_{22}NO_3$ IS összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
Számított:	63,53	5,33	3,37
Mért:	63,72	5,60	3,64

E) [1'R-(1'R,1S*)]-1-[(1'-N-(Benzil-oxi-karbonil)-amino-2'-(naft-2-il-tio)-etil]-oxirán*

A referencia előállítási példa D) lépése 190 mg (0,46 mmol) termékének 6 ml 1:2 térfogatarányú etanol/etil-acetát elegyben lévő oldatához 31 mg (0,55 mmol) kálium-hidroxid 1 ml etanolban lévő oldatát adtuk. Amikor TLC a reakció befejeződését jelezte, a reakcióelegyet víz és metilén-klorid elegybe öntöttük. A kapott fázisokat elválasztottuk, a szerves fázist vízzel mostuk, vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, szűrtük, majd csökkentett nyomáson betöményítve maradékot kaptunk. Ezt a maradékot (metilén-kloridban lévő 10 térfogat% etil-acetát eluálószerrel lefolytatott) radiális kromatográfiás eljárással tisztítva 172 mg halvány cserszínű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés: 99%).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 2,76 (br.s, 2H), 3,01 (br.s, 1H), 3,31 (d, J=5 Hz, 2H), 3,77 (br.s, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,22 (d, J=6 Hz, 1H), 7,25–7,85 (komplex, 12H).

$[\alpha]_D -125,42^\circ$ (c 0,59; MeOH).

MS (FD): m/e 379 (M^+), 379 (100).

IR ($CHCl_3$): 3640, 3022, 2976, 1720, 1502, 1235, 1045 cm^{-1} .

A $C_{22}H_{21}NO_3$ S összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
Számított:	69,63	5,58	3,69
Mért:	69,41	5,53	3,64

F) [2S-(2R,2'R*,3'S*)]-1-[2'-Hidroxi-3'-(N-benzil-oxi-karbonil)-amino-4'-(naft-2-il-tio)-butil]-piperidin-2-N-(terc-butil)-karboxamid*

A referencia előállítási példa E) lépése 0,51 g (1,34 mmol) termékének és a 4C) előállítási példa 0,26 g (1,41 mmol) termékének 25 ml izopropanolban lévő oldatát 8 órán át 55 °C hőmérsékletre hevítettük. A kapott reakcióelegyet lehűtöttük, majd csökkentett nyomáson betöményítve a nyers reakcióterméket kaptuk. Ezt az anyagot (4 mm-es lemezen metilén-kloridban lévő 10 térfogat% acetone eluálószerrel lefolytatott) radiális kromatográfiás eljárással tisztítva 104 mg fehér színű habot kaptunk (kitermelés: 14%).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 1,29 (s, 9H), 1,44–1,82 (m, 6H), 2,19 (m, 1H), 2,40 (m, 1H), 2,68 (m, 2H), 3,09 (m, 1H), 3,46 (m, 2H), 4,00 (m, 2H), 5,01 (s, 2H), 5,73 (d, 1H), 6,01 (br.s, 1H), 7,23–7,34 (m, 5H), 7,45 (m, 3H), 7,72–7,83 (m, 4H).

MS (FD): m/e 563 (M^+ , 100).

G) [2S-(2R,2'S*,3'S*)]-1-[2'-Hidroxi-3'-amino-4'-(naft-2-il-tio)-butil]-piperidin-2-N-(terc-butil)-karboxamid*

A referencia előállítási példa F) lépése 1,05 g (0,18 mmol) cím szerinti termékét 1 órán át 10 ml 30 tö-

meg%-os hidrogén-bromidot tartalmazó ecetsavoldatban reagáltattuk. A kapott reakcióelegyet betöményítettük, toluollal három alkalommal azeotrópos desztillációt folytattunk le, amit egyenként 4,5 ml dietil-amint és ammónium-hidroxidot tartalmazó metanolban végzett oldás és csökkentett nyomáson történő betöményítés követett, amelynek során maradékot kaptunk. Ezt a maradékot (1 mm-es lemezen 1 tömeg% ecetsavat tartalmazó metilén-kloridban lévő 3 térfogat% metanol eluálószerrel lefolytatott) radiális kromatográfiás eljárással tisztítva 64 mg fehér színű habot kaptunk (kitermelés: 80%).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 1,29 (s, 9H), 1,52–1,73 (m, 6H), 1,84 (m, 1H), 2,31–2,43 (m, 2H), 2,75–3,04 (m, 5H), 3,17 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 3,71 (m, 1H), 6,22 (br.s, 1H), 7,47 (m, 3H), 7,73–7,82 (m, 4H).

MS (FD): m/e 430 (M^+ , 100).

1. előállítási példa

A) 2R-2-N-(Benzil-oxi-karbonil)-amino-3-(fenil-tio)-propánsav

A kívánt cím szerinti intermediert a referencia előállítási példa A) lépésben leírt eljárással állítottuk elő, ennek során a bepárlási maradék előállításához 13,1 ml (127 mmol) tiofenolt, 4,6 g (117 mmol) 60 tömeg%-os nátrium-hidrid-oldatot és 25,6 g (116 mmol) L-N-(benzil-oxi-karbonil)-szerin- β -laktont használtunk 450 ml tetrahidrofuranban. Ezt a maradékot (4:1 térfogatarányú metilén-klorid/etil-acetát elegyben lévő 0–2 térfogat% ecetsav eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással tisztítva 27,9 g fehér színű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés: 72%).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 7,55–7,18 (m, 10H), 5,55 (d, J=7 Hz, 1H), 5,08 (s, 2H), 4,73–4,60 (m, 1H), 3,55–3,30 (m, 2H).

IR (KBr): 3304, 3035, 1687, 1532, 736 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 332, 288, 271, 181.

A $C_{17}H_{17}NO_4$ S összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
Számított:	61,61	5,17	4,23
Mért:	61,69	5,22	4,47

B) 3S-1-Diazo-2-oxo-3-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-4-(fenil-tio)-bután

A cím szerinti vegyületet a referencia előállítási példa B) lépésében leírt eljárás szerint állítottuk elő, ennek során a bepárlási maradék előállításához 12,1 g (37 mmol) 1A) előállítási példa szerinti terméket, 5,09 ml (37 mmol) trietil-amint, 7,13 ml (55 mmol) izo-butil-klór-szénsav-észtert és 146 mmol diazo-metán-oldatot használtunk. A diazo-metánban lévő oldatot a referencia előállítási példa B) lépésben ismertetett módon készítettük 100 ml dietil-étert, 150 ml 5 mol/l koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldatot és 21 g (146 mmol) N-(metil)-N-(nitro)-N-(nitrozo)-guanidint használva. Ezt a maradékot (metilén-kloridban lévő 0–5 térfogat% etil-acetát eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással tisztítva sárga színű olajat kaptunk (kitermelés: 73%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,50–7,19 (m, 10H), 5,62 (d, $J=7$ Hz, 1H), 5,47 (br.s, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,50–4,32 (m, 1H), 3,33 (d, $J=6$ Hz, 1H).
IR (KBr): 3012, 2115, 1720, 1501, 1367, 1228 cm^{-1} .
MS (FD): m/e 356, 328, 242.

C) 3R-1-Klór-2-oxo-3-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-4-(fenil-tio)-bután

A cím szerinti vegyületet a referencia előállítási példa C) lépésében ismertetett eljárással állítottuk elő, ennek során 21 g fehér színű szilárd anyag előállításához az 1B) előállítási példa 22,3 g (63 mmol) cím szerinti termékét és (gáznemű) hidrogén-klorid kis mennyiségét használtuk 400 ml dietil-éterben. A kapott szilárd anyagot további tisztítás nélkül használtuk fel.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,50–7,15 (m, 10H), 5,56 (dd, $J=2$; 6,7 Hz, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,78–4,67 (m, 1H), 4,20 (d, $J=15,9$ Hz, 1H), 4,12 (d, $J=15,9$ Hz, 1H), 3,48–3,23 (m, 2H).

IR (KBr): 3349, 1732, 1684, 1515, 1266 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 363 (M^+).

A $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{S}$ összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
Számított:	59,42	4,99	3,85
Mért:	59,57	5,09	4,13

D) [2S-(2R,3S*)]-1-Klór-2-hidroxi-3-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-4-(fenil-tio)-bután*

A cím szerinti vegyületet a referencia előállítási példa D) lépésében ismertetett eljárás szerint állítottuk elő, ennek során a bepárlási maradék készítéséhez az 1C) előállítási példa 21 g (58 mmol) cím szerinti termékét és 2,4 g (63 mmol) nátrium-[tetrahidrido-borát](1–)-ot használtunk 300 ml tetrahidrofuranban. Ezt a maradékot (metilén-kloridban lévő 0–2 térfogat% metanol eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással, majd azt követően (kloroformban lévő 0–2 térfogat% etil-acetát eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással és metilén-kloridból –78 °C hőmérsékleten végzett átkristályosítással tisztítva 8,3 g cím szerinti vegyületet kaptunk (kitermelés: 39%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,47–7,19 (m, 10H), 5,22–5,03 (m, 1H), 5,09 (s, 2H), 4,01–3,89 (m, 2H), 3,75–3,58 (m, 2H), 3,32 (d, $J=4$ Hz, 2H).

IR (KBr): 3321, 2951, 1688, 1542, 1246, 738 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 366 (M^+), 119.

A $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{S}$ összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
Számított:	59,09	5,51	3,83
Mért:	59,03	5,50	3,96

E) [1'R-(1'R,1S*)]-1-[(1'-N-(Benzil-oxi-karbonil)-amino-2'-(naft-2-il-tio)-etil-oxirán]*

A cím szerinti vegyületet a referencia előállítási példa E) lépésében ismertetett eljárás szerint állítottuk elő, ennek során az 1D) előállítási példa 8,3 g (23 mmol) cím szerinti termékét és 1,4 g (25 mmol) kálium-hidroxidot használtunk a bepárlási maradék előállítására. Ezt a maradékot (metilén-kloridban lévő 0–2 térfogat% etil-acetát eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással tisztítva 6,4 g fehér színű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés: 85%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,45–7,15 (m, 10H), 5,12 (s, 1H), 5,08 (s, 2H), 3,77–3,62 (m, 1H), 3,21 (d, $J=6$ Hz, 2H), 2,99 (m, 1H), 2,77 (m, 2H).

IR (KBr): 3303, 3067, 1694, 1538, 1257, 741 cm^{-1} .
MS (FD): m/e 329.
A $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
15 Számított:	65,63	5,81	4,25
Mért:	65,48	5,82	4,29

F) [3S-(3R,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[3'-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-2'-hidroxi-4'-(fenil)-tio]-butil-dekahidroizokinin-3-N-(terc-butil)-karboxamid*

A cím szerinti vegyületet a referencia előállítási példa F) lépésében ismertetett eljárás szerint állítottuk elő, ennek során az 1E) előállítási példa 6,3 g (19 mmol) cím szerinti termékét és 5 g (21 mmol) [3S-(3R*,4aR*,8aR*)]-dekahidroizokinin-3-N-(terc-butil)-karboxamidot használtunk 300 ml etanolban a bepárlási maradék készítéséhez. Ezt a maradékot (metilén-kloridban lévő 0–20 térfogat% etil-acetát eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással tisztítva 4,3 g fehér színű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés: 40%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41–7,11 (m, 10H), 5,90 (d, $J=5$ Hz, 1H), 5,64 (s, 1H), 5,05 (d, $J=4$ Hz, 2H), 4,08–3,90 (m, 2H), 3,40 (d, $J=6,2$ Hz, 3,05 (s, 1H), 2,95–2,85 (m, 1H), 2,62–2,45 (m, 2H), 2,28–2,15 (m, 2H), 2,05–1,88 (m, 2H), 1,78–1,10 (m, 7H), 1,29 (s, 9H).

IR (KBr): 3330, 2925, 2862, 1706, 1661, 1520, 1454, 1246, 738, 694 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 568 (M^+), 467.

A $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
45 Számított:	67,69	7,99	7,40
Mért:	67,64	8,20	7,45

G) [3S-(3R,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[3'-amino-2'-hidroxi-4'-(fenil)-tio]-butil-dekahidroizokinin-3-N-(terc-butil)-karboxamid*

A cím szerinti vegyületet a referencia előállítási példa G) lépésében ismertetett eljárás szerint állítottuk elő az 1F) előállítási példa 1 g (1,8 mmol) cím szerinti termékét és 40 ml 30 tömeg% hidrogén-bromidot tartalmazó ecetsavoldat alkalmazásával azzal az eltéréssel, hogy a nyersteget 30 ml metanolban oldottuk. A kapott oldathoz 2 ml dietil-amint és 2 ml tömény ammónium-hidroxid-oldatot adtunk, majd az elegyet csökkenett nyomáson betöményítve maradékot kaptunk. Ezt a maradékot víz és etil-acetát elegyében ismét feloldottuk. A kapott fázisokat elválasztottuk, a szerves fázist

sorrendben vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és sóoldattal mostuk, vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, szűrtük, majd csökkentett nyomáson száraz állapot eléréséig betöményítve maradékot kaptunk. Ezt a maradékot (1000 ml kloroformra számítva 3 csepp ammónium-hidroxid-oldatot tartalmazó kloroformban lévő 0–10 térfogat% metanol eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) elárasztásos kromatográfiás eljárással tisztítva 0,54 g fehér színű habot kaptunk (kitermelés: 71%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41–7,16 (m, 5H), 6,07 (s, 1H), 3,78–3,70 (m, 1H), 3,45–3,38 (m, 1H), 3,03–2,84 (m, 3H), 2,38–2,20 (m, 3H), 2,00–1,05 (m, 12H), 1,33 (s, 9H).

IR (KBr): 2924, 2862, 1660, 1517, 1454, 1439, 737, 691 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 434 (M^+), 293.

2. előállítási példa

A) 3-Metoxi-N-fenil-benzamid

13,4 ml (147 mmol) anilin 30,7 ml trietil-aminban lévő oldatát lassan metilén-kloridban lévő 25,1 g (147 mmol) 3-metoxi-benzoil-klorid-oldatához adtuk. A kapott reakcióelegyet 30 percen át reagáltattuk, majd 1 mol/l koncentrációjú nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal hígítottuk. A kapott fázisokat elválasztottuk, a szerves fázist sorrendben vízzel, 1 mol/l koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldattal és sóoldattal mostuk, vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, szűrtük, majd csökkentett nyomáson betöményítve 31,6 g piszkosfehér színű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés: 95%).

B) 3-Metoxi-2-metil-N-fenil-benzamid

A 2A) előállítási példa 4,54 g (20 mmol) cím szerinti termékét és 5,11 g (44 mmol) TMEDA-t 70 ml vízmentes tetrahidrofuranban tartalmazó hideg (-70°C hőmérsékletű) oldatához n-butil-lítium 26,9 ml 1,56 mol/l koncentrációjú hexános oldatát adtuk. A kapott reakcióelegyet -15°C hőmérsékletre melegítettük, majd 45 percen át keverve sárga színű zagyot kaptunk. A zagyot ismét -70°C hőmérsékletre hűtöttük, és 2,89 g (20 mmol) metil-jodidot hozzáadva fehér színű csapadékot kaptunk. A reakcióelegyet éjszakán át szobahőmérsékleten kevertük, a reakciót telített ammónium-klorid-oldattal befagyasztottuk, és a reakcióelegyet dietil-éterrel hígítottuk. A kapott fázisokat elválasztottuk, a szerves fázist sorrendben telített ammónium-klorid-oldattal, vízzel, telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és sóoldattal mostuk. A szerves extraktumokat ezután vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, és betöményítve fehér színű szilárd anyagot kaptunk. A szilárd anyagot etil-acetát/hexán 2:1 térfogatarányú elegyből átkristályosítva 4,00 g tű alakú kristályokat kaptunk (kitermelés: 99%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2,36 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,89 (s, 1H), 6,90–7,70 (m, 8H).

IR (CHCl_3): 3424, 3013, 2963, 2943, 2840, 1678, 1597, 1585, 1519, 1463, 1438, 1383, 1321, 1264, 1240, 1178, 1083, 1069 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 241 (M^+ , 100).

A $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%	N%
Számított:	74,67	6,27	5,80
Mért:	74,65	6,29	5,82

C) 3-Hidroxi-2-metil-benzoésav

A 2B) előállítási példa 1,21 g (5,00 mmol) cím szerinti termékét, 35 ml 5 mol/l koncentrációjú sósavoldatot és 20 ml 30 tömeg% hidrogén-bromid-tartalmú ecetsavoldatot tartalmazó elegyet 24 órán át visszacsépe-gő hűtő alatt forraltunk. Lehűtés után a reakcióelegyet 100 ml etil-acetáttal és 100 ml vízzel hígítottuk. A kapott fázisokat elválasztottuk, és a szerves fázist vízzel egy alkalommal mostuk, majd 0,5 mol/l koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldattal pH=11 érték eléréséig meg-lúgosítottuk. A kapott fázisokat elválasztottuk, és a vizes fázist 5 mol/l koncentrációjú sósavoldattal pH=1 érték eléréséig ismét megsavanyítottuk. A kívánt vegyületet ezután ebből a vizes fázisból extraháltuk etil-acetáttal.

Az etil-acetátos extraktumot sóoldattal mostuk, vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, szűrtük, majd betöményítve maradékot kaptunk, amelyet hexánból két alkalommal betöményítve 750 mg fehér színű szilárd anyagot kaptunk (kitermelés: 98%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 2,26 (s, 3H), 6,98 (d, $J=8,03$ Hz, 1H), 7,02 (t, $J=7,69$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J=7,37$ Hz, 1H), 9,55 (br.s, 1H).

IR (CHCl_3): 3600–2100 (br.), 3602, 2983, 1696, 1588, 1462, 1406, 1338, 1279, 1174, 1154, 1075, 1038, 920, 892, 854, 816 cm^{-1} .

MS (FD): m/e 152 (M^+ , 100).

A $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ összegképletre vonatkozó elemanalízis:

	C%	H%
Számított:	63,15	5,30
Mért:	63,18	5,21

A cím szerinti vegyületnek egy további eljárással történő előállításához 22,6 g (0,33 mol) nátrium-nitritet kis részletekben 45 g (0,30 mol) 3-amino-2-metil-benzoésav és 106 g (58 ml; 1,08 mol) tömény kénsav 400 ml vízben lévő (-10°C hőmérsékletre) hűtött oldatához adtuk, miközben a hőmérsékletet 7°C alatt tartottuk. A kapott reakcióelegyet 30 percen át -10°C hőmérsékleten kevertük, 240 ml tömény kénsav 1,2 l vízben lévő oldatához öntöttük, majd lassan 80°C hőmérsékletre melegítettük (ennek során a 40 – 60°C hőmérséklet-tartományban intenzív gázfejlődés következett be). A gázfejlődés megszűnése után a reakcióelegyet szobahőmérsékletre hűtöttük, és a cím szerinti vegyületet öt alkalommal (600 ml) etil-acetáttal extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokat nátrium-karbonát 500 ml telített vizes oldatához adtuk. A kapott fázisokat elválasztottuk, és a vizes fázist tömény sósavval pH=2 értékig megsavanyítottuk. A cím szerinti vegyületet ezután (500 ml) etil-acetáttal extraháltuk, és az egyesített szerves fázisokat sóoldattal mostuk, vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, szűrtük, majd csökkentett nyomáson betöményítve a nyersterméket kaptuk. A nyersterméket etil-acetát/kloroform elegyből két alkalommal átkristályosítva 23,2 g világos narancsszínű port kaptunk (kitermelés: 52%).

Referenciapélda

[3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'R*)]-2-[2'-Hidroxi-3'-fenil-metil-4'-aza-5'-oxo-5'-(2''-fluor-3''-hidroxi-fenil)-pentil]-dekahidroizokinolin-3-N-(terc-butil)-karboxamid előállítása

Az 1B) előállítási példa 80 mg (0,20 mmol) cím szerinti termékét, a 11B) előállítási példa 31 mg (0,20 mmol) cím szerinti termékét és 27 mg (0,20 mmol) 1-hidroxi-benzotriazol-hidráttal (HOBT·H₂O) 3 ml vízmentes tetrahidrofuránt tartalmazó hideg (−10 °C hőmérsékletű) oldathoz 41 mg (0,20 mmol) 1,3-diciklohexil-karbodiimidet (DCC) adtunk. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 36 órán át kevertük, majd csökkentett nyomáson betöményítettük. A kapott maradékot etil-acetátban újra feloldottuk, celiten keresztül szűrtük, sorrendben telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és sóoldattal mostuk, vízmentes nátrium-szulfát fölött szárítottuk, szűrtük és betöményítettük. A nyersterméket (1 mm-es lemezen metilén-kloridban lévő 2–5 térfogat% metanol eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) radiális kromatográfiás eljárással tisztítva 79 mg fehér színű habot kaptunk (kitermelés: 73%).

[α]_D −90,80° (c=0,333, MeOH).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,24 (s, 9H), 1,16–2,05 (m, 14H), 2,20–2,40 (m, 2H), 2,55–2,70 (m, 2H), 2,90–3,04 (m, 2H), 3,10–3,25 (m, 1H), 4,03 (br.s, 1H), 4,51 (br.s, 1H), 6,01 (s, 1H), 6,90–7,35 (m, 9H).

IR (CHCl₃): 3580, 3550–3100 (br.), 2929, 2865, 1662, 1596, 1521, 1472, 1455, 1394, 1368, 1293, 1157, 1047, 879, 839 cm^{−1}.

MS (FD): m/e 540 (M⁺, 100).

HR MS (FAB): m/e a C₃₁H₄₃N₃O₄F összegképletre vonatkozóan:

Számított: 540,3238

Mért: 540,3228

1. példa

[3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-Hidroxi-3'-(fenil-tio-metil)-4'-aza-5'-oxo-5'-(2''-metil-3''-hidroxi-fenil)-pentil]-dekahidroizokinolin-3-N-(terc-butil)-karboxamid előállítása

A cím szerinti vegyületet a referenciapéldában ismertetett eljárás szerint állítottuk elő az 1G) előállítási példa 70 mg (0,16 mmol) cím szerinti termékét, a 2C) előállítási példa 24,6 mg (0,16 mmol) cím szerinti termékét, 33 mg (0,16 mmol) DCC-et és 22 mg (0,16 mmol) HOBT·H₂O-t 4 ml tetrahidrofuránban használva. A nyersterméket (1 mm-es lemezen metilén-kloridban lévő 3 térfogat% metanol eluálószer-gradiens mellett lefolytatott) radiális kromatográfiás eljárással tisztítva 54 mg fehér színű habot kaptunk (kitermelés: 60%).

[α]_D −119,23° (c=0,26, MeOH).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,09 (s, 9H), 1,12–1,79 (m, 12H), 1,93–2,02 (m, 2H), 2,17–2,30 (m, 2H), 2,31 (s, 3H), 2,43–2,61 (m, 2H), 2,91 (m, 1H), 3,42 (m, 1H), 3,78 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 4,47 (m, 1H), 5,37 (m, 1H), 5,51 (br.s, 1H), 6,84 (m, 1H), 7,06 (m, 2H), 7,17–7,32 (m, 4H), 7,45 (m, 2H).

IR (KBr): 3297, 2925, 2862, 1627, 1586, 1530, 1482, 1466, 1439, 1366, 1287, 1221, 1156, 1119, 1026, 801, 735, 689 cm^{−1}.

MS (FD): m/e 568 (M⁺, 100).

5 HR MS (FAB): m/e a C₃₂H₄₆N₃O₄S összegképletre vonatkozóan:

Számított: 568,3209

Mért: 568,3182

2. példa

[3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-Hidroxi-3'-(fenil-tio-metil)-4'-aza-5'-oxo-5'-(2''-metil-3''-hidroxi-fenil)-pentil]-dekahidroizokinolin-3-N-(terc-butil)-karboxamid-metánszulfonsav-só

15 Ezt a vegyületet az 1. példában ismertetett eljárás szerint állítottuk elő azzal az eltéréssel, hogy az 1A és 1D előállítási példák lépéseit az alábbi (1) lépésben ismertetett módon megváltoztattuk, és az eljárást kiegészítettük az alábbi (2) sóképzési lépéssel.

20 (1) Egy 2 l térfogatú lombikba 500 ml CH₂Cl₂-ban lévő 109,6 g Ph₃P-t vittünk be, és az elegyet −70 °C hőmérsékletre hűtöttük. Az elegyhez 25 percen keresztül cseppenként (66 ml) dietil-azido-dikarboxilát 60 ml THF-ban készített oldatát adtuk. 25 perc múlva 45 perc alatt cseppenként (100 g) N-karbobenzil-oxi-L-szerin 400 ml THF-ban lévő oldatát adtuk az elegyhez, majd 2 óra alatt vízfürdőn hagytuk szobahőmérsékletre melegedni. Az elegyhez 150 ml THF-t adtunk. Egy másik lombikban (46 g) tiofenol 1 l THF-ban készített oldatát 30 jeges fürdőn 0 °C hőmérsékletre hűtöttük, és részletekben hozzáadott (10 g) NaH-diszperzióval kezelve viszkózus oldatot kaptunk. 1 óra múlva a nyers laktionoldatot 30 perc alatt adagolótölcsérből cseppenként a tiolát-oldathoz adtuk. 12 óra múlva szűréssel fehér csapadékot különítettünk el, és a szűrőleplenyt THF-nal mostuk. 35 A szilárd anyagot 4 mol/l koncentrációjú NaHSO₄ és EtOAc elegyében felvettük, elválasztottuk, és a szerves fázist sóoldattal mostuk, szárítottuk, majd betöményítve viszkózus olajként 85 g 2R-2-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-3-fenil-tio-propánsavat kaptunk.

40 Az eredeti szilárd anyagot a kívánt termék nátrium-sójának tartjuk. Ezért a kitermelés és az elválasztás lefolytatása javítható azáltal, ha közvetlenül a nátriumsót izoláljuk.

45 A (16,87 g, 46,4 mmol) 3R-1-klór-2-oxo-3-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-4-(fenil-tio)-bután nyers klór-ke-tont 1 l abszolút EtOH és 200 ml THF elegyéhez adtuk, és az oldatot (−78 °C hőmérsékletű) CO₂/aceton fürdő-ben lehűtöttük, majd 200 ml abszolút etanolban 50 (2,63 g, 69,5 mmol) NaBH₄-ot adtunk hozzá 1 órán át cseppenként (ennek során a belső hőmérsékletet −75 °C-nál alacsonyabb értéken tartottuk. Az adagolást követően elvégzett TLC elemzés azt mutatta, hogy a reakció lejártszódott. A reakcióelegyet 300 ml dietil-éterrel hígítottuk, majd a reakciót keverés közben 55 0,4 mol/l koncentrációjú NaHSO₃-oldat lassú adagolá-sa útján befagyasztottuk, amelynek során gáz fejlődött. Ezt az elegyet csökkentett nyomáson az etanol nagy részének eltávolítása útján betöményítettük, majd vizet 60 adtunk hozzá. A kapott elegyet dietil-éterrel extrahál-

tuk, és az egyesített szerves fázisokat NaHCO_3 telített vizes oldatával és sóoldattal mostuk, (vízmentes Na_2SO_4 fölött) szárítottuk, majd betöményítve 15,7 g piszkosfehér színű szilárd anyagot kaptunk. Ezt az anyagot (300 ml) forrásban lévő hexánban eldörzsöltük, majd a hexánt óvatosan még forró állapotban dekantáltuk. Ezt a műveletet 10 alkalommal (esetenként 300 ml oldószerrel) megismételve 10,35 g piszkosfehér színű szilárd anyagot kaptunk (amely TLC szerint egyetlen tiszta izomer). A hexános szűrletet betöményítve 6 g fehér színű szilárd anyagot kaptunk, amelyet félretettünk. Az eldörzsölt szilárd anyagot 50 ml CH_2Cl_2 és 6 ml hexán elegyével hevítettük és forrón szűrtük. A tiszta oldatot hagytuk 25°C hőmérsékletre lehűlni, majd fagyasztószekrénybe tettük. A kapott szilárd anyagot szűrtük, ezután hexánnal mosva 7,157 g fehér színű szilárd anyagot kaptunk. A szűrletet egyesítettük a korábbi hexános szűrlettel és két kis léptékű kísérlet (egyenként 500 mg kiindulási keton) nyers reakciótermékével, és az egyesített anyagot SiO_2 fázison (CH_2Cl_2 tartalmú, 2:1→1:1 térfogatarányú hexán/dietil-éter eluálószerrel) kromatográfiás eljárással kezelve 2,62 g további terméket kaptunk. A [2S-(2R*,3S*)]-1-klor-2-hidroxi-3-N-(benzil-oxi-karbonil)-amino-4-(feniltio)-butánnak összesen 10,31 g tiszta izomerét kaptunk (a savra vonatkoztatott kitermelés: 50%).
 $\alpha_D = -63,6^\circ$ ($c=1$, MeOH).

(2) Sóképzés

30 ml metanol és 30 ml CH_2Cl_2 elegyében (3,34 g) [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-hidroxi-3'-(feniltio-metil)-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxi-fenil)-pentil]-dekahidroizokinin-3-N-(terc-butil)-karboxamidot oldottunk, és cseppenként 10 ml CH_2Cl_2 -ban oldott (596 mg) metánszulfonsavat adtunk hozzá. 10 perc múlva a reakcióelegyet habbá töményítettük be. A nyers sót 5 ml THF-ban felvettük, és keverés közben 175 ml etil-éter és 25 ml hexán elegyéhez adtuk, ennek során finom szuszpenzió képződött. Ezt a szuszpenziót fagyasztószekrényben lehűtöttük, hidegen szűrtük, dietil-éterrel több alkalommal mostuk, majd vákuumkémencében szárítva fehér színű porként 3,75 g [3S-(3R*,4aR*,8aR*,2'S*,3'S*)]-2-[2'-hidroxi-3'-(feniltio-metil)-4'-aza-5'-oxo-5'-(2"-metil-3"-hidroxi-fenil)-pentil]-dekahidroizokinin-3-N-(terc-butil)-karboxamid-metánszulfonsav-sót kaptunk.

A fentiek értelmében a találmány szerinti vegyületek hasznosak HIV-proteáz gátlásában, amely vírusos komponens termelésével és beépülésével kapcsolatos enzim.

A leírásban a „hatásos mennyiség” kifejezésen az (I) általános képletű vegyület vagy gyógyászati lag elfogadható sója olyan mennyiségét értjük, amely hatásos a HIV-proteáz által közvetített vírusos komponens termelésének és beépülésének gátlása tekintetében. A találmány értelmében terápiás vagy gátló hatás elérésére beadott vegyület dózisát természetesen a konkrét körülmények alapján határozzuk meg, amelyek többek között a beadott vegyület, a beadás módja, a kezelt betegség és a beteg állapota. A napi (egyetlen adagban

vagy több alkalommal beadott) dózis 1 kg testtömegre vonatkoztatva 0,01–50 mg találmány szerinti vegyület. Előnyös napi dózisok általában 0,05 mg/kg–20 mg/kg, még előnyösebben 0,1 mg/kg–10 mg/kg.

A találmány szerinti vegyületek különböző módon adhatók be, beleértve az orális, rektális, transzdermális, szubkután, intravénás, intramuszkuláris és intranazális beadást. A találmány szerinti vegyületeket a beadást megelőzően előnyösen formuláljuk. A találmány egyik kiviteli alakja ezért gyógyászati készítmény, amely (I) általános képletű vegyület vagy gyógyászati lag elfogadható sója hatásos mennyiségét tartalmazza gyógyászati lag elfogadható hordozó, így hígító vagy kötőanyag mellett.

A hatóanyag a formulálás össztömegére vonatkoztatva előnyösen 0,1–99,9%. A „gyógyászati lag elfogadható” kifejezésen azt értjük, hogy a hordozó – a hígító vagy kötőanyag – a formulálás egyéb alkotórészeivel összeférhető, továbbá nem káros a betegre nézve.

A találmány szerinti vegyületekből gyógyászati készítményeket előállíthatunk ismert eljárásokkal szokásos és könnyen hozzáférhető alkotórészeket használva. A találmány szerinti készítmények előállítása során a hatóanyagot általában hordozóval keverjük vagy hígítjuk vagy hordozóba burkoljuk, amely lehet kapszula, tasak, papír vagy egyéb alkalmas tartó. Ha a hordozó egyúttal hígítószer, az lehet szilárd, félszilárd vagy folyékony anyag, amely a hatóanyag számára hordozó- vagy kötőanyagként vagy vivőközegként szolgál. Így a készítmények többek között lehetnek tabletták, pirula, por, ostya, elixír, szuszpenzió, emulzió, oldat, szirup, aeroszol (szilárd anyagként vagy folyékony közegben), (10 tömeg%-ig terjedő mennyiségű hatóanyagot tartalmazó) kenőcs, lágy- és keményszélatin-kapszula, kúp, injektálható steril oldat vagy steril csomagolású por.

A következő formulálási példák csupán szemléltetésül szolgálnak és nem korlátozzák a találmány tartalmi körét. A „hatóanyag” kifejezés (I) általános képletű vegyületet vagy annak gyógyászati lag elfogadható sóját jelenti.

1. formulálás

Keményyszélatin-kapszulákat állítunk elő a következő alkotórészekből:

	Mennyiség (mg/kapszula)
Hatóanyag	250
Keményítő, szárított	200
Magnézium-sztearát	10
Összesen:	460

2. formulálás

Tablettákat állítunk elő az alábbi alkotórészekből:

	Mennyiség (mg/tabletta)
Hatóanyag	250
Cellulóz, mikrokristályos	400
Szilícium-dioxid (habosított)	10
Sztearinsav	5
Összesen:	665

A komponenseket összekeverjük és egyenként 665 mg tömegű tablettákká sajtoljuk.

3. formulálás

A következő komponenseket tartalmazó aeroszol-oldatot állítjuk elő:

	Tömegrész	
Hatóanyag	0,25	5
Metanol	25,75	
22 típusú vivőanyag (klór-difluor-metán)	74,00	
Összesen:	100,00	

A hatóanyagot etanollal elkeverjük, és a kapott elegyet a 22 típusú vivőanyag egy részéhez adjuk, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletre hűtjük és átvisszük a töltőberendezésbe. Ezután a kívánt mennyiségű elegyet rozsdamentes acél anyagú tartályba töltjük, és a vivőanyag maradék részével hígítjuk. Ezután a tartályra felszereljük az adagolószелеpet.

4. formulálás

Egyenként 60 mg hatóanyagot tartalmazó tablettát állítunk elő a következő módon:

	Mennyiség (mg/tabletta)	
Hatóanyag	60	
Keményítő	45	
Mikrokristályos cellulóz	35	
Poli(vinil-pirrolidon)		
(10 tömeg%-os vizes oldat)	4	25
Nátrium-karboxi-metil-keményítő	4,5	
Magnézium-sztearát	0,5	
Talkum	1	
Összesen:	150	30

A hatóanyagot, a keményítőt és a cellulózt $354\text{ }\mu\text{m}$ lyukbőségű szitán átszítjuk és alaposan összekeverjük. A poli(vinil-pirrolidon)-t tartalmazó vizes oldatot a kapott porral elkeverjük, és a keveréket $1,41\text{ mm}$ lyukbőségű szitán átbocsátjuk. Az így előállított granulátumot $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten szárítjuk és $1,00\text{ mm}$ lyukbőségű szitán keresztül szitáljuk. Az előzőleg $250\text{ }\mu\text{m}$ lyukbőségű szitán átjutott nátrium-karboxi-metil-keményítőt, magnézium-sztearátot és talkumot ezután a granulátumhoz adjuk, amelyet keverés után tablettázógépen egyenként 150 mg tömegű tablettákká sajtolunk.

5. formulálás

Egyenként 80 mg hatóanyagot tartalmazó kapszulát állítunk elő a következő módon:

	Mennyiség (mg/kapszula)	
Hatóanyag	80	
Keményítő	59	
Mikrokristályos cellulóz	59	50
Magnézium-sztearát	2	
Összesen:	200	

A hatóanyagot, a cellulózt, keményítőt és magnézium-sztearátot összekeverjük, $354\text{ }\mu\text{m}$ lyukbőségű szitán átbocsátjuk, majd 200 mg adagokban keményszelen-kapszulákba töltjük.

6. formulálás

Egyenként 225 mg hatóanyagot tartalmazó kúpokat állítunk elő a következő módon:

Mennyiség (mg/kúp)

Hatóanyag	225
Telített zsírsav-gliceridek	2000
Összesen:	2225

A hatóanyagot $250\text{ }\mu\text{m}$ lyukbőségű szitán átbocsátjuk, és az előzetesen a minimálisan szükséges hő alkalmazásával megolvastott telített zsírsav-gliceridekben szuszpendáltatjuk. Az elegyet ezután 2 g névleges tömegű kúp öntőformájába öntjük és hagyjuk lehűlni.

7. formulálás

5 ml dózisonként 50 mg hatóanyagot tartalmazó szuszpenziót állítunk elő a következő módon:

	Mennyiség/dózis	
Hatóanyag	50 mg	15
Nátrium-karboxi-metil-cellulóz	50 mg	
Szirup	1,25 ml	
Benzooesavoldat	0,10 ml	
Aroma	kívánság szerint	
Színezék	kívánság szerint	20
Tisztított víz	5 ml-re kiegészítve	

A hatóanyagot $354\text{ }\mu\text{m}$ lyukbőségű szitán átbocsátjuk, majd a nátrium-karboxi-metil-cellulózzal és a sziruppal híg pasztát képezünk. A benzooesavas oldatot, aromát és színezéket a víz egy részével hígítjuk, majd keverés közben a pasztához adjuk. Ezt követően a kívánt térfogathoz szükséges mennyiségű vizet adjuk az elegyhez.

8. formulálás

Intravénás formulálást állítunk elő a következő módon:

Hatóanyag	100 mg	
Izotóniás sóoldat	1000 ml	
A fenti alkotórészek oldatát általában 1 ml/perc sebességgel intravénásan adjuk be a betegnek.		35

Hatásosság osztályozó vizsgálata

Számos vizsgálatot használtak a HIV-proteázt gátló vegyületek biológiai aktivitásának tanulmányozására. Többek között vizsgálták HIV-fertőzött sejtvonalakon a proteolitikus gátlási sebességet és a vírusellenes hatást. Az ilyen vizsgálatokhoz alkalmazott eljárásokat az alábbiakban ismertetjük. A vizsgálatok eredményeit az alábbi I. táblázatban közöljük vagy a példákban foglalkozunk össze.

I. A HIV-ellenes vegyületek első hatástani vizsgálata a Southern Kutató Intézetben (Southern Research Institute=SRI) (Az eredményeket az I. táblázatban adjuk meg „SRI CEM (ng/ml)” vagy „SRI MT2 (ng/ml)” jelöléssel)

A) Az MTT vizsgálat elve

Az SRI kifejlesztett egy programot a vegyületek első antivirális analízisére mikrotiterpróbában, amely a kiválasztott vegyület azon képességét méri, hogy hogyan gátolja a HIV-indukált sejtpusztulást. Ezen vizsgálat során az MTT tetrazólium festék a metabolikusan aktív sejtekben a mitokondriális enzimek révén egy szí-

nes formázán terméké alakul át. Az SRI ezt a vizsgálati rendszert évente több mint 30 000 vegyület osztályozására alkalmazza. Közelebből, ez a vizsgálat magában foglalja a CEM vagy az MT-2 sejtek megfertőzését 96 legömbölyített aljú mélyedéssel rendelkező lemezen. A vizsgált vegyületet közvetlenül a fertőzés előtt helyezzük a mélyedésbe. A lemezeket 6 napig 37 °C-on inkubáljuk, majd ezt követően megfestjük MTT-vel. A vizsgálati eredményeket spektrofotometrián mérjük egy Molecular Devices Vmax lemezleolvasón. A kapott adatokat lineáris regresszióval saját fejlesztésű program felhasználásával elemezzük és számítjuk ki az antivirális aktivitást (IC25, IC50, IC95,) és toxicitást (TC25, TC50, TC95,) valamint az egyéb értékeket.

Az első antivirális vizsgálatokat rutinszerűen végezzük CEM vagy MT-2 sejteken. Az SRI azt találta, hogy az összes aktív vegyület azonosítható CEM sejteken, míg az MT-2 sejtvonalon végzett vizsgálatokban az aktív vegyületeknek egy kis része elvész.

B) Standard osztályozó vizsgálatok CEM és MT-2 sejteken

1. A vegyület hígítása és elosztása a lemezeken

Az anyagokat egy megfelelő hordozóban, így desztillált vízben vagy – ha szükséges – DMSO-ban feloldjuk. Latexkesztyűt, laborköpenyt és maszkokat használunk a kezelési eljárás minden egyes fázisában, hogy megelőzzük a potenciálisan ártalmas szerek károsító hatásait. Az anyagot megfelelő koncentrációra hígítjuk és –20 °C-on tároljuk az osztályozó laboratóriumban történő felhasználásig. Minden egyes vegyület első hígítását egy hígítócsőben végezzük annyi közeggel, hogy a legnagyobb vizsgálati koncentráció kétszeresét kapjuk. Ezután steril hígítócsöveket használunk ahhoz, hogy minden vegyületből egy féllogaritmikus hígítási sorozatot készítsünk. Az anyag hígítását követően, a hígított vegyületet hozzáadjuk a 96 mélyedéses mikrotiterlemez megfelelő mélyedéséhez. Egyetlen lemezen 12 hígítást lehet vizsgálni kényelmesen három párhuzamos mintán az összes alkalmas kontrollal együtt, beleértve a sejtkontrollt, víruskontrollt, toxicitási kontrollt, anyagszínkontrollt, közegkontrollt és a műanyag (háttér) kontrollt. Abban az esetben, ha a mintát csak 6 hígításban vizsgáljuk, két anyag vizsgálható egyidejűleg egyetlen mikrotiterlemezen. Az anyagokat 100 µl végtérfogatban adjuk a lemezhez.

2. Sejtek és vírusok

Azon idő alatt, amíg az anyag hígításait elkészítjük, a sejteket mossuk és megszámláljuk. Az életképességet tripánkék festék kizárásával követjük nyomon, és a vizsgálatokat nem végezzük el, ha az életképesség 90% alá csökken. A sejteket exponenciálisan növekvő fázisban tartjuk fenn és a vizsgálat előtti napon 1:2 arányban megosztjuk, hogy az exponenciális növekedési sebességet biztosítsuk.

Az első osztályozáshoz használt sejtvonalak CEM vagy MT-2 sejtvonalak. Hacsak másképp nem jelöljük, az alkalmazott közeg RPMI-1640 tápközeg, kiegészít-

ve 10% hővel inaktivált magzati borjúsérummal (FBS), glutaminnal és antibiotikumokkal.

A sejteket 37 °C-on szaporítjuk 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában. Az ehhez a munkához alkalmazott vírus a HIV-1 IIIB és/vagy RF izolátum, amelyet akut fertőzési folyamattal készítünk.

Röviden, a vírussal fertőzött sejteket naponta összegyűjtjük a háromnapos utófertőzés kezdetétől egészen addig, amíg a vírus a tenyészetben lévő összes sejtet elöli. Reverz transzkriptáz aktivitást és p24 ELISA-t használunk annak azonosítására, hogy melyek azok a keverékminták, melyek a legnagyobb mennyiségű vírust tartalmazzák.

Ezeket a 24 órás tenyészeteket összekeverjük, szűrjük és –90 °C-on lefagyaszttjuk. A vizsgálatban való használat előtt meghatározzuk a fertőző vírus-keverék-minta titerét az összes alkalmas sejtvonalon abból a célból, hogy meghatározzuk a kívánt vírus mennyiségét az antivirális próbában.

Általában az akut fertőzési módszerrel termelt keverékminták esetében mélyedésenként 1 µl fertőző vírus hozzáadása szükséges az anyagok osztályozásában, ha a fertőzés mértéke 0,01. Ezen a módon elegendő vírust készítünk és fagyaszttunk ezer mikrotiterlemez befedéséhez, ezzel lehetővé téve akár kétezer vegyület tesztelését a fertőző vírus egyetlen állományából. Egyetlen vírusállomány használata a tesztelésben hosszú időn keresztül igen kedvező hatású a vizsgálati rendszerek megismételhetősége szempontjából.

A CEM és az MT-2 sejtek vírussal történő megfertőzését az antivirális vizsgálatokhoz nagy tömegben való fertőzési eljárással kivitelezük. Megfelelő számú sejtet, amely szükséges a vizsgálat teljessé tételéhez, egy kúpos centrifugacsőben 1-2 ml össztérfogatban a fertőző vírussal összekeverünk.

Négyórás inkubálást követően a fertőzött sejteket friss szövettenyésztő tápközeggel megfelelő végkoncentrációra (5×10⁴ sejt/ml) hígítjuk, és 100 µl-t adunk a megfelelő kísérleti és víruskontroll-mélyedésekhez. A nem fertőzött sejteket ugyanilyen koncentrációban adjuk a toxicitási kontrollokhoz és a sejtkontrollokhoz. Ebben az esetben a vizsgálandó anyagot, a sejteket és a vírusokat egyenként adjuk a mélyedésekbe. Minden esetben a MOI-t úgy állítjuk be, hogy a 6. napig teljes sejtpusztítást kapjunk a víruskontroll-mélyedésekben.

3. A CPE-gátlás kiértékelése

Miután a sejteket és a mintákat hozzáadtuk a mikrotiterlemezhez, a lemezt 6 napon keresztül 37 °C-on inkubáljuk. A tapasztalat dönti el, hogy egy hosszabb ideig tartó inkubáció (7–8 nap) vagy egy magasabb bevitt sejtszám (1×10⁴) alkalmazása eredményez-e szignifikáns csökkenést a sejtkontroll-életképességben és kisebb különbségeket az optikai sűrűségben a sejt- és a víruskontrollok között a MTT-s festést követően.

Az antivirális vizsgálat kiértékelésének módszere abban áll, hogy 20 µl MTT-tetrazólium-sót (5 mg/ml) adunk a lemez minden egyes mélyedéséhez 4–8 óráig. Ezen inkubálási periódus után a sejteket elroncsoljuk

50 µl 20% SDS-t tartalmazó 0,01 mol/l HCl hozzáadásával.

A tenyészetben az életképes sejtek metabolikus aktivitása színes reakcióterméket eredményez, amelyet spektrofotometriásan Molecular Devices Vmax lemezleolvasóval 570 nm-en mérünk. Az optikai sűrűség (O. D.) érték a keletkezett formazán mennyiségének függvénye, amely az életképes sejtek számával arányos.

A lemezleolvasó online összeköttetésben áll az osztályozó laboratórium mikroszámlítógépével, amely méri és kiszámítja a lemez adatait. A lemez jegyzőkönyve az összes lényeges információ lefutását megadja, beleértve a nyers O. D. értékeket, a számított átlagos O. D. értékeket és a virális CPE százalékos csökkenését, valamint a számításokat, beleértve TC50-t, IC50-t, és az antivirális és a specifikus indexeket. Végül az eredmények egy görbét adnak, amely ábrázolja a vegyület hatását a nem fertőzött sejteken (toxicitás) és a vegyület védő vagy nem védő hatását a fertőzött sejteken.

II. A HIV-ellenes vegyületek teljes sejtvizsgálata az Eli Lilly cégnél (az eredményeket az I. táblázatban közöljük „Teljes sejt IC50 nM” vagy „Teljes sejt IC90 nM” jelöléssel)

A) Célok és eszközök

Cél: a vegyületek IC50 és CC50 adatainak meghatározása

Reagensok és anyagok

A tápközeg

A [1% DMSO] tápközeg (100 µl DMSO+9,9 ml A tápközeg)

SN 123-at használunk a sejtek megfertőzéséhez (15 ml 6 lemezhez) (10 ml 4 lemezhez)

CEM sejtek [1×104] sejt/ml (4 lemez=40 ml) (6 lemez=60 ml)

DMSO (5 ml szükséges)

35B [10 mmol/l koncentrációban] (szükséglet 70 µl)

A–D [10 mmol/l koncentrációban] 100% DMSO-ban

4 vagy 6 db U aljú 96 mélyedéssel lemez

4 db lapos aljú 96 mélyedéssel lemez a hígításokhoz

8–10 doboz steril costar típusú pipettacsúcs

10 reagenstálca

12 utas costar pipetta

Fontos információk

1000 sejt/mélyedés=1×104 sejt/ml=1000 sejt/100 µl

200 µl=össztérfogat a mélyedésben

A DMSO végkoncentrációja=0,25%

Az Sn123 végső hígítása=1:64

Sorozatban hígított vegyületek 35B, A–D, 1:3

B) Eljárás

1. Sejtek előállítása és lemezre vitele, A tápközeg és A [1% DMSO] tápközeg

a) Egy 96 mélyedéssel szövettenyésztő lemezt veszünk minden egyes vizsgálandó vegyülethez, egyet kontroll-lemezként és egyet a kontrollvegyülethez.

Lemez száma	Vegyület elnevezése
1.	negatív és pozitív kontroll
2.	35B
3.	A
4.	B
5.	C
6.	D

b) A sejteket hemacitóméterben megszámláljuk és 40 ml vagy 80 ml A tápközegben 1×104 sejt/ml koncentrációban reszuszpendáljuk.

Sejtszámlálás hemacitóméterben

Két 1,8 ml-es nunc csövet 1 és 2 jelzéssel megjelölünk.

Az 1-es csőbe 0,5 ml alaposan összekevert (növekvő fázisban lévő) CEM sejtet viszünk be.

A 2-es csőbe 50 µl PBS-t és 40 µl tripánkék festéket viszünk be.

Az 1-es csőben a sejteket felkeverjük, majd 10 µl-t kiveszünk belőle és átvisszük a 2-es csőbe.

A 2-es cső tartalmát jól összekeverjük, a megfestődött sejtekből 10 µl-t kiveszünk és behelyezzük a hemacitóméterbe.

A sejteket a hemacitóméter középterében 10-szeres nagyítású mikroszkóppal megszámláljuk.

A CEM sejtállomány koncentrációja sejt/ml-ben a következő: megszámlált sejtek×1×105=CEM-sejt koncentráció (sejt/ml)

c) 200 µl A tápközeget adunk:

a 2–6 lemez A1 sorához (ezek vakpróbák) az 1-es lemez A4–H4 sorához (ezek vakpróbák).

d) 5 µl A tápközeget adunk a 2–6-os lemez A–D sorának minden egyes mélyedéséhez kivéve az A1-et (a lemezek felső fele).

e) 50 µl A tápközeget adunk az 1-es lemez A1–D3 mélyedéseire (a lemez felső fele).

f) 50 µl A [1% DMSO] tápközeget adunk az 1-es lemez 1–3 oszlopának összes mélyedéséhez.

g) 100 µl 1×104 sejt/ml koncentrációjú sejtet adunk az 1-es lemez 1–3 oszlopának minden egyes mélyedéséhez és a többi lemez összes mélyedéséhez (kivéve A1-et, ami vakpróba). Ez mélyedésenként 1000 sejtet jelent.

h) A lemezeket behelyezzük az inkubátorba, amíg a vizsgálandó anyag hígításait elkészítjük.

2. Kontrollminták és a vizsgálati minták elkészítése

(a) Lemezeken elkészítjük a 35B és az A–D vegyületek 1:3 hígítási sorozatát 100%-os DMSO-val.

(1) 60 µl DMSO-t adunk a 2–12 oszlopok A–E sorának összes mélyedésébe.

(2) 70 µl 35B-t (10 mmol/l) adunk 100% DMSO-ban az A1 mélyedésbe.

(3) 70 µl A-t (10 mmol/l) adunk 100% DMSO-ban a B1 mélyedésbe.

(4) 70 µl B-t (10 mmol/l) adunk 100% DMSO-ban a C1 mélyedésbe.

(5) 70 µl C-t (10 mmol/l) adunk 100% DMSO-ban a D1 mélyedésbe.

(6) 70 µl D-t (10 mmol/l) adunk 100% DMSO-ban az E1 mélyedésbe.

(7) Sorozathígítást végzünk (35B, A–D) 1:3 arányban 12 oszlopon keresztül lefelé úgy, hogy az 1. oszlopból 30 µl oldatot átvisszünk a 2. oszlopba, majd a 2. oszlopból a 3.-ba és így tovább. Minden hígítás előtt a csúcsot kicseréljük.

(b) 1:10 hígítású lemez elkészítése A tápközegben

(1) Egy másik lemez A–E soraiban készítünk egy sort az első 1:10 arányú hígításhoz, amely minden egyes vegyület 100%-os DMSO sorának felel meg a következők szerint:

a 35B vegyület az A sorba az első 1:10 hígításhoz,

A vegyület a B sorba az első 1:10 hígításhoz,

B vegyület a C sorba az első 1:10 hígításhoz,

C vegyület a D sorba az első 1:10 hígításhoz,

D vegyület az E sorba az első 1:10 hígításhoz.

(2) 180 µl A tápközeget adunk az A–E sorok minden mélyedésébe a 100% DMSO sornak megfelelően. 2,5 ml szükséges soronként.

(3) Eltávolítunk 20 µl-t a 100%-os DMSO sorok minden sorának mindegyik mélyedéséből és átvisszük azt a megfelelő 1:10 sorba.

(c) Az 1:100 hígítású lemez elkészítése A tápközegben:

(1) 3 vizsgálandó vegyületenként készítünk egy lemezt.

(2) 225 µl A tápközeget teszünk az A, B, D, E, G és H sor összes mélyedésébe, üresen hagyva a C és F sorokat. Ehhez 20 ml A tápközeget használunk lemezenként.

(3) Az egyes vegyületek 1:10 arányú hígítású sorából átvisszünk 25 µl-t az 1:100-as hígítású lemez megfelelő két sorába, a csúcsokat az egyes transzformációk előtt kicserélve.

Oszlopszám	Hatóanyag-koncentráció (nmol/l)	Hatóanyagoldat (µl)
1.	25 000	25,00 000
2.	8 333	8,33333
3.	2 778	2,77778
4.	926	0,92593
5.	309	0,30864
6.	103	0,10288
7.	34	0,03429
8.	11	0,01143

Oszlopszám	Hatóanyag-koncentráció (nmol/l)	Hatóanyagoldat (µl)
9.	3,81	0,00381
10.	1,27	0,00127
11.	0,42	0,00042
12.	0,14	0,00014

3. SN123 vírus hozzáadása a lemezekhez

a) Az Sn123-at 37 °C-os vízfürdőn 10 perc alatt felengedjük.

b) Az Sn123-at 1:16 térfogatarányban hígítjuk, ehhez 1 ml Sn123-at hozzáadunk 15 ml A tápközeghez.

c) 50 µl Sn123-at (1:16) adunk a 2–6-os lemez E1–H12 mélyedéseire és az 1-es lemez E1–H3 mélyedéseire.

4. A vizsgálandó vegyületek hozzáadása a lemezekhez

a) 50 µl kontroll- és tesztvegyületet adunk az 1:100 hígítású lemezek soraiból a végső lemezek megfelelő soraihoz (a csúcsokat minden egyes átvitel előtt cserélve). Az 1:100-as lemez egy sora 4 sort fog képviselni az utolsó lemezen. A1-et vakpróbának hagyjuk.

b) Az összes lemezt 7 napig 37 °C-on 5% CO₂-tartalmú atmoszférában inkubáljuk.

c) A 7. napon elkészítjük az Xtt jegyzőkönyvet az alábbiak szerint:

d) Xtt/PMS-oldatot készítünk: (4 lemez=20 ml)
(6 lemez=30 ml)

(1) 2 mmol/l koncentrációjú PMS elkészítése:

15,3 mg PMS+0,5 ml PBS=100 mmol/l PMS

100 µl (100 mmol/l) PMS+4,9 ml PBS=2 mmol/l PMS

(2) 500 ml vizet mikrohullámú berendezésben magas fokozaton 5 percre melegítünk.

(3) 20 vagy 30 ml fenolvörös RPMI-t teszünk egy 50 ml-es centrifugacsőbe.

(4) Az RPMI-t a forró vizes főzőpohárba tesszük.

(5) 20 vagy 30 mg XTT-t adunk a fellemegeztet RPMI-hez. XTT végső koncentrációja: 1 mg/ml.

(6) Megvárjuk, amíg az XTT feloldódik, majd 200 µl 2 mmol/l PMS-t adunk 10 ml XTT-oldatra számítva.

(e) Az XTT/PMS hozzáadása a lemezekhez:

(1) 50 µl XTT/PMS oldatot adunk az összes lemez minden mélyedéséhez.

(2) A lemezeket lefedjük és 4 órán keresztül inkubáljuk 37 °C-on 5% CO₂-tartalom mellett.

(3) A lemezeket kivesszük az inkubátorból és a fedeleket műanyag lemez lezárával kicseréljük.

(4) Összekeverjük a lemezek tartalmát.

(5) Leolvassuk a lemezeket a 450 nm vizsgálati és a 650 nm referencia-hullámhosszon.

III. Fluoreszcens HIV-1 proteáz inhibitor próba a

HIV-proteáz gátlásának vizsgálatára [az

eredményeket az I. táblázatban adjuk meg „Pandex (ng/ml)” jelöléssel]

A leírásban az alábbi rövidítéseket használjuk:

BSA	borjú-szérumalbumin
BOC	terc-butyl-oxi-karbonil-csoport
BrZ	2-bróm-benzil-oxi-karbonil-csoport
2-ClZ	2-klór-benzil-oxi-karbonil-csoport
DCC	diciklohexil-karbodiimid
DIEA	diizopropil-etil-amin
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav

FITC	fluoreszcein-izotio-karbamil-csoport
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
MES	4-morfolin-etánszulfonsav
PAM	fenil-acetimido-metil-csoport
TAPS	3-[tris(hidroxi-metil)-metil]-amino-1-szulfonsav
TRIS	tris(hidroxi-metil)-amino-metán
TOS	p-toluolszulfonil-csoport (tozilcsoport)

A) Proteáz és Gag-frakciók előállítása

1. Az *E. coli* K12 L507/pHP10D törzs tenyésztése

A fagyasztva szárított *E. coli* K12 L507/pHP10D törzset a Northern Regional Research Laboratory-tól (Peoria, Illinois 61604, USA) szereztük be NRRL B-18560 letéti számon (letétbe helyezve 1989. november 14-én). A liofilizátumokat 10 ml LB tápközeget (literenként 10 g Bacto-trytone, 5 g Bacto-élesztő kivonat és 10 g vizes nátrium-klorid) tartalmazó csövekbe töltjük, a pH-t 7,5-re beállítjuk és egy éjszakán át 32 °C-on inkubáljuk.

Az így kapott tenyészet egy kis részét LB-agar (LB tápközegben literenként 15 g Bacto-agar) lemezekre helyezzük, amelyek milliliterenként 12,5 µg tetraciklint tartalmaznak, oly módon, hogy az *E. coli* K12 L507/pHP10D egy egyedülálló telep izolátumát kapjuk. Az így kapott egyedülálló teleppel 10 ml, 12,5 µg/ml tetraciklint tartalmazó LB tápközeget oltunk be és egy éjszakán át erőteljes rázatással 32 °C-on inkubáljuk. Ezzel a 10 ml tenyészettel oltjuk be az ugyan-csak 12,5 µg/ml tetraciklint tartalmazó LB tápközeget, és erőteljes rázatás mellett 32 °C-on inkubáljuk, amíg a tenyészet a logaritmusos fázis középső tartományát el nem éri.

2. Az *E. coli* K12 L507/pHGAG törzs tenyésztése

A fagyasztva szárított *E. coli* K12 L507/pHGAG törzset az NRRL-től szereztük be NRRL B-18561 letéti számon (letétbe helyezve 1989. november 14-én). Izoláljuk az *E. coli* K12 L507/pHGAG egy tisztított telepét, és ezt használjuk inokulásként a tenyészethez, amelyet lényegében a fenti 1. pontban, az *E. coli* K12 L507/pHP10D törzsnél leírtak szerint a logaritmusos fázis középső tartományáig növesztünk.

3. A proteáz-frakció izolálása

Az *E. coli* K12 L507/pHP10D törzs tenyésztését a logaritmusos fázis középső tartományáig növesztjük 32 °C-on 12,5 µg/ml tetraciklint tartalmazó LB tápközegben. A tenyészet hőmérsékletét gyorsan 40 °C-ra emeljük, hogy megindítsuk a génexpressziót, és a sejteket 2,5 órán át ezen a hőmérsékleten növesztjük, majd a tenyészetet jéggel gyorsan lehűtjük. A sejteket centrifugáljuk, és a sejtüledéket 20 ml 50 mmol MES pufferben (pH=6,0) – amely 1 mmol EDTA-t, 1 mmol DTT-t, 1 mmol PMSF-t és 10% glicerint tartalmaz („A” puffer) – reszuszpendáljuk. A sejteket ultrahangos kezeléssel feltárjuk, ehhez Fischer Model 300 Dismembrator készüléket és mikrocúcsot használva. A szuszpenziót 27 000×g-vel centrifugáljuk, a felülúszót az „A” pufferrel 60 ml-re kiegészítjük, és 2,0×19 cm QAE-

Sephacrose oszlopra visszük (1 ml/perc átfolyási sebesség mellett 4 °C hőmérsékleten), amelyet előzőleg „A” pufferrel kiegyensúlyoztunk. Az oszlopot 180 percen át izokratikusan mossuk, majd 120 percen át gradienselúciónak vetjük alá, amihez „A” puffert használunk, melyben a nátrium-klorid-koncentráció 0-ról 1,0 mol/l-re változik. Az enzimatisz aktivitást HPLC-vel mérjük Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val szintetikus peptidet használva, ahogyan azt Margolin és munkatársai leírták [Biochem. Biophys. Res. Commun. 167, 554–560 (1990)]. A p1 peptid (Ser-Gln-Asn-Tyr) termelődését mérjük.

Az aktív frakciókat egyesítjük, 1,2 mol/l ammónium-szulfáttal a pH-t beállítjuk, és 2,0×18 cm-es hexil-agaróz oszlopot alkalmazunk, amelyet előzőleg 1,2 mol/l ammónium-szulfátot tartalmazó „A” pufferrel kiegyenlítettünk. A mintát 1 ml/perc átfolyási sebességgel 4 °C hőmérsékleten visszük az oszlopra, ugyanezen sebességgel mossuk 240 percen át az oszlopot „A” pufferrel, majd fordított lineáris gradienssel eluáljuk 120 percen át, melyhez ugyanilyen átfolyási sebesség mellett „A” puffert használunk, amelyben az ammónium-szulfát koncentrációja 1,2 mol/l-ről nullára csökken. Az oszlopot ezután izokratikusan mossuk az „A” pufferrel 120 percen át.

Az aktív frakciókat egyesítjük, Amicon kevertetett cellában YM-10 membrán alkalmazásával 10 ml térfogatra betöményítjük, és ezután 1,0×10 cm-es MonoS kationcserélő oszlopra visszük, amit előzőleg „A” pufferrel kiegyenlítettünk. A minta rávitele 1 ml/perc átfolyási sebességgel 25 °C-on történik. Miután 30 percig izokratikusan mostuk az oszlopot, a proteáz lineáris gradienssel eluáljuk 40 percen át „A” pufferrel, amelyben a vizes nátrium-klorid koncentrációja nulláról 0,45 mol/l-re emelkedik. Ezután 40 percen át mossuk az oszlopot 0,45 mol/l vizes nátrium-kloridot tartalmazó „A” pufferrel.

Az aktív frakciókat egyesítjük, 200 µl-re betöményítjük egy Amicon kevertetett cellában YM-10 membrán alkalmazásával. A proteázoldatot egy Superose 6 méretkizárásos oszlopra visszük, amit előzőleg 0,1 mol/l vizes nátrium-klorid tartalmú „A” pufferrel egyenlítettünk ki. Az oszlopot izokratikusan 0,5 ml/perc átfolyási sebességnél ezzel a pufferrel mossuk, amelyet követően a HIV-proteáz egyetlen csúcsban eluálódik az oszlopról.

A QAE-Sephacrose és a hexil-agaróz gyártója a Sigma Chemical Company, a Superose 6 és MonoS gyanatákat a Pharmaciától szereztük be. A pufferek és a reagensek a Sigma cégtől származnak.

4. A Gag-frakció előállítása

Az előbbiekhöz hasonló módon az *E. coli* K12 507/pHGAG törzs tenyésztését 32 °C-on a logaritmusos középső tartományáig növesztjük, majd 4-5 órára a hőmérsékletet 40 °C-ra emeljük. A tenyészetet jégen lehűtjük, centrifugáljuk, majd a sejtüledéket 8 ml 5 mg/ml lizozimot tartalmazó lizálópufferben szuszpendáljuk. A lizálópuffer összetétele: 50 mmol/l Tris-HCl (pH=7,8), 5 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 100 mmol/l NaCl, 1 µg/ml E64 és 2 µg/ml aprotinin.

A szuszpenziót 30–60 percen át inkubáljuk 4 °C-on, majd Branson® Cell Disrupter készülékben 60%-os teljesítmény mellett háromszor 20 másodpercig ultrahangos feltárásnak tesszük ki, az egyes kezelések között hűtést alkalmazva. A szuszpenziót 15 000×g-vel lecentrifugáljuk, majd a felülúszót, mely a kifejeletlen gag proteint tartalmazza, Sephadex G–50 méretkizárásos oszlopon részlegesen tisztítjuk, és 50% glicerint tartalmazó lizálópufferben tároljuk –20 °C hőmérsékleten.

B) Az Nα-biotin-Gly-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gly-Lys (Nε-FITC)-OH képletű szubsztrát előállítás

1. Az amino-terminálison biotinilezett peptid előállítás

Az Nα-Boc-Gly-Ser-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Ile-Val-Gly-Lys(2-CIz)-OCH₂-PAM-gyanta képletű védett peptid/gyanta komplexet az Advanced Chemtech Model 200 peptidszintetizátoron állítjuk elő 1,5 mmol fokozatnál, a szokásos dupla páros eljárást alkalmazva. Az amino-terminális terc-Boc-csoportot 50%-os trifluor-ecetsavval metilén-kloridban eltávolítjuk, és a gyantát metilén-kloridban lévő 5%-os diizopropil-etilaminnal (DIEA) semlegesítjük. A peptid/gyanta komplexhez 20 ml dimetil-szulfoxidban 1,1 g (4,5 mmol) biotint, majd 9 ml metilén-kloridban 4,5 mmol diciklohexil-karbodiimidet (DCC) adunk. A kapott reakcióelegyet 11 ml metilén-kloriddal 40 ml össztérfogatra hígítjuk, és hagyjuk reagálni 5 órán át. A kapott oldatot betöményítjük, a gyantát dimetil-szulfoxiddal, dimetil-formamiddal és metilén-kloriddal mossuk, majd metilén-kloridban lévő 5%-os DIEA-val semlegesítjük. Ezt a reakciót kétszer megismételjük, 12 órát hagyva az egyes reakciókra. A gyanta ninhidrines analízise azt mutatja, hogy a biotin és a glicin aminocsoportja között a reakció teljes. A végső peptid/gyanta komplexet dimetil-formamiddal és metilén-kloriddal alaposan kimosva és megszáritva 4,3 g (98%) terméket kapunk.

2. A védőcsoport eltávolítása

50 ml hidrogén-fluorid/m-krezol oldatban 0 °C-on történő egyórás kezeléssel eltávolítjuk a peptid védőcsoportját, és a peptidet lehasítjuk a gyantáról. Vákuumdesztillációval eltávolítjuk a hidrogén-fluoridot, és az m-krezolt 100 ml dietil-éterrel extraháljuk a reakcióelegyből. A peptidet ezután 50%-os vizes ecetsavban oldjuk, fagyasztjuk és liofilizáljuk. Ennek során 2,14 g terméket kapunk.

3. Tisztítás

A biotinilezett amino-terminálisú, nyers peptidet feloldjuk acetonitril 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó 5%-os 200 ml térfogatú vizes oldatában és 0,22 μ-os szűrőn átszűrjük. A szűrletet rávisszük egy 2,2×25 cm méretű fordított fázisú oktadecil-szilikagél oszlopra (Vydac C–18), melyet előzőleg ugyanezzel a pufferral kiegyenlítettünk. A peptidet 855 perces lineáris gradienelúcióval, 2 ml/perc átfolyási sebességnél oldjuk le az oszlopról, ahol az acetonitril koncentrációját

7,5%-ról 25%-ra növeljük. Az egyes frakciókat 4,6×250 mm méretű Vydac C–18 oszlopon HPLC-vel analizáljuk azonos pufferkörülmények alkalmazásával. A kívánt anyagot tartalmazó frakciókat egyesítjük, majd fagyasztva és szárítva 1,206 g terméket kapunk (kitermelés: 62%).

Az izolált biotinilezett peptid aminosav-analízisének eredményei: Asn 1,1; Ser 0,96; Gln 1,1; Pro 1,1; Gly 2,1; Val 0,80; Ile 0,78; Tyr 1,1; Lys 1,1 – az elméletileg várt eredménynek megfelelően. Gyors atomokkal végzett bombázás útján mérve a molekulaion tömege az elméleti értéknek megfelelően 1288.

4. Jelölés

A tisztított biotinilezett peptidet a C-terminálison a Pandex-vizsgálatnál használt fluoreszcens markerrel jelöljük. Először 1,206 g (0,936 mmol) biotinilezett peptidet feloldunk 100 ml 0,1 mol/l nátrium-borát pufferben (pH=9,5). Az oldathoz 2 óra alatt 10 egyenlő adagban elosztva hozzáadjuk 3 g (7,7 mmol) fluoreszcein-izotiocianát 15 ml dimetil-szulfoxidban készült oldatát. Az utolsó adagolás után egy órán át hagyjuk lejárásodni a reakciót. Az oldat kémhatását 5 mol/l sósavval pH=3 értékre beállítjuk, és a keletkezett csapadékot centrifugálással eltávolítjuk.

A peptidoldat kémhatását 5 mol/l nátrium-hidroxiddal pH=7,8 értékre állítjuk be, majd 0,1 mol/l ammónium-acetát-oldat (pH=7,5) hozzáadásával 200 ml-re hígítjuk. Az így kapott oldatot 0,22 μm-es szűrőn átszűrjük, és 2,2×25 cm méretű Vydac C–18 oszlopra visszük, melyet előzőleg 0,1 mol/l ammónium-acetátban (pH=7,5) készült 5%-os acetonitrillel kiegyensúlyoztunk. A peptidet 855 perc alatt lineáris gradienssel eluáljuk az oszlopról 2 ml/perc átfolyási sebességnél, mialatt az acetonitril koncentrációját 5%-ról 25%-ra emeljük. Az egyes frakciókat analitikai HPLC-vel elemezzük. A kívánt terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük, fagyasztjuk és liofilizáljuk, így 190,2 mg terméket kapunk (kitermelés: 12%).

A tisztított peptid aminosav-analízisének eredménye: Asn 1,1; Ser 1,0; Gln 1,1; Pro 1,1; Gly 2,1; Val 0,8; Ile 0,8; Tyr 1,1; Lys 1,0 – az elméletileg várt eredményeknek megfelelően. Gyors atomokkal végzett bombázás útján mérve a molekulaion tömege az elméletileg várt értéknek megfelelően 1678.

5. Fluoreszcens HIV-1 proteáz gátlási vizsgálat

Az alábbi összetételű puffereket és oldatokat használjuk a fluoreszcens HIV-1 proteáz gátlási vizsgálatban:

MES-ALB puffer: 0,05 mol/l 4-morfolin-etánszulfonsav, pH=5,5

	0,02 mol/l	NaCl
	0,002 mol/l	EDTA
	0,001 mol/l	DTT
TBSA puffer:		
	11,0 mg/ml	BSA
	0,02 mol/l	Trisz
	0,15 mol/l	NaCl
	1,0 mg/ml	BSA

Avidinnel bevont gyöngyök oldata: 0,1%-os Fluorion Avidin Assay Particles-t tartalmazó oldat (0,6–0,8 µm átmérőjű polisztirolgyöngyökhöz konjugált avidin, TBSA pufferben)

Enzimoldat: 27 IU/ml koncentrációjú tisztított HIV-1 proteáz-oldat MES-ALB pufferben (1 IU megfelel annak az enzimmennyiségnek, amely 37 °C-on percenként 1 µmol szubsztrátot hidrolizál el).

Egy legömbölyített aljú, 96 mélyedéses lemez minden egyes mélyedésébe bemérünk 20 µl fenti enzimoldatot, majd hozzáadunk a vizsgálandó vegyület 20 tömeg%-os vizes dimetil-szulfoxidos oldatából 10 µl-t. A tisztított HIV-1 proteáz a fentiekben leírtak szerint kapjuk meg. A reakcióelegyet egy órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten, majd a fentiek szerint előállított szubsztrát MES-ALB pufferben készült oldatának (1,5 µl/ml) 20 µl-ét adjuk hozzá minden egyes mélyedéshez. Az oldatokat ezután 16 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd az egyes mélyedések tartalmát 150 µl MES-ALB pufferrel hígítjuk.

Egy másik legömbölyített aljú, 96 mélyedéses Pandex lemez minden egyes mélyedésébe bemérünk 25 µl avidinnel borított gyöngyszuszpenziót, majd 25 µl hígított, fenti inkubáló oldatot adunk hozzá. Az elegyet alaposan összekeverjük, és a lemezeket Pandex® készülékbe helyezzük, mossuk, kiürítjük és mérjük. A minta kiértékelésénél a gerjesztéshez 485 nm hullámhosszú fényt használunk, az epifluoreszcencia mérése 535 nm-en történik.

A fluoreszcens vizsgálatban a találmány szerinti vegyületekre kapott IC₅₀-értékeket az I., II. és III. táblázatban foglaljuk össze. Valamennyi értéket az [1S-(1R*,4R*,5S*)]-N-(1-(2-amino-2-oxo-ethyl)-2-oxo-3-aza-4-fenil-metil-5-hidroxi-6-[2-(1-terc-butil-amino-1-oxo-metil)-fenil]-hexil)-2-kinolinil-karboxamid pozitív kontrollhoz viszonyítottuk.

A találmány szerinti vegyületekre kapott aktivitásadatokat az I., II. és III. táblázatban és az ezeket megelőző példákban mutatjuk be. A zárójelbe tett eredmények a 0 526 009 számú európai közrebocsátási irat 1. példája szerinti vegyületre (=35B) vonatkoznak ugyanilyen vizsgálatban.

I. táblázat

A zárójelben lévő eredmények a 0 526 009 számú európai közrebocsátási irat 1. példája szerinti vegyületre (=35B) vonatkoznak azonos vizsgálatban

Példa	Teljes sejt IC ₅₀ nM	Teljes sejt IC ₉₀ nM	SRI CEM (ng/ml)	SRI MT2 (ng/ml)	Pandex (ng/ml)
1.	2,39 (9,93)	19,0 (53,5)	8,62	6,27	0,2 ^c (0,16) ^d

c) 35B 9,3 ng/ml; d) 35B 0,63 ng/ml

Példa	Teljes sejt IC ₅₀ nM	Teljes sejt IC ₉₀ nM	SRI CEM (ng/ml)	SRI MT2 (ng/ml)	Pandex (ng/ml)
1.	2,39 (9,93)	19,0 (53,5)	8,62	6,27	0,2 ^b (0,16) ^d

b) 35B 2,7 ng/ml; d) 35B 0,63 ng/ml

Példa	Teljes sejt IC ₅₀ nM	Teljes sejt IC ₉₀ nM	SRI CEM (ng/ml)	SRI MT2 (ng/ml)	Pandex (ng/ml)
Referencia			1000 1380	1310 1500	462 ^d

d) 35B 0,48 ng/ml

II. táblázat

2. példa szerinti vegyület

IC₅₀=14,5 nM (teljes sejt)

IC₅₀=56,1 nM (teljes sejt)

III. táblázat

Gátló aktivitás

Példa száma	Fluoreszcenciavizsgálat, IC ₅₀ (µg/ml)
Kontroll	1,0
1.	0,25
Referencia	962

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (1/I) képletű vegyület vagy gyógyászati lag elfogadható sója.

2. Az 1. igénypont szerinti vegyület (1/II) képletű sztereoizomerje vagy gyógyászati lag elfogadható sója.

3. A 2. igénypont szerinti vegyület lényegében tiszta sója.

4. A 2. igénypont szerinti vegyület lényegében tiszta sztereoizomerje.

5. (1/III) képletű vegyület.

6. Az 5. igénypont szerinti vegyület (1/IV) képletű sztereoizomerje.

7. A 6. igénypont szerinti vegyület lényegében tiszta sztereoizomerje.

8. Gyógyászati készítmény, amely

(a) gyógyászatiilag hatékony mennyiségű 1. igénypont szerinti (1/I) képletű vegyületet vagy gyógyászatiilag elfogadható sóját és

(b) gyógyászatiilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

9. A 8. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ahol az (a) pontban említett vegyület vagy gyógyászatiilag elfogadható sója a 2. igénypont szerinti (1/II) képletű sztereoizomer, vagy az említett sztereoizomer gyógyászatiilag elfogadható sója.

10. A 9. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ahol az (a) pontban említett vegyület a 2. igénypont szerinti (1/II) képletű sztereoizomer.

11. A 9. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ahol az (a) pont szerinti vegyület vagy gyógyászatiilag

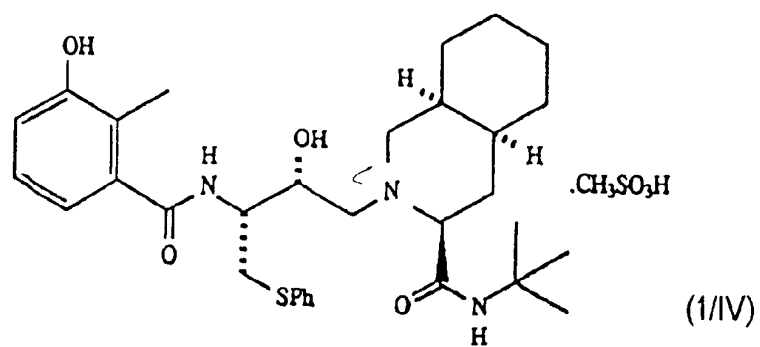
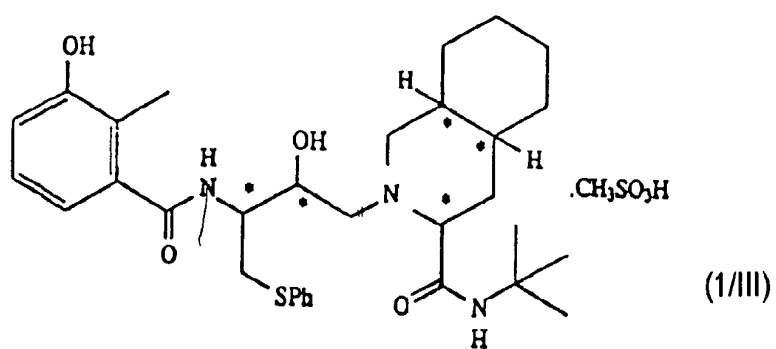
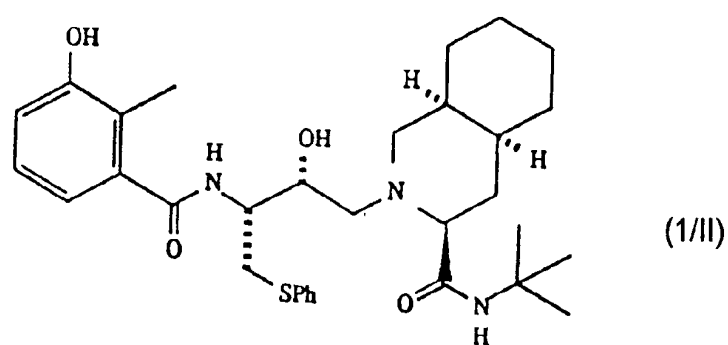
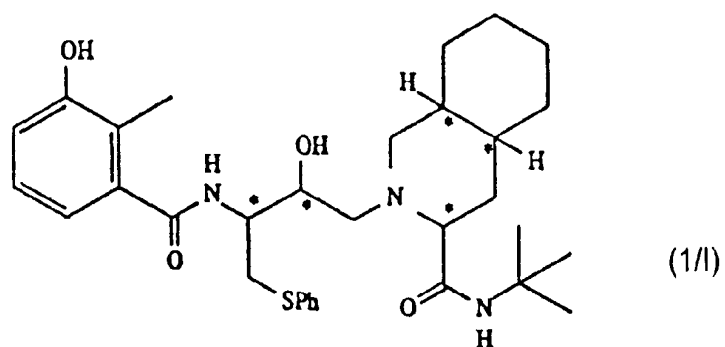
elfogadható sója a 6. igénypont szerinti (1/IV) képletű gyógyászatiilag elfogadható só.

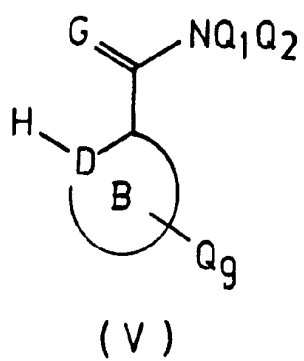
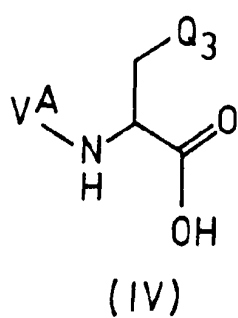
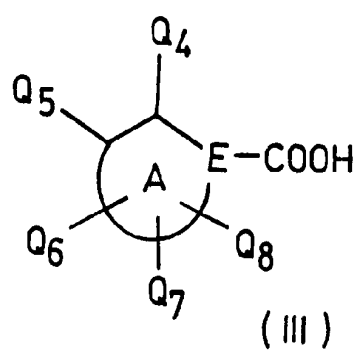
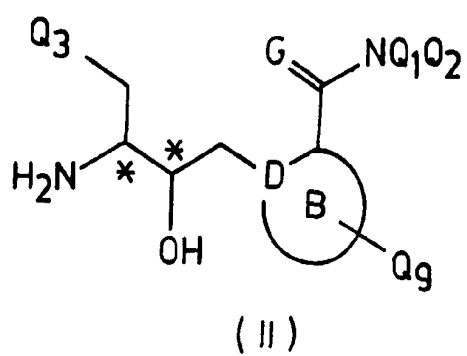
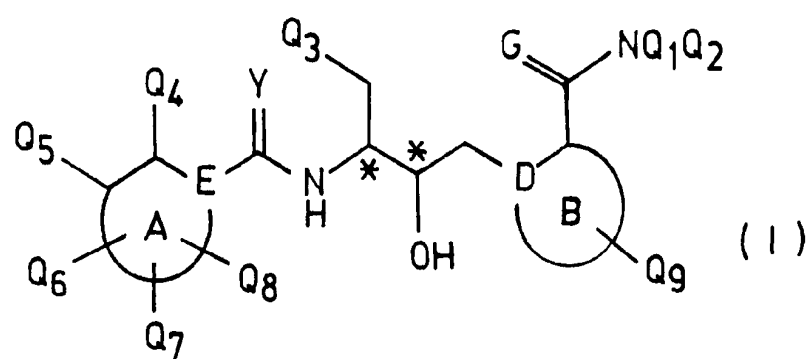
12. Az 1. igénypont szerinti (1/I) képletű vegyület vagy gyógyászatiilag elfogadható sója alkalmazása HIV-proteáz gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.

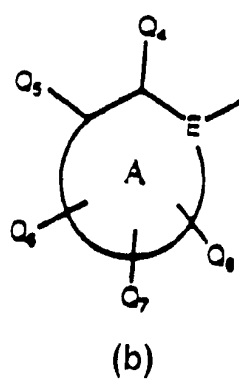
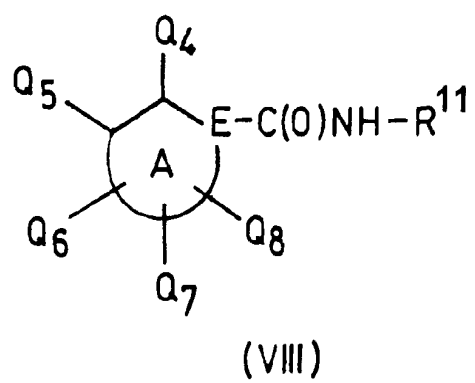
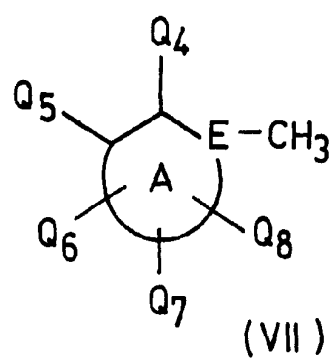
13. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy az említett vegyület vagy gyógyászatiilag elfogadható sója a 2. igénypont szerinti (1/II) képletű sztereoizomer vagy az említett sztereoizomer gyógyászatiilag elfogadható sója.

14. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy az említett vegyület vagy gyógyászatiilag elfogadható sója a 2. igénypont szerinti (1/II) képletű sztereoizomer.

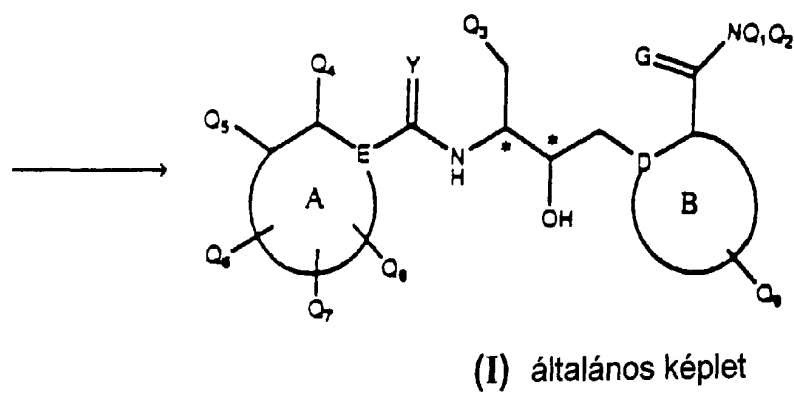
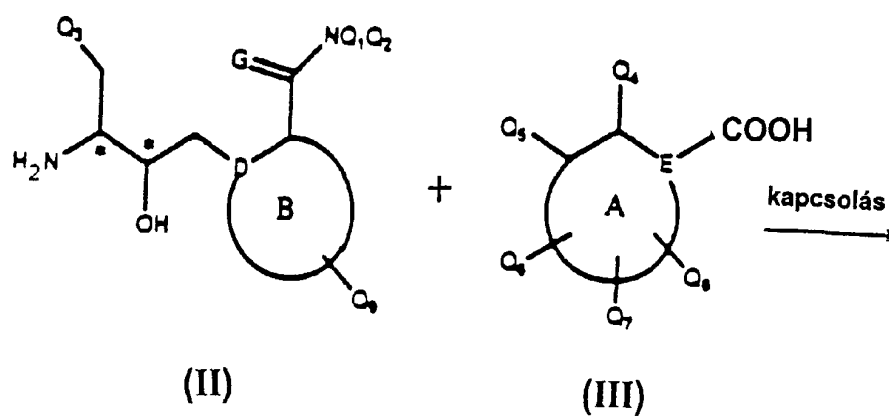
15. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy az említett vegyület vagy gyógyászatiilag elfogadható sója a 6. igénypont szerinti (1/IV) képletű gyógyászatiilag elfogadható só.



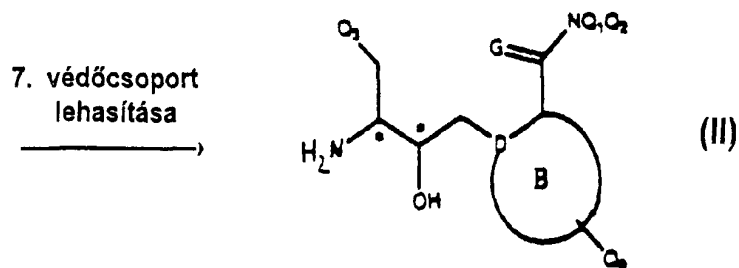
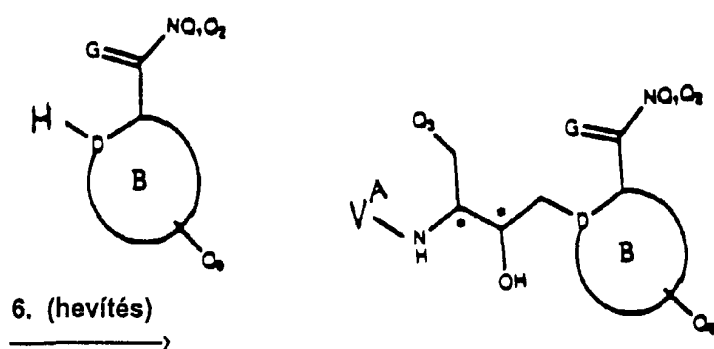
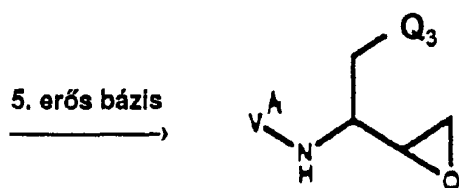
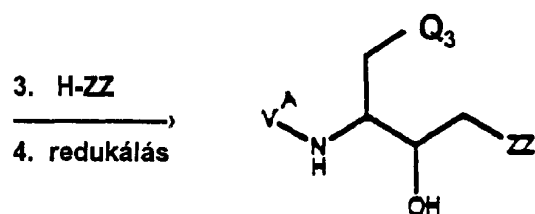
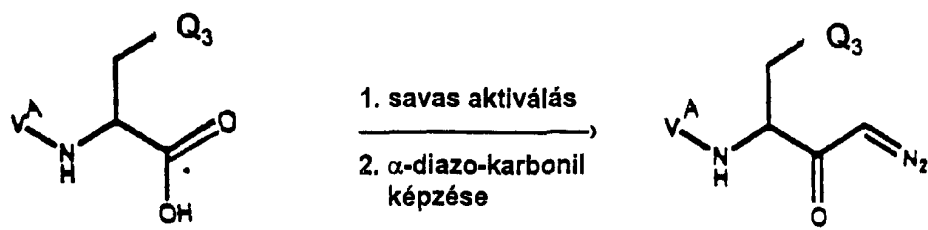




A REAKCIÓVÁZLAT



B REAKCIÓVÁZLAT



Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
Felelős vezető: Törőcsik Zsuzsanna
Windor Bt., Budapest