



HU000229308B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **229 308**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

- (21) A bejelentés ügyszáma: **P 04 01604**
(22) A bejelentés napja: **2002. 07. 18.**
(40) A közzététel napja: **2004. 12. 28.**
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 10. 28.**

- (51) Int. Cl.: **C07C 62/32** (2006.01)
A61K 311/92 (2006.01)
A61K 311/95 (2006.01)
A61K 312/22 (2006.01)
A61K 31/36 (2006.01)
C07D 317/50 (2006.01)
C07C 696/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
C07C 59/54 (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/IT 02/00474

(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 03011808

(30) Elsőbbségi adatok:
RM2001A000464 **2001. 07. 31.** **IT**

(72) Feltalálók(k):
Vesci, Loredana, Pomezia (IT)
Merlini, Lucio, Milánó (IT)
Dallavalle, Sabrina, Milánó (IT)
Penco, Sergio, Milánó (IT)
Giannini, Giuseppe, Pomezia (IT)
Pisano, Claudio, Pomezia (IT)

(73) Jogosult(ak):
Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., Róma (IT)

(74) Képviselő:
dr. Fehérvári Flóra, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Antiangiogén, tumorelles és proapoptotikus hatású retinoid-származékok**

(57) Kivonat

A találmány az (I) képletű vegyületekre vonatkozik, a képletben

R jelentése cikloalkil- vagy adamantilcsoport, amelyben a CH-csoportok legalább egyike C-halogénatommal vagy C-alkilcsoporttal lehet helyettesítve, és a CH₂-csoportok egyike oxigén- vagy kénatommal, CH-halogénatommal,

CH-arilcsoporttal, CH-heteroaril-csoporttal, CH-arilalkil-csoporttal vagy CH-heteroarilalkil-csoporttal lehet helyettesítve;

R' jelentése OR^m, OCOR^m vagy COR^{IV} képletű csoport;

R'-D jelentése O-(CH₂)_n-O képletű csoport, ahol n értéke 1-3;

D jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport, O-alkil, (CH₂)_n-NH₂, (CH₂)_n-NH-alkil vagy (CH₂)_n-OH képletű csoport, ahol n értéke 1-4;

R'' jelentése tetrazol, SO₃H, NHSO₃H, CHO, COOH, COO-alkil, CONHOH, CONH-aril-, CONH-C₆H₄OH, CH-,OR^m,

PO₃H vagy CO-(CH₂)_n-aril képletű csoport, ahol n értéke 0-4;

R''' jelentése hidrogénatom, alkil-, aril-, arilalkil-, heteroaril-, heteroarilalkil-csoport, $-SO_3H$ képletű csoport, α vagy β D- vagy L-glikozil-csoport;

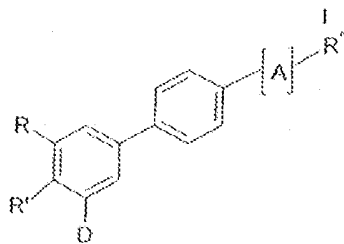
R^{IV} jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy OR''' képletű csoport;

[A] jelentése $[C(R^V, R^VI)-C(R^{VII}, R^{VIII})]_n$, $[C(R^{IX})=C(R^X)]_n$, $[C\equiv C]_n$ képletű csoport, ahol n értéke 0-3;

R^V , R^VI , R^{VII} és R^{VIII} jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, halogénatom, hidroxilcsoport, OR''' képletű csoport, nitro-, amino- vagy arilcsoport, $-O-$, $-CH_2-$, $-CX_2-$ (ahol X jelentése halogénatom) vagy $-CH(R''')$ - képletű csoport;

R^{IX} és R^X jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport, halogénatom, alkil-, aril-, ciano-, nitrocsoport vagy $COOR'''$ képletű csoport.

A találmány kiterjed a fenti vegyületeket tartalmazó, megváltozott angiogenezissel összefüggő betegségek, például gyulladások, tumorok, artritisz vagy pszoriázis kezelésére alkalmas gyógyszerkészítményekre. A találmány kiterjed továbbá az (I) képletű vegyületeket és egy vagy több ismert rákellenes hatóanyagot tartalmazó kombinációkra és az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítményekre.



ANTIANGIOGÉN, TUMORELLENES ÉS PROAPOPTOTIKUS HATÁSÚ RETINOID-SZÁRMAZÉKOK

A találmány az (I) képletű tumorelleses, antiangiogén, proapoptotikus, gyulladásgátló hatású retinoid-származékokra vonatkozik. Az (I) általános képletben

- R jelentése cikloalkil-, adamantils csoport, amelyben a CH-csoportok legalább egyike C-halogén-atommal vagy C-alkilcsoporttal lehet helyettesítve, és a CH₂-csoportok egyike oxigén- vagy kén-atommal, CH-halogén, CH-aril, CH-heteroaril, CH-arilalkil vagy CH-heteroarilalkil csoporttal lehet helyettesítve;
- R' jelentése OR^m, OCOR^m vagy COR^{IV} képletű csoport;
- R'-D jelentése O-(CH₂)_n-O képletű csoport, ahol n értéke 1-3;
- D jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport, O-alkil, (CH₂)_n-NH₂, (CH₂)_n-NH-alkil vagy (CH₂)_n-OH képletű csoport, ahol n értéke 1-4;
- Rⁿ jelentése tetrazol, SO₃H, NHSO₃H, CHO, COOH, COO-alkil, CONHOH, CONH-aril, CONH-C₆H₄OH, CH₂OR^m, PO₃H₂, CO-(CH₂)_n-aril csoport, ahol n értéke 0-4;
- R^m jelentése hidrogénatom, alkil-, aril-, arilalkil-, heteroaril-, heteroarilalkil-csoport, -SO₃H, α vagy β D- vagy L-glikozil-csoport;
- R^{IV} jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy OR^m képletű csoport;
- [A] jelentése [C(R^V, R^{VI})-C(R^{VII}, R^{VIII})]_n, [C(R^{IX})=C(R^X)]_n, [C≡C]_n képletű csoport, ahol n értéke 0-3;
- R^V, R^{VI}, R^{VII} és R^{VIII} jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, halogénatom, hidroxilcsoport, OR^m képletű csoport, nitro-, amino- vagy arilcsoport, -O-, -CH₂-, -CX₂- (ahol X jelentése halogénatom) vagy -CH(Rⁿ)- képletű csoport;
- R^{IX} és R^X jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport, halogénatom, alkil-, aril-, ciano-, nitrocsoport vagy COOR^m képletű csoport.

Az A-vitamin és biológiailag aktív származékai, a retinal és a retinasav fontos szerepet töltenek be a látásban, emellett szerepük van a reproduktív rendszerben is, ahol az embrió növekedés során morfogén szerekként hatnak és szabályozzák a legkülönbözőbb sejttípusok növekedését és differenciálódását az organizmusok növekedésének alapján [Sporn, M.; Roberts, A.; Goodman, D.,: *The Retinoids*, Raven Press, New York (1994)]. A retinasav és származékai biológiai hatását két nukleáris receptorcsalád kölcsönhatása közvetíti: az első neve RAR (retinasav receptor) és a második neve RXR (retinoid X receptor) [Chambon, P.: *FASEB J.*, **10**, 940-54 (1996)]. Mindegyik család három altípusra van osztva (α, β, γ), amelyeket különböző gének kódolnak.

A végig transzretinasav (ATRA) a RAR-hoz és az RXR-hez kötődik, ezzel szemben a 9-cisz-RA csak az RXR-hez kötődik.

A retinoidok, akár természetes, akár szintetikus A-vitamin analógok, nagy befolyást gyakorolnak a sejt-szaporodásra, differenciálódásra és az apoptózisra: ezen tulajdonságoknak tumoros és dermatológiai patológiás állapotok és megváltozott angiogenezissel kapcsolatos patológiás állapotok szabályzására gyakorolt hatását alaposan megvizsgálták.

A felnőtteknél az angiogenezis normálisan nyugalmi állapotban van, de normális működést mutat, példá-

ul sebek hegesezésénél vagy a női reprodukciós ciklusban a méh nyálkahártyájának helyreállításánál.

Az angiogén válasz fiziológiásan stimulálódik, amikor az érműködés csökken és a szövetperfúzió nem megfelelő.

Általánosságban kijelenthető, hogy fiziológiás állapotokban az angiogenezis a nem megfelelő perfúzióra vagy a csökkent oxigén- és tápanyagellátásra adott válasz pozitív visszajelzése, például egy artéria elzáródása esetében, egy szövet tömegének növekedésekor (például izomszövetképződéssel kapcsolatos neovaszkularizáció) vagy megnövekedett oxigén- és tápanyagszükséglettel kapcsolatos megnövekedett terhelés esetén.

Egy artéria részleges vagy teljes elzáródása következtében fellépő helyi ischémiánál a kollaterális edények fejlődésére van szükség a perfúzió fenntartása céljából.

Ismeretes, hogy egy primer tumor növekedését elősegíti a tumoros szövet jó erezettsége. A megfelelő oxigén- és tápanyagellátás elősegíti a tumor gyors növekedését.

Kimutatták, hogy a kiterjedt angiogenezis rendkívül negatív faktor lehet a neoplazmák prognózisában [van Hinsbergh, VW; Collen, A.; Koolwijk, P.: *Ann. Oncol.*, 10 Suppl., 4,60-3 (1999); Buolamwini, JK: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3(4),500-9 (1999)].

Az is ismert, hogy a tumoros sejtek biológiájában alapvető jelentősége van az áttétképző képesség meglétének.

Az áttétet okozó tumoros sejtek képesek elveszteni a környező szerkezetekhez való tapadásukat, behatolnak a vér- és nyirokedényekbe és egyéb távolabbi szövetekben telepsznek meg, ahol önreprodukciójukat folytatni tudják.

Az áttét kritikus esemény a betegség klinikai történetében, mivel ez a rákkal kapcsolatos fő halálok. Közeli kapcsolatban áll a tumor helyén vagy a szomszédos területeken lévő érszövet jelenlétével, illetve kialakulását az segíti elő.

A tumoros sejtek a környező szerkezeteken keresztül-migrálva képesek elérni a tumorok közti véredényeket - akár jelen voltak ezek előzőleg, akár új angiogenezissel képződtek - és ezáltal a véráramot [Ray, JM.; Stetler-Stevenson, WG.: *Eur. Respir. J.*, 7(11),2062-72 (1994); Stetler-Stevenson, WG; Liotta, LA; Kleiner, DE Jr.: *FASEB J.*, 7(15):1434-41 (1993)].

A tumor értartományában lévő nyirok- és véredények közötti kommunikáció következtében a neoplasztikus sejtek mozgása mindkét érendszerben lehetővé válik.

A legutóbbi vizsgálatok során közvetlen összefüggést mutattak ki az angiogenezis és az artritiszes betegségek között [Koch, AE: *Arthritis and Rheumatism*, 41,951-962 (1998)]. Elsősorban azt mutatták ki, hogy az ízületi porcok újraeresedése alapvető szerepet játszik a pannusképződésben és az artritisz kialakulásában. Egy normális porc nem tartalmaz véredényeket, ezzel szemben az artritiszes betegek szinoviális folyadékáa angiogenezist stimuláló faktort tartalmaz, amely az endotéliumsejtekben (EASF) képződik.

Ezen faktor jelenléte okozza a porc eresedését és degradációját.

Egyéb betegségek is kapcsolatban állnak rendellenes angiogenezissel.

Felismerték, hogy a diabetikus retinopátiában [*Histol Histopathol*, 14(4),1287-94 (1999)], a pszoriázisban [*Br. J. Dermatol.*, 141(6),1054-60 (1999)], a krónikus gyulladásban és az ateroszklerózisban [*Planta Med.*, 64(8), 686-95 (1998)] az érintett szövetek újraeresedése elősegítő faktorként játszik szerepet.

Ezért az újraeresedés szabályozása ezen betegségek gátlásának és gyógyításának egyik alapeleme.

A rák kezelésére alkalmas vagy antiangiogén hatást mutató retinoidok már ismertek.

Egy, a retinoidok utolsó generációjához tartozó vegyület a CD437 [*Cancer Research*, 62(8), 2430-6 (2002); *Blood*, 95, 2672-82 (2000); *Leukemia*, 13, 739-49 (1999); *Cancer Letters*, 137, 217-2 (1999)], amely az RAR γ -ra nézve szelektív, gátolja a sejtnövekedést és apoptózist indukál emlőkarcinóma, melanóma és nyaki karcinóma sejtvonalakban, beleértve az ATRA-ra nézve rezisztens növekedést, egy, a receptor kötődéstől független mechanizmus útján [WO97/03682; *J. Med. Chem.*, 38, 4993-5006 (1995)]. Mind a CD437, mind egyéb származékok, mint a cisz-TTNPB-származék (ac. tetrametil-tetrahidronaftil-propenil-benzoát), új apoptózist indukáló anyagok fejlődésének vezetőiként hatnak.

Ezzel párhuzamosan bizonyos, szintézissel előállított retinoidok, mint a TAC-101 [*Clin. Cancer Res.*, 5, 2304-10 (1999)] és származékai, például a RE-80, az AM-580 vagy az Am-80 [*Eur. J. Pharmacol.*, 249, 113-6 (1993)] antiangiogén tulajdonságokat is mutatnak.

Az utóbbi években tapasztalható fejlődés ellenére számos, a gyógyászat területén dolgozó szakértő tekinti a tumoros betegségek és az abnormalis angiogenezissel jellemezhető betegségek kezelésére alkalmas új hatóanyagok kutatására irányuló farmakológiai vizsgálatokat az egyik legígéretesebb területnek.

Valójában máig fennáll az igény olyan új vegyületek iránt, amelyek blokkolják a tumoros betegségeket és az abnormalis angiogenezis által okozott betegségeket vagy ezekre hatást gyakorolnak. Ahogy fentebb említettük, ilyen betegségek a tumorok, a tumoros áttétek, a krónikus gyulladás, az artritiszes betegségek, a diabéteszes retinopátia, a pszoriázis, a krónikus gyulladás és az ateroszklerózis.

Arra a meglepő felismerésre jutottunk, hogy az (I) képletű vegyületek tumorelles, pro-apoptotikus és antiangiogén hatást mutatnak. A találmányunk szerinti (I) képletű vegyületeket korábban nem írták le.

Ezért találmányunk tárgyát az (I) képletű vegyületek képezik.

Találmányunk kiterjed az (I) képletű vegyületekre, továbbá ezek gyógyászati területen való alkalmazására.

Találmányunk kiterjed továbbá az (I) képletű vegyületek előállítási eljárására.

Találmányunk tárgyát képezi továbbá a hatóanyagként egy (I) képletű vegyületet és legalább egy gyógyszerészeti elfogadható hordozó- és/vagy segédanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmény.

Találmányunk kiterjed az (I) képletű vegyületeknek megváltozott angiogenezissel összefüggő patológias állapotok kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására történő alkalmazására, ahol a patológias állapot artritiszes patológias állapot, tumor, áttét, diabéteszes retinopátia, pszoriázis, krónikus gyulladáso betegség vagy ateroszklerózis.

Találmányunk tárgyát képezi továbbá az (I) képletű vegyület tumor kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására történő alkalmazása, ahol a tumorelles aktivitás citotoxikus jellegű és/vagy apoptotikus jellegű és/vagy antiangiogén jellegű, és ahol a tumor szarkóma, karcinóma, karcinoid, csonttumor, neuroendokrin tumor, limfoid leukémia, mieloid leukémia, monocitás leukémia, megakariocitás leukémia, akut promielocitás leukémia vagy Hodgkin-kór.

Találmányunk tárgyát képezi továbbá az (I) képletű vegyületnek tumoros áttét megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására történő alkalmazása.

Ahogy fentebb említettük, a primer tumor növekedését elősegíti a tumoros szövet jó erezettsége és az újraeresedés mértéke nagy mértékben hátrányos faktort jelent a neoplazmák prognózisában. A megfelelő oxigén- és tápanyagellátás a tumor helyén elősegíti a tumor gyors növekedését.

Jól ismert, hogy az orvosok számára a tumorok kezelésére jelenleg hozzáférhető tumorelles szerekkel

sok esetben még mindig nem előzhető meg az ezen betegségben történő elhalálozás. Az is jól ismert, hogy a legtöbb onkológiai beteget nem egyetlen rákellenes szerrel, hanem több rákellenes szer kombinációjával kezelik. A rákellenes szerek kombinációjának alkalmazása abból a tényből fakad, hogy ezek különböző metabolikus szinteken hatnak, ami bizonyos esetekben a tumor teljes remissziójának kedvez, más esetekben meghosszabbítja a beteg életét és/vagy javítja a kezelt betegek életminőségét.

Manapság még mindig nagy igény mutatkozik ismert tumorelleses hatású vegyületekkel kombináltan használható új vegyületek iránt.

A találmányunk szerinti vegyületek egy vagy több rákellenes hatóanyaggal kombinálva használhatók.

Találmányunk tárgyát képezi továbbá egy olyan kombináció, amely egy vagy több (I) képletű vegyületet és egy vagy több ismert rákellenes hatóanyagot tartalmaz, ahol a rákellenes hatóanyag alkilezőszer, topoizomeráz-inhibitor, anti tubulin hatású szer, interkaláló vegyület, antimetabolit, természetes termék, például vinka alkaloid, epipodofilotoxin, antibiotikum, enzim, taxán, sejtdifferenciáló hatású vegyület, foszfortirozin-kináz inhibitor, például Iressa vagy Glivec, TRAIL (tumornekrózis faktorra rokon apoptózis indukáló ligandum), DR4 vagy DR5 receptor agonista (TRAIL hely) immunológiai tumorelleses terápiás vegyület, tumorelleses vakcina vagy α -, β - vagy γ -interferon.

Találmányunk tárgyát képezi továbbá egy olyan gyógyszerkészítmény, amely egy vagy több (I) képletű vegyület és egy vagy több ismert rákellenes hatóanyag kombinációját tartalmazza egy vagy több gyógyszerészetiileg elfogadható hordozó- és/vagy adalékanyaggal együtt.

Találmányunk tárgyát képezi továbbá egy vagy több (I) képletű vegyület egy vagy több ismert rákellenes hatóanyaggal együtt történő alkalmazása tumor kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

Találmányunk tárgyát képezi továbbá egy vagy több (I) képletű vegyület egy vagy több ismert rákellenes hatóanyaggal együtt történő alkalmazása tumor kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására, ahol az (I) képletű vegyület a rákellenes hatóanyag társ-hatásfokozójakénti van jelen.

Találmányunkat az alábbi példákkal szemléltetjük.

ÁLTALÁNOS SZINTÉZIS ELJÁRÁS

Az (I) képletű vegyületeket úgy állítjuk elő, hogy egy (II) általános képletű vegyületet, amelynek képletében R, R' és D jelentése az (I) általános képletnél megadott és X jelentése halogénatom, 4-formilbórsavval reagáltatunk Miyaura-Suzuki-reakcióban [*Chem. Rev.*, 95, 2457-83 (1995)], így állítjuk elő a (III) általános képletű aldehid-származékot.

A (III) általános képletű vegyületet, amelynek képletében R, R' és D jelentése a fent megadott, a szakirodalomban jól ismert eljárásokkal, például Wittig-reakcióval [(*Org. Reactions*, 14. kötet), Wadsworth-Horner-Emmons-reakcióval (*Org. Reactions*, 25. kötet)], Knoevenagel-reakcióval [(*Org. Reactions*, 15. kötet)], Henry-reakcióval [(*Houben-Weyl. Methoden der organischen Chemie*, 10/1 kötet, 250. old.)], Darzens-reakcióval [(*Org. Reactions*, 5. kötet)] és hasonló eljárásokkal állítjuk elő, így kapjuk az (I) képletű vegyületeket, amelyek képletében [A] jelentése $-C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})-$ általános képletű csoport, továbbá R^V , R^{VI} , R^{VII} és R^{VIII} jelentése hidrogén- vagy halogénatom, alkil-, hidroxil-, nitro-, amino- vagy arilcsoport, $-OR''$ általános képletű csoport vagy oxigénatom, vagy ahol [A] jelentése $-C=C-$ képletű csoport.

Egyik változat szerint az (I) képletű vegyületek a (II) általános képletű vegyületekből állíthatók elő Miyaura-Suzuki-reakcióval [*Chem. Rev.*, 95, 2457-83 (1995)] egy (IV) általános képletű bórsav-származék alkalmazásával, a képletben A és R'' jelentése a fent megadott.

Egyik változat szerint az (I) képletű vegyületek, amelyek képletében [A] jelentése $-C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})-$ általános képletű csoport vagy $-C\equiv C-$ képletű csoport, az (V) általános képletű vegyületekből kiindulva állíthatók elő, ahol R, R' és D jelentése a fent megadott, X jelentése halogénatom, ismert eljárásokkal, például Heck által ismertetett reakcióval (*Org. Reactions*, 27. kötet), alkének vagy helyettesített alkének alkalmazásával, fém vagy szerves fémkatalizátorok jelenlétében.

Egyik változat szerint az (I) képletű vegyületek, amelyek képletében [A] jelentése $-C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})-$ általános képletű csoport vagy $-C\equiv C-$ képletű csoport, olyan (I) képletű vegyületekből kiindulva állíthatók elő, amelyek képletében R és D jelentése hidrogénatom és R' jelentése a fent megadott, alkoholokkal végzett alkilezési reakcióval, ilyen alkoholok például az adamantan-1-ol, az 1-metil-1-ciklohexanol, a terc-butanol és hasonlók, katalizátorként kénsav vagy más savak jelenlétében, ilyeneket ismertettek például Charpentier és munkatársai [*J. Med. Chem.*, **38**, 4993-5006 (1995)]. Analóg reakciókkal és a megfelelő alkoholokkal olyan (I) képletű vegyületek állíthatók elő (I) képletű vegyületekből kiindulva, amelyek képletében D jelentése hidrogénatom és R, R' jelentése a fent megadott.

Az olyan (I) képletű vegyületek, amelyek képletében [A] jelentése $-C(R^V, H)-C(H, R^{VIII})-$ általános képletű csoport, R^V és R^{VIII} jelentése $-CH_2-$ csoport, olyan (I) képletű vegyületekből állíthatók elő, amelyek képletében [A] jelentése $-C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})-$ általános képletű csoport, a szakirodalomban ismert, a ciklopropán-gyűrű kialakítására alkalmas reakcióval, például Simmons-Smith-reakcióval vagy ennek analógiáival [*J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4256 (1959); *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5813 (1981)] állíthatók elő, vagy olyan (I) képletű vegyületekből, amelyek képletében A jelentése $-CH=CH_2-$ képletű csoport és R'' jelentése hidrogénatom, etil-diazoacetáttal végzett reakcióval állíthatók elő. Az olyan (I) képletű vegyületek, amelyek képletében [A] jelentése $-C(R^V, H)-C(H, R^{VIII})-$ általános képletű csoport és R^V és R^{VIII} jelentése oxigénatom, olyan (I) képletű vegyületekből állíthatók elő, amelyek képletében [A] jelentése $-C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})-$ általános képletű csoport, a szakirodalomban ismert, epoxigyűrű kialakítására alkalmas reakciókkal, amelyet például dioxiránnal vagy analógiáival végzünk, ilyen ismertettek Yang és munkatársai [*J. Org. Chem.*, **60**, 3887-9 (1995)].

Az olyan (I) képletű vegyületek, amelyek képletében [A] jelentése $-C-C-$ képletű csoport, olyan (I) képletű vegyületekből állíthatók elő, amelyek képletében [A] jelentése $-C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})-$ általános képletű csoport vagy $-C\equiv C-$ képletű csoport, a kettős vagy hármas kötések kialakítására vonatkozólag ismert redukciós reakciókkal, például katalitikus hidrogénezéssel.

Az olyan (I) képletű vegyületek, amelyek képletében R'' jelentése $-CONHOH$ képletű csoport, olyan (I) képletű vegyületekből kiindulva állíthatók elő, amelyek képletében R'' jelentése $-COOH$ képletű csoport, a szakirodalomban hidroxámsavak előállítására ismert eljárásokkal, például O-benzilhidroxil-amín és kondenzálószeres reakciójával [De Luca és munkatársai, *J. Org. Chem.*, **66**, 2534 (2001)], katalitikus hidrogénezéssel vagy O-trimetilszililhidroxil-aminnal, majd deszililezéssel.

Az olyan (I) képletű vegyületek, amelyek képletében R'' jelentése $-CONH-$ aril képletű csoport, olyan (I) képletű vegyületekből állíthatók elő, amelyek képletében R'' jelentése $-COOH$ képletű csoport, a szakirodalomban az amidok szintézisére ismert eljárásokkal, ilyen ismertettek például Sangman és munkatársai retinasav-amidokra vonatkozóan [*Synth. Commun.*, **28**, 2945-58 (1998)].

Az olyan (I) képletű vegyületek, amelyek képletében R'' jelentése $-CH_2OH$ képletű csoport, olyan (I) képletű vegyületekből kiindulva állíthatók elő, amelyek képletében R'' jelentése $-COOH$ képletű csoport, észtereikből vagy egyéb származékaikból a szakirodalomban alkoholok előállítására ismert eljárásokkal, például

LiAlH₄-gyel végzett redukcióval.

1. példa

4-[3-(1-Adamantil)-4-terc-butildimetilsziloxifenil]benzaldehyd előállítás

A cím szerinti vegyületet az 1. reakcióvázlatban ismertetett eljárás szerint állítjuk elő.

1,56 g (3,70 mmol) 4-terc-butildimetilsziloxi-3-(1-adamantil)-brómbenzolt [Charpentier és munkatársai, *J. Med. Chem.*, **38**, 4993-5006 (1995)] oldunk 7,5 ml toluolban. 3,7 ml 2 mol/l-es vizes nátrium-karbonát-oldatot, 0,128 g (0,11 mmol) tetrakisz-trifenilfoszfin-palládiumot és 610 mg (4,07 mmol) 4-formilbenzoborsav 1,73 ml etanolal készült oldatát adjuk hozzá. Az így kapott oldatot 2 órán át nitrogénáramban visszafolyató hűtő alatt forraljuk. Ezután az oldatot lehűtjük, etil-acetátban felvesszük és telített nátrium-klorid-oldattal moszuk.

A fázisokat elválasztjuk, a szerves fázist szűrjük, nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük, ismét leszűrjük, az oldószert bepároljuk, és a visszamaradó anyagot szilikagélen gyorskromatográfiának vetjük alá (Merck) eluensként 3:1 hexán:etil-acetát elegye alkalmazásával.

1,09 g cím szerinti vegyületet állítunk elő. Op.: 158 °C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,37 (6H, s, -Si(CH₃)₂), 1,05 (9H, s, -t-Bu), 1,78 (6H, s, 6Ad.), 2,09 (3H, s, 3Ad.), 2,15 (6H, s, 6Ad.), 6,88 (1H, d, 1Ar, J=8,54 Hz), 7,35 (1H, dd, 1Ar, J=2,24 Hz, J=8,54 Hz), 7,51 (1H, d, 1Ar, J=2,24 Hz), 7,70 (2H, d, 2Ar, J=8,14 Hz), 7,90 (2H, d, 2Ar, J=8,14 Hz), 10,01 (1H, s, -CHO).

2. példa

Metil-E-4-[3-(1-adamantil)-4-terc-butildimetilsziloxifenil]cinnamát előállítás

A cím szerinti vegyületet a 2. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

386 mg (0,864 mmol) 4-[1-terc-butildimetilsziloxi-2-(1-adamantil)fenil]benzaldehydet 4,5 ml kloroformban oldunk, 298 mg (0,864 mmol) metil-trifenilfoszforanilidén-acetátot adunk hozzá, és az így kapott oldatot 3 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. Az oldatot lehűtjük, az oldószert eltávolítjuk, majd gyorskromatográfiának vetjük alá szilikagélen (Merck) eluensként 1:1 arányú hexán:diklórmétán elegye alkalmazásával. 350 mg cím szerinti vegyületet állítunk elő. Op.: 148 °C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,36 (6H, s, -Si(CH₃)₂), 1,05 (9H, s, -t-Bu), 1,77 (6H, s, 6Ad.), 2,08 (3H, s, 3Ad.), 2,15 (6H, s, 6Ad.), 3,80 (3H, s, -OCH₃), 6,44 (1H, d, -CH=, J=16,07 Hz), 6,86 (1H, d, 1Ar, J=8,54 Hz), 7,30 (1H, dd, 1Ar, J=2,24 Hz, J=8,54 Hz), 7,47 (1H, d, 1Ar, J=2,24 Hz), 7,50-7,70 (4H, m, 4Ar), 7,71 (1H, d, CH=, J=16,07 Hz).

3. példa

Metil-E-4-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]cinnamát előállítás

A cím szerinti vegyületet a 3. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

1 g (2,6 mmol) 2-(1-adamantil)-4-(4-brómfenil)fenolt, 358 mg (4,16 mmol) metil-akrilátot, 5,8 mg (0,02 mmol) palládium-acetátot és 30 mg (0,1 mmol) tri(o-tolil)-foszfit 1,2 ml trietil-aminban visszafolyató hűtő alatt forralunk 4 órán át. A trietil-amint elpárologtatjuk, 2 n sósavoldatban és etil-acetátban felvesszük, a szerves fázisokat elválasztjuk, vízzel mossuk, nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük, és az oldószert bepároljuk. 640 mg terméket állítunk így elő. Op.: >240 °C.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,75 (6H), 2,1 (9H), 3,72 (s, 3H, OCH₃), 6,63 (d, 1H, J=16 Hz), 6,85 (dd, 1H, J=8,8, 1,8 Hz), 7,3-7,4 (2H, aromás), 7,55-7,85 (5H), 9,55 (s, 1H, OH).

4. példa

E-4-[3-(1-Adamantil)-4-hidroxiifenil]fabéjsav előállítása [ST 1926]

A cím szerinti vegyületet a 4. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

42 mg (1 mmol) LiOH-H₂O-t oldunk 8,2 ml 1:1 arányú tetrahydrofuran: víz elegyben, 100 mg (0,2 mmol) metil-E-4-[3-(1-adamantil)-4-terc-butildimetilszililoxifenil]cinnamátot adunk hozzá, és az így kapott oldatot szobahőmérsékleten 3 órán át keverjük. A tetrahydrofuránt elpárologtatjuk, 2 n sósavoldattal savanyítjuk, etil-acetáttal extraháljuk, és nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük. Leszűrjük és bepároljuk, ezután gyorskromatográfiának vetjük alá szilikagélén (Merck) eluensként 2:3 arányú, majd 1:1 arányú hexán:etil-acetát elegy alkalmazásával. 55 mg terméket állítunk elő. Op.: >240 °C. R_f= 0,50 (Merck szilikagél 60F₂₅₄, etil-acetát).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,74 (6H, s, 6Ad.), 2,04 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.), 6,51 (1H, d, -CH=, J=16,18 Hz), 6,85 (1H, d, 1Ar, J=8,82 Hz), 7,30-7,40 (2H, m, 2Ar), 7,55-7,63 (3H, m, 2Ar+CH=), 7,70 (2H, d, 2Ar, J=8,09 Hz), 9,54 (1H, s, -OH), 12,34 (1H, brs, -COOH).

MS (m/z): 374 (M⁺, 100).

5. példa

Metil-4-[3-(1-adamantil)-4-metoxifenil]propiolát előállítása

A cím szerinti vegyületet az 5. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

301 mg (1,26 mmol) metil-4-brómfenilpropiolátot oldunk 2,5 ml toluolban, majd 1,34 ml 2 mol/l-es vizes nátrium-karbonát-oldatot, majd 43,7 mg Pd-tetrakis(trifenilfoszfint) és ezután 398 mg (1,39 mmol) 3-(1-adamantil)-4-metoxifenilbórsavat adunk hozzá, és a keveréket visszafolyató hűtő alatt forraljuk 3 órán át. A nyersterméket etil-éterben felvesszük, a szerves fázist telített nátrium-klorid-oldattal mossuk, nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük, szárazra pároljuk, így 570 mg nyersterméket állítunk elő. Gyorskromatográfiának vetjük alá szilikagélén (Merck) eluensként 2:1 arányú hexán:etil-acetát alkalmazásával, így 15 mg tiszta terméket állítunk elő. Op.: 175 °C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3,86 (s, 3H, OCH₃), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 6,96 (d, 1H, J=8,5), 7,43 (dd, 1H, J=2,2, 8,5), 7,47 (d, 1H, J=2,2), 7,55-7,70 (4H, aromás).

6. példa

4-[3-(1-Adamantil)-4-metoxifenil]propiolinsav előállítása [ST 1879]

A cím szerinti vegyületet a 6. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

15 mg (0,0374 mmol) metil-E-4-[3-(1-adamantil)-4-metoxifenil]propiolátot oldunk 2,14 ml 0,7 n metanolos nátrium-hidroxid-oldatban, és a keveréket egy órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. A metanol elpárologtatjuk, vízben felvesszük és 6 n sósavoldattal savanyítjuk, majd etil-éterrel extraháljuk. Nátrium-szulfáton vízmentesítjük, majd az oldószert elpárologtatjuk, a visszamaradó anyagot hexánnal mossuk, így szűrés után 10 mg terméket állítunk elő. Op.: 156 °C. R_f= (Merck szilikagél 60F₂₅₄, etil-acetát/metanol 2:1). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,70 (s, 6H), 2,10 (s, 9H), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 7,05 (d, 1H, J=8,4, H-6), 7,40 (d, 1H, J=2, H-2'), 7,45-7,60 (3H, aromás), 7,65 (2H, aromás).

7. példa

E-4-[3-(1-Adamantil)-4-metoxifenil]cinnamil-alkohol előállítása

A cím szerinti vegyületet a 7. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

375 µl 1 mol/l-es tetrahydrofuranos LiAlH₄-oldatot (0,365 mmol) adunk 5 ml vízmentes tetrahydrofuranhoz. Jeges fürdőn hűtjük és közben 151 mg (0,375 mmol) 19. példa szerinti metil-E-4-[3-(1-adamantil)-4-metoxifenil]cinnamátot adunk hozzá. Ezután a hidegben egy órán át, majd szobahőmérsékleten

egy éjszakán át keverjük. Jégfürdőn lehítve 5 ml vizes 10%-os ammónium-klorid-oldatot adunk hozzá, a tetrahydrofuránt elpárologtatjuk, majd etil-acetáttal felvesszük. A szerves fázist elválasztjuk és nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük. Az oldószer elpárologtatásával 126 mg nyersteget állítunk elő, amelyet szilikagélen (Merck) kromatografálunk eluensként 3:1 arányú metilén-klorid:hexán eleggyel, majd 28:72 arányú hexán:etil-acetát eleggyel. Így 11 mg terméket állítunk elő. Op.: 148 °C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,75 (s, 6H), 2,15 (9H), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 4,38 (dd, 2H, J=6, 1,6), 6,41 (dt, 1H, J=6, 1,6, =CHCH₂OH), 6,67 (dd, 1H, J=1,6, 1,6, arilCH=), 6,96 (d, 1H, J=8,3, H-6'), 7,42 (dd, 1H, J=2,2, 8,3, H-5), 7,45 (m, 2H, H-2, H-6), 7,48 (d, 1H, J=2,2, H-3'), 7,55 (m, 2H, H-3, H-5).

MS m/z: 374 (M⁺).

8. példa

Metil-E-4-(4-hidroxifenil)cinnamát előállítás

A cím szerinti vegyületet a 8. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

2 g (8,03 mmol) 4-(4-brómfenil)fenol, 1,1 g (12,8 mmol) metil-akrilát, 18 mg (0,08 mmol) palládium-acetát és 94 mg (0,31 mmol) tri(o-tolil)foszfin 3,7 ml trietil--aminnal készült keverékét 6 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. További 6 mg palládium-acetátot és 30 mg tri(o-tolil)foszfit adunk hozzá, és egy órán át hevítjük, majd további 30 mg palládium-acetátot és 94 mg di-tri(o-tolil)-foszfit adunk hozzá és 3,5 órán át hevítjük. Ezután a reakcióelegyet 6 mol/l-es sósavoldattal savanyítjuk, etil-acetátot adunk hozzá, és a csapadék feloldódásához szükséges ideig keverjük, majd a fázisokat elválasztjuk, a szerves fázist nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük, és az oldószer elpárologtatjuk. 934 mg nyersteget tisztítunk oly módon, hogy hexán/etil-éter elegyben felvesszük és leszűrjük, így 1,7 g cím szerinti terméket állítunk elő. Op.: 233-235 °C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3,70 (s, 3H, OCH₃), 6,13 (d, 1H, CH=, J=16), 6,82 (d, 2H, H-3', H-5'), 7,48 (d, 2H, H-2', H-6'), 7,6-7,75 (5H).

9. példa

Metil-E-4-[3-(1-metilciklohexil)-4-hidroxifenil]cinnamát előállítás

A cím szerinti vegyületet a 9. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

150 mg (0,6 mmol) metil-E-4-(4-hidroxifenil)cinnamátot és 68,5 mg 1-metil-1-ciklohexanol oldunk 1,2 ml metilén-kloridban, 0,032 ml koncentrált sósavval kezeljük, és a keveréket egy napon át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. Víz adunk hozzá, és a keveréket telített nátrium-bikarbonát-oldattal semlegesítjük. A vizes fázist néhányszor etil-acetáttal extraháljuk, nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük, szűrjük és bepárologjuk. A képződött nyersteget szilikagélen (Merck) gyorskromatográfiának vetjük alá eluensként 9:1 arányú hexán:etil-acetát elegy alkalmazásával. Így 20 mg terméket állítunk elő.

¹H-NMR (aceton-d₆) δ: 1,43 (3H, s, -CH₃), 1,4-1,9 (8H, m, ciklohex), 2,3-2,45 (2H, m, ciklohex), 3,80 (3H, s, -OCH₃), 6,60 (1H, d, CH=, J=16,18 Hz), 7,0 (1H, d, 1Ar, J=8,2 Hz), 7,44 (1H, dd, 1Ar, J=8,2 Hz, 2,2 Hz), 7,65 (1H, d, 1Ar, J=2,2 Hz), 7,7-7,85 (5H, m, 4Ar+CH=), 8,65 (1H, s, -OH).

10. példa

2-(1-Adamantil)-4-bróm-6-(N-fialimidometil)-fenol előállítás

A cím szerinti vegyületet a 10. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

500 mg (1,63 mmol) 2-adamantil-4-brómfenol 7 ml diklórmétánnal készült oldatához 289 mg (1,63 mmol) N-hidroximetilfialimidet és két csepp koncentrált kénsavat adunk. A keveréket 3 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk, vízzel hígítjuk, és diklórmétánnal extraháljuk. Az oldószer elpárologtatjuk, és

szilikagélen kromatográfiát végzünk eluensként 80:20 arányú hexán:etil-acetát elegy alkalmazásával, így 348 mg terméket kapunk 46%-os kitermeléssel. Op.: 253 °C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,78 (6H, s, 6Ad.), 2,09 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.), 4,76 (2H, s, -CH₂-), 7,28 (1H, d, 1Ar, J=2,94 Hz), 7,45 (1H, d, 1Ar, J=2,94 Hz), 7,76 (2H, dd, 2Ar, J=2,94 Hz, J=5,52 Hz), 7,88 (2H, dd, 2Ar, J=2,94 Hz, J=5,52 Hz), 8,13 (1H, s, -OH).

11. példa

Metil-E-4-[3-(1-adamantil)-5-(N-ftálimidometil)-4-hidroxifenil]cinnamát előállítás

A cím szerinti vegyületet a 11. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

100 mg 2-(1-adamantil)-4-bróm-6-(N-ftálimidometil)-fenolt szuszpendálunk 1,6 ml dioxánban nitrogén-áramban, 59,7 mg bór(biszpinakolat)-ot, 63 mg vízmentes kálium-acetátot, 5 mg diklór(difenilfoszfinferrocén)-palládiumot és 103 mg metil-4-brómcinnamátot adunk hozzá. Ezt két órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk, majd etil-acetátban újra szuszpendáljuk, 1 ml 2 mol/l-es sósavoldattal savanyítjuk, a szerves fázist telített nátrium-klorid-oldattal mossuk, nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük, az oldószert elpárologtatjuk és szilikagélen kromatográfiát hajtunk végre 65:35 arányú hexán:etil-acetát elegy alkalmazásával. Így 32 mg terméket állítunk így elő 27%-os kitermeléssel. Op.: 216 °C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,78 (6H, s, 6Ad.), 2,09 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.), 3,83 (3H, s, -OCH₃), 4,90 (2H, s, -CH₂-), 6,44 (1H, d, CH=, J=16,18 Hz), 7,45-7,90 (11H, m, 10Ar+CH=), 8,22 (1H, s, -OH).

MS (m/z): 547 (M⁺, 100), 400 (30), 160 (30).

12. példa

E-4-[3-(1-Adamantil)-5-(N-ftálimidometil)-4-hidroxifenil]fahéjsav előállítás

A cím szerinti vegyületet a 12. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

1 ml 3:1 arányban ecetsavat és 37%-os sósavoldatot tartalmazó elegyhez 30 mg metil-E-4-[3-(1-adamantil)-5-(N-ftálimidometil)-4-hidroxifenil]cinnamátot adunk, és a keveréket 30 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. Az ecetsavat elpárologtatjuk, majd vízzel felvesszük, és a visszamaradó szilárd anyagot szűrjük és vízzel mossuk. 24 mg terméket állítunk így elő. Op.: 216 °C.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,73 (6H, s, 6Ad.), 2,04 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.), 4,81 (2H, s, -CH₂-), 6,45 (1H, d, -CH=, J=16,18 Hz), 7,07 (1H, d, 1Ar, J=1,84 Hz), 7,30 (1H, d, 1Ar, J=1,84 Hz), 7,46 (2H, dd, 2Ar, J=8,82 Hz, J=1,84 Hz), 7,53 (1H, d, -CH=, J=16,18 Hz), 7,64 (2H, dd, 2Ar, J=8,82 Hz, J=1,84 Hz), 7,78-7,94 (4H, m, 4Ar), 8,60 (1H, s, -OH), 12,5 (1H, brs, COOH).

MS (m/z): 533 (M⁺, 100), 386 (40), 160 (60), 130 (50).

13. példa

E-4-[3-(1-Adamantil)-5-(aminometil)-4-hidroxifenil]fahéjsav előállítás

A cím szerinti vegyületet a 13. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

20 mg E-4-[3-(1-adamantil)-5-(N-ftálimidometil)-4-hidroxifenil]fahéjsavat szuszpendálunk 0,15 ml metanolban, 0,013 ml hidrazin-hidrátot adunk hozzá, és a keveréket 5 órán át 50 °C-on hevítjük. Az oldószert elpárologtatjuk, vízzel újra szuszpendáljuk, 2 mol/l sósavoldattal savanyítjuk, és a csapadékot vákuumban leszűrjük. A nyersterméket megszáritjuk, tetrahidrofuránnal kezeljük a ftalilhidrazid oldása céljából, majd szűrjük. Op.: 195 °C.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,73 (6H, s, 6Ad.), 2,04 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.), 4,00 (2H, s, -CH₂-), 6,45 (1H, d, -CH=, J=16,18 Hz), 7,07-8,00 (5H, m, 5Ar).

14. példa

4-[7-Adamantan-1-il-benzo(1,3)dioxol-5-il]benzaldehyd előállítása

A cím szerinti vegyületet a 14. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

0,875 g (2,61 mmol) 4-adamantan-1-il-6-brom-benzo(1,3)dioxolt oldunk 5,2 ml toluolban és 2,6 ml 2 mol/l vizes nátrium-karbonát-oldatot, 0,090 g (0,08 mmol) tetrakisz-trifenilfoszfin-palládiumot, továbbá 0,430 g (2,87 mmol) 4-formilbenzolbórsav 1,2 ml etanollal készült oldatát adjuk hozzá. Ezt 7 órán át nitrogén-áramban visszafolyató hűtő alatt forraljuk. Lehűtjük, etil-acetátban felvesszük és telített nátrium-klorid-oldatban mossuk. A szerves fázist nátrium-szulfát töltött vízmentesítjük, leszűrjük és az oldószert elpárologtatjuk. Szilikagélen (Merck) gyorskromatográfiát hajtunk végre eluensként 9:1 arányú hexán:etil-acetát elegye alkalmazásával, így 0,66 g terméket állítunk elő 70%-os kitermeléssel.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,80 (6H, s, 6Ad.), 2,09 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.), 6,02 (2H, s, -CH₂-), 7,01 (1H, d, 1Ar, J=1,86 Hz), 7,04 (1H, d, 1Ar, J=1,86 Hz), 7,68 (2H, d, 2Ar, J=8,19 Hz), 7,92 (2H, d, 2Ar, J=8,19 Hz), 10,02 (1H, s, -CHO).

15. példa

Metil-E-4-[7-Adamantan-1-il-benzo(1,3)dioxol-5-il]cinnamát előállítása

A cím szerinti vegyületet a 15. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

300 mg 4-(7-adamantan-1-il-benzo(1,3)dioxol-5-il)benzaldehyd 4,5 ml kloroformmal készült oldatát nitrogén légtérben 278 mg metil-trifenilfoszforamilidénacetáttal kezeljük és 5 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk, majd 3 óra elteltével további (20%) illidet adunk hozzá. Ezen időtartam végén az oldószert elpárologtatjuk, és a visszamaradó anyagot szilikagélen kromatografáljuk eluensként 45:55 arányú hexán:diklórmetán elegy alkalmazásával, 298 mg terméket állítunk így elő. Op.: 205 °C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,72 (6H, s, 6Ad.), 2,06 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.), 3,80 (3H, s, -OCH₃), 5,97 (2H, s, -CH₂-), 6,44 (1H, d, CH=, J=16 Hz), 6,95 (1H, d, 1Ar, J=1,86 Hz), 6,98 (1H, d, 1Ar, J=1,86 Hz), 7,52-7,58 (4H, m, 4Ar), 7,71 (1H, d, -CH=, J=16 Hz).

16. példa

E-4-[7-Adamantan-1-il-benzo(1,3)dioxol-5-il]fahéjsav előállítása

A cím szerinti vegyületet a 16. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

200 mg (0,48 mmol) metil-E-4-(7-adamantan-1-il-benzo(1,3)dioxol-5-il)cinnamátot szuszpendálunk 25 ml 3:2 arányú tetrahydrofurán/víz eleggyel készült LiOH·H₂O oldatban, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük. A tetrahydrofuránt elpárologtatjuk, a karboxilátos szuszpenziót hexánnal mossuk, majd 2 n sósav-oldattal megsavanyítjuk és jeges fürdőn lefagyaszttjuk. Szűrés után 150 mg terméket állítunk elő 78%-os kitermeléssel. Op.: >300 °C.

R_f = 0,59 (Merck szilikagél 60F₂₅₄, etil-acetát/hexán 9:1).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,72 (6H, s, 6Ad.), 2,01 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.), 6,01 (2H, s, -CH₂-), 6,52 (1H, d, -CH=, J=16,18 Hz), 6,99 (1H, d, 1Ar, J=1,84 Hz), 7,14 (1H, d, 1Ar, J=1,84 Hz), 7,60 (1H, d, -CH=, J=16,18 Hz), 7,62 (2H, dd, 2Ar, J=8,46 Hz, 1,84 Hz), 7,68 (2H, dd, 2Ar, J=8,46 Hz, 1,84 Hz).

17. példa

Metil-2-{4-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]}ciklopropánkarboxilát előállítása

A cím szerinti vegyületet a 17. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

150 mg (3-adamantan-1-il-4'-vinilbifenil-4-oxi)terc-butildimetilszilán – amelyet a megfelelő aldehidből

Wittig-reakcióval állítottunk elő – 2 ml diklórometánnal készült oldatához 0,5 mg ródiium-tetraacetát-bihidrátot és 36 µl etil-diazoacetátot adunk. A reakcióelegyet 5 napig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, és összesen 5 mg katalizátort és 10 µl etil-diazoacetátot adunk hozzá. A katalizátort Celiten leszűrjük, nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük, bepároljuk, szilikagélen kromatografáljuk 65:35 arányú hexán:etil-acetát eleggyel.

43 mg terméket állítunk így elő, amely a két diasztereoizomer, a cisz- és transz-izomerek keveréke.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,45 (6H, s, -Si(CH₃)), 0,95 (3H, t, -CH₃, J=7 Hz), 1,1 (9H, s, tBu), 1,25 (3H, t, -CH₃, J=7 Hz), 1,35-1,55 (1H, m, 1 -CH₂), 1,55-1,74 (1H, m, 1 -CH₂), 1,79 (6H, s, 6Ad.), 2,48-2,65 (1H, m, -CH-Ar), 3,85 (2H, q, -OCH₂, J=7 Hz), 4,18 (2H, q, -OCH₂, J=7 Hz), 6,82 (1H, dd, 1Ar, J=1,84 Hz, 8,46 Hz), 7,15 (1H, d, 1Ar, J=8,46 Hz), 7,25 (2H, dd, 2Ar, J=8,0 Hz, 1,84 Hz), 7,45-7,50 (3H, m, 3Ar).

18. példa

2-{4-[3-(1-Adamantil)-4-hidroxifenil]}ciklopropánkarbonsav cisz- és transz-izomerének előállítása

A cím szerinti vegyületet a 18. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

110 mg metil-2-{4-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]}ciklopropánkarboxilát 4,4 ml dimetoxietánnal készült oldatához 113 mg finomra zúzott Al₂O₃-ra felvitt kálium-fluoridot (40%) adunk, és szobahőmérsékleten két napig keverjük. Szűrés után az oldószert elpárologtatjuk, a nyersterméket 63 mg LiOH-H₂O 12,4 ml 50%-os vizes tetrahidrofuránnal készült oldatához adjuk. Ezt szobahőmérsékleten három napig keverjük, az oldószert elpárologtatjuk, etil-éterrel extraháljuk, 2 mol/l sósav-oldattal megsavanyítjuk és etil-acetáttal extraháljuk. Bepárlás után 58 mg terméket kromatografálunk szilikagélen 40:60 arányú hexán:etil-acetát eleggyel. Így 6 mg transz-2-{4-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]}ciklopropánkarbonsavat, olvadáspontja 190 °C, 10 mg diasztereoizomer keveréket és 20 mg cisz-2-{4-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]}ciklopropánkarbonsavat állítunk elő. Op.: 204 °C.

R_f = 0,23 cisz; 0,44 transz (Merck szilikagél 60F₂₅₄, etil-acetát:hexán 6:4)

¹H-NMR (MeOD) δ: transz: 1,45-1,50 (1H, m, 1 -CH₂), 1,60-1,65 (1H, m, 1 -CH₂), 1,95-2,0 (7H, m, -CH-COOEt + 6Ad), 2,2 (3H, s, 3Ad.), 2,35 (6H, s, 6Ad.), 2,50-2,58 (1H, m, -CH-Ar), 6,84 (1H, d, 1Ar, J=8,46 Hz), 7,24 (2H, dd, 2Ar, J=7,35 Hz, J=1,84 Hz), 7,31 (1H, dd, 1Ar, J=8,46 Hz, 2,57 Hz), 7,42 (1H, d, 1Ar, J=2,57 Hz), 7,52 (2H, dd, 2Ar, J=7,35 Hz, J=1,84 Hz).

¹H-NMR (MeOD) δ: cisz: 1,40-1,50 (1H, m, 1 -CH₂), 1,70-1,75 (1H, m, 1 -CH₂), 1,95-2,0 (6H, s, 6Ad), 2,10-2,15 (4H, m, 3Ad + -CH-COOH), 2,30 (6H, s, 6Ad.), 2,70-2,78 (1H, m, -CH-Ar), 6,83 (1H, d, 1Ar, J=8,46 Hz), 7,30 (1H, dd, 1Ar, J=8,46 Hz, 2,57 Hz), 7,38 (2H, dd, 2Ar, J=7,30 Hz, J=1,84 Hz), 7,42 (1H, d, 1Ar, J=2,57 Hz), 7,49 (2H, dd, 2Ar, J=7,30 Hz, J=1,84 Hz).

MS (m/z): 388 (M⁺, 100), 135 (50).

19. példa

Metil-E-4-[3-(1-adamantil)-4-metoxifenil]cinnamát előállítása

A cím szerinti vegyületet a 19. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

66 mg (2,74 mmol) 60% ásványi olajban lévő nátrium-hidrid 3,3 ml dimetilformamiddal készült szuszpenziójához nitrogén légtérben 969 mg (2,49 mmol) metil-E-4-[3-(1-adamantil)-4-hidroxicinnamátot adunk. A keveréket szobahőmérsékleten egy órán át keverjük, majd 186 µl (2,99 mmol) metil-jodidot csepepentünk hozzá.

A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán át állni hagyjuk, 80 ml hideg vizet adunk hozzá, majd a vizes fázist 4x60 ml diklórometánnal extraháljuk. A szerves rétegeket vízzel mossuk, nátrium-szulfát fölött vízmentesítjük és az oldószert elpárologtatjuk. Így 972 mg terméket állítunk elő 97%-os kitermeléssel.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,75 (6H, s, 3H, OCH₃), 2,1 (9H, s, 3H, -COOCH₃), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, -COOCH₃), 6,40 (d, 1H, CH=, J=16 Hz), 6,90 (d, 1H, 1 Ar, J=8,8 Hz), 7,35 (dd, 1H, 1Ar, J=8,8, 1,8 Hz), 7,42 (d, 1H, 1 Ar, J=1,8 Hz), 7,48-7,53 (m, 4H, 4 Ar), 7,65 (d, 1H, CH=, J=16 Hz).

20. példa

E-4-[3-(1-Adamantil)-4-metoxifenil]fahéjsav előállítás (ST 1898)

A cím szerinti vegyületet a 20. reakcióvázlat szerint állítjuk elő.

455 mg (10,8 mmol) LiOH·H₂O-t oldunk 90 ml 1:1 arányú tetrahidrofurán:víz elegyben. 873 mg (2,17 mmol) metil-E-4-[3-(1-Adamantil)-4-metoxifenil]cinnamátot adunk hozzá, és az így előállított oldatot szobahőmérsékleten két napig keverjük. A tetrahidrofuránt elpárologtatjuk, 2 n sósavoldattal megsavanyítjuk, és a képződött fehér csapadékot kiszűrjük. A szilárd anyagot etil-acetáttal és dietil-éterrel mossuk, így 792 mg cím szerinti vegyületet állítunk elő 94%-os kiemeléssel.

R_f = 0,28 (Merck szilikagél 60F₂₅₄, etil-acetát:hexán 9:1).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,74 (6H, s, 6Ad.) 2,04 (3H, s, 3Ad.), 2,12 (6H, s, 6Ad.) 3,75 (3H, s, -OCH₃), 6,50 (1H, d, -CH=, J=16 Hz), 6,98 (1H, d, 1Ar, J=8,8 Hz), 7,40-7,70 (7H, m, 6Ar = CH=), 12,3 (1H, brs, -COOH).

Az ST 1926 tumoros sejtvonalakkal szemben mutatott citotoxicitása

A citotoxicitási vizsgálatok kivitelezéséhez két akut promielocitás leukémia (APL) sejtvonalat használunk.

1. NB4 sejtvonal, amely a t(15;17) kromoszóma transzlokációt hordozza, ez generálja a PML/RAR α fúziós proteint. Ez a sejtvonal rendkívül érzékeny az ATRA gyógyászati dózísainak (10⁻⁷-10⁻⁶ mol/l) differenciáló hatására;

2. HL60 sejtvonal, amely az ATRA-ra kevésbé érzékenyen reagál, mint az NB4 sejtvonal. Ez a sejtvonal nem hordozza a fent említett kromoszóma transzlokációt.

Ezeket a sejtvonalakat 10% borjúembrió szérumot (FCS) és 1% glutamint tartalmazó RPMI 1640 közegben tartjuk.

Különböző szilárd tumorokból származó sejtvonalakat is használunk.

1. PC3 és DU145 humán prosztata karcinóma; ezeket a sejtvonalakat 10% FCS-t, 1% nátrium-piruvátot és 1% glutamint tartalmazó RPMI 1640 közegben tartjuk;

2. LoVo humán vastagbél adenokarcinóma; ezt a sejtvonalat 10% FCS-t és 1% glutamint tartalmazó HAM F-12 közegben tartjuk;

3. Humán petefészek karcinóma, például A2780 és A1780/Dx, amelyek a különböző hatóanyagokra (doxorubicin, taxol, etopozid, vinkrisztin) rendre érzékenyek vagy rezisztensek; IGROV-1 és IGROV-1/Pt, amelyek platina-alapú kemoterápiára rendre érzékenyek vagy rezisztensek, ezeket 10% FCS-t, 1% nátrium-piruvátot és 1% glutamint tartalmazó RPMI 1640 közegben tartjuk;

4. MeWo és MeS 2,21 humán melanóma, GBM glioblasztoma, nem-kissejtes A431, NCI-H460 tüdőkarcinómák, SAOS és U2OS csontkarcinómák, ezeket 10% FCS-t, 1% nátrium-piruvátot és 1% glutamint tartalmazó RPMI 1640 közegben tartjuk.

A citotoxicitás vizsgálatokat szuszpenzióban végezzük NB4 vagy HL-60 sejtek alkalmazásával (10 000/mérőhely). A sejteket 96 mérőhelyes tálcákon tenyésztjük, 250 μ l térfogatban és 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Következő nap növekvő koncentrációkban hozzáadjuk az ST 1926 vizsgálati vegyületet [(2E)-3-

-{3'(1-adamantil)-4'-hidroxil[1,1'-bifenil]-4-il}-2-propenoát/propánsav], és a sejteket további 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk 5% szén-monoxidot tartalmazó nedvesített légtérben. A harmadik napon a közeget eltávolítjuk a tálcá 1600xg értéken 10 percig végzett centrifugálásával és a felülúszót dekantáljuk. 250 µl PBS-t adunk hozzá, majd a tálcákat ismét 10 percig 1600xg értéken centrifugáljuk és a felülúszót dekantáljuk. A tálcákra 200 µl/mérőhely mennyiségben 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 közeget adunk és a tálcákat 37 °C-on további 48 órán át inkubáljuk. Az ötödik napon a tálcákat ismét 1600xg értéken 10 percig centrifugáljuk, és a közeget a tálcák megfordításával eltávolítjuk, majd 200 µl PBS és 50 µl hideg 80%-os TCA-t adunk hozzá. Ezután a tálcákat jégen inkubáljuk legalább egy órán át. A TCA-t megfordítással eltávolítjuk, a tálcákat háromszor mossuk oly módon, hogy desztillált vízbe merítjük és először papíron, majd forró levegősugárban megszáritjuk. Az összes mérőhelyre 200 µl 0,4%-os szulforodamin B-t adunk 1%-os ecetsav-oldatban. A tálcákat szobahőmérsékleten további 30 percig inkubáljuk. A szulforodamin B-t megfordítással eltávolítjuk, a tálcákat 1%-os ecetsavba háromszor belemerítve mossuk, majd először abszorbens papírral, majd forró levegősugárban megszáritjuk. A mérőhelyekre 200 µl 10 mmol/l-es trisz-bázist adunk, és a tálcákat legalább 20 percig keverjük. 540 nm-nél megmérjük az optikai sűrűséget Multiskan spektrofotométer alkalmazásával.

Megtapadó sejtek esetén az eljárást hasonló módon végezzük, de a harmadik napon a tálcák mosását megfordítással, majd PBS háromszori hozzáadásával és nem 1600xg értéken végzett centrifugálással végezzük. A felülúszót az ötödik napon a tálcák megfordításával eltávolítjuk.

A sejttúlélést ST 1926-tal végzett inkubálással határozzuk meg 24 órával és 48 órával a vegyület eltávolítása után. A termék 24 órás inkubálásával a sejtszaporodás koncentrációfüggő módon gátolható. Az 1. táblázatban az egyes vizsgált tumoros sejtvonalakra kiszámított IC₅₀ értékek láthatók (azaz az a termék koncentráció, amely a sejttúlélést 50%-ban gátolja). Az ST 1926 körülbelül 10 perc nagyobb citotoxicitást mutat az NB4 humán promielocita leukémiás tumoros sejtvonallal szemben (IC₅₀ = 0,022 µmol/l) az egyéb tumoros vonalakra nézve kiszámított értékhez viszonyítva.

I. táblázat

Az ST 1926 sejt citotoxicitása

Sejtvonal	IC ₅₀ (µmol/l)
Promielocitás leukémia	
NB4	0,02
HL-60	0,2
Prostata karcinóma	
PC3	0,21
DU145	0,10
Vastagbél karcinóma	
LoVo	0,24
Petefészek karcinóma	
A2780	0,10
A2780/Dx	0,20
IGROV-1	0,23
IGROV-1/Pt	0,33

Melanóma	
MeWo	0,23
MeS 2,21	0,23
Glioblasztoma	
GBM	0,18
Tüdőkarcinóma	
A431	0,25
NCI-H460	0,19
Csontkarcinóma	
SAOS	0,25
U2OS	0,26

9. példa

Az ST 1926 tumoros sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata

A találmányunk szerinti vegyületek a sejtciklus különböző fázisaira gyakorolt hatásának vizsgálata céljából cito-fluorometriás sejtciklus analízist végzünk.

HL60 vagy NB4 sejteket tenyésztünk tálcákon 150 000 sejt/ml sűrűségben 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 közegben, majd hozzáadjuk a vizsgálati vegyületet (ST 1926), 0,1% dimetil-szulfoxiddal szohubilizáljuk 0,01 $\mu\text{mol/l}$ és 0,1 $\mu\text{mol/l}$ közötti koncentrációban, optimálisnál kisebb ATRA-dózis jelenlétében vagy távollétében (5-10 nmol/l az NB4 esetén és 0,5 $\mu\text{mol/l}$ a HL60 esetén) sötétben, és a tenyésztőközeg cseréje nélkül három napra inkubátorba helyezzük.

A kezelés harmadik napján 500 000 sejtet gyűjtünk össze, 180xg értéken 5 percig centrifugáljuk, kalcium- és magnézium-mentes PBS-ben kétszer mossuk. A sejteket ($1 \times 10^6/\text{ml}$ fixáló) legalább egy órán át fixáljuk 1:4 térfogatarányú aceton/metanol tartalmú fixálókeverékben, -20 °C-on tartjuk 50%-os kalcium- és magnézium-mentes PBS-ben, majd a sejteket centrifugáljuk, kalcium- és magnézium-mentes PBS-ben mossuk, ismét centrifugáljuk és mossuk. A sejtsapadékot sötétben szobahőmérsékleten 30 percig inkubáljuk 200 μl propidium-jodáttal (100 $\mu\text{g/ml}$) és 200 μl RNS-ázzal (150 KU/mg).

A mintákat nyolonszűrőkön (60-80 μm átmérő) szűrjük és FACScan cito-fluoriméterrel (Becton Dickinson) analizáljuk, mintánként 20 000 eseményt határozunk meg 488 nm gerjesztési hullámhosszon és 620 nm kibocsátási hullámhosszon. A sejtciklus fázisok százalékos analizisét Modfit v. 2.0 (Becton Dickinson) dedikált szoftver csomag alkalmazásával végezzük.

A PC3 prosztata karcinóma sejtek sejtciklus analízise esetén a sejteket 500 000 sejt/ml sűrűségben tenyésztjük tálcákon RPMI közegben. ST 1926 vegyülettel 24 órán át kezeljük, majd a sejteket a fent ismertetett módon analizáljuk.

9/1 példa

Az ST 1926 NB4 humán promielocitás leukémia sejtek sejtciklusára gyakorolt hatásának vizsgálata

Az ST 1926-tal végzett kezelés NB4 sejtciklusra gyakorolt hatásának analízise (3 napon át) azt mutatja, hogy a találmányunk szerinti vegyület 0,08 $\mu\text{mol/l}$ és 0,1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban feltartóztatja a növekedést a

ciklus duplikációs S fázisában és apoptózist vált ki. A kapott eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

Az ST 1926 NB4 sejtciklusra gyakorolt hatása

Kezelés	GO/G1	S	G2+M	Apoptózis
Kontroll	53,4	35,5	11,1	26,6
ST 1926 0,01 $\mu\text{mol/l}$	48,4	38,8	12,8	19,9
ST 1926 0,02 $\mu\text{mol/l}$	48,2	39,4	12,4	28,4
ST 1926 0,04 $\mu\text{mol/l}$	51,3	35,7	13,0	33,9
ST 1926 0,08 $\mu\text{mol/l}$	41,4	53,6	5,0	45,0
ST 1926 0,1 $\mu\text{mol/l}$	50,6	46,1	3,3	53,6

9/2 példa

Az ST 1926 HL-60 humán promielocitás leukémia sejtek sejtciklusára gyakorolt hatásának vizsgálata

Az ST 1926-tal három napig végzett kezelés HL-60 sejtek sejtciklusára gyakorolt hatásának analízise azt mutatja, hogy 0,5 $\mu\text{mol/l}$ és 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációnál a sejtciklus nem mérhető, azonban a vegyület erős proapoptotikus hatást mutat.

Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat

Az ST 1926 HL-60 humán promielocitás leukémia sejtek sejtciklusára gyakorolt hatása

Kezelés	GO/G1	S	G2+M	Apoptózis
Kontroll	57,9	30,9	11,2	10,5
ST 1926 0,0025 $\mu\text{mol/l}$	54,9	33,4	11,7	8
ST 1926 0,005 $\mu\text{mol/l}$	53,4	34,4	12,2	14,0
ST 1926 0,01 $\mu\text{mol/l}$	52,0	35,4	12,6	12,5
ST 1926 0,05 $\mu\text{mol/l}$	45,0	42,0	13,0	13,0
ST 1926 0,1 $\mu\text{mol/l}$	39,9	46,8	13,3	27,5
ST 1926 0,5 $\mu\text{mol/l}$	n.e.	n.e.	n.e.	82
ST 1926 1 $\mu\text{mol/l}$	n.e.	n.e.	n.e.	86,5

9/3 példa

Az ST 1926 PC3 prosztata karcinóma sejtek sejtciklusára gyakorolt hatása

Az ST 1926-tal 24 órán át végzett kezelés PC3 sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata azt mutatja, hogy közvetlenül a kezelés végén a vizsgált vegyületek a vizsgált legnagyobb koncentrációban (0,4 $\mu\text{mol/l}$) apoptózist indukálnak. A sejtkenyérés után 24 órával a sejteket S fázisban akumuláljuk, 0,4 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációnál sejt apoptózist indukálnak.

Az eredményeket a 4. táblázatban mutatjuk be.

4. táblázat

Az ST 1926 PC3 humán prosztata karcinóma sejtek
sejtciklusára gyakorolt hatása

Kezelés	G0/G1	S	G2+M	Apoptózis
24 óra kezelés és 0 óra kinyerés				
Kontroll	54,8	24,6	20,6	8
ST 1926 0,02 $\mu\text{mol/l}$	54,0	24,2	21,8	9
ST 1926 0,05 $\mu\text{mol/l}$	55,8	23,6	20,6	11
ST 1926 0,1 $\mu\text{mol/l}$	52,0	35,4	28,0	10
ST 1926 0,2 $\mu\text{mol/l}$	n.v.	n.v.	n.v.	13,5
ST 1926 0,4 $\mu\text{mol/l}$	n.v.	n.v.	n.v.	25
24 óra kezelés és 24 óra kinyerés				
Kontroll	49,9	31,8	22,3	10,5
ST 1926 0,02 $\mu\text{mol/l}$	44,6	30,4	25,0	13
ST 1926 0,05 $\mu\text{mol/l}$	44,9	29,5	25,6	15
ST 1926 0,1 $\mu\text{mol/l}$	45,8	25,8	28,4	10
ST 1926 0,2 $\mu\text{mol/l}$	31,8	43,2	25,0	13
ST 1926 0,4 $\mu\text{mol/l}$	n.e.	n.e.	n.e.	26

ST 1926 TRAIL-lel alkotott kombinációjának *in vitro* citotoxikus aktivitása (tumornekrózis faktorral rokon apoptózis indukáló ligandum)

A TRAIL termelődésért a lymfociták a természetes gyilkos sejtekkel együtt felelősek (tumornekrózis faktorral rokon apoptózist indukáló ligandum), ez a TNF citokin család egyik tagja (tumornekrózis faktor). Ez a membrán protein apoptózist indukál a transzformált sejtek széles körében és az ezen család egyéb tagjaitól eltérően, nem látszik *in vitro* citotoxikusnak a normális sejtekre nézve. A TRAIL két halálos domént tartalmazó halálos receptorttal, a DR4-gyel és DR5-tel kölcsönhatásba lépve apoptózist indukál. Ezért a TRAIL-t tumor-szelektív, apoptózist indukáló citokinnek és a rákmegelőzés és -kezelés egy ígéretes új jelöltjének tekintik [Neoplasia, 6; 535-546 (2001)].

Az ST 1926 TRAIL-lel kombinált citotoxicitásának vizsgálatát két különböző tumoros sejtvonalon, úgymint M109 rágesáló tüdőkarzinóma és A2780/Dx többszörösen hatóanyag rezisztens humán petefészek karcinóma, vizsgáljuk. A sejteket 10% FCS-t, 1% nátrium-piruvátot és 1% glutamint tartalmazó RPMI 1640 közegben tartjuk.

A sejteket 96 mérőhelyes tálcákban 250 μl térfogatban tenyésztjük és 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk. A következő nap ST 1926 jelű vizsgálati vegyületet [(2E)-3-{3'-(1-adamantil)-4'-hidroxil[1,1'-bifenil]-4-il}-2-propenoát/propánsav] vagy TRAIL-t adunk növekvő koncentrációban, és a sejteket további 72 órán át 37 °C-on 5% szén-monoxidot tartalmazó nedvesített légtérben inkubáljuk. Az ötödik napon a felülírást a tálcák megfor-

ditásával eltávolítjuk. 200 µl PBS-t és 50 µl vizes 80%-os TCA-t adunk hozzá. A tálcákat ezután jégen legalább egy órán át inkubáljuk. A TCA-t megfordítással eltávolítjuk, a tálcákat háromszor mossuk oly módon, hogy desztillált vízbe merítjük és először papírral, majd forró levegősugárral megszáritjuk. Az összes mérőhelyhez 200 µl 0,4%-os szulforodamin B-t adunk 1%-os ecetsavban. A tálcákat szobahőmérsékleten további 30 percig inkubáljuk. A szulforodamin B-t megfordítással eltávolítjuk, a tálcákat 1%-os ecetsavba háromszor belemerítve mossuk, majd először abszorbens papírral, majd forró levegősugárral megszáritjuk. 200 µl 10 mmol/l trisz-bázist adunk a mérőhelyekre és a tálcákat legalább 20 percig keverjük. 540 nm-nél megmérjük az optikai sűrűséget Multiskan spektrofotométer alkalmazásával.

Az ST 1926 és TRAIL. közötti kölcsönhatást Drewinko és munkatársai analizésével határozzuk meg [Cancer Biochem. Biophys., 1;187-195 (1976)].

Az analizist az alábbiak szerint végezzük:

$$(SF_{a \times SFb} / S_{fa} + SFb) / 100,$$

ahol az SF_a az ST 1926 túlélési frakciója és az SF_b a TRAIL túlélési frakciója.

Az értékek az alábbi hatásokat jelzik:

A érték >1 szinergizmus, <1 antagonizmus, =1 nincs hatás.

Az ST 1926 mindkét sejtvonalban a TRAIL.-al szinergikus hatást mutat, ahogy az az 1. és 2. ábrán látható.

Az ST 1926 tumorelleses hatása M109 és 3LL rágesáló tüdőkarzinóma modelleken

Madison 109 rágesáló tüdőadenokarcinóma sejteket (M109) tartunk fenn s.c. tumor fragmens passzázs útján. Az oltás napján a sejtszuszpenziót i.m. injekcióban adjuk be egy 20 g-os hím BALB/c egér bal hátsó végtagjába 3×10^5 sejt/egér sűrűségben. 3LL rágesáló Lewis tüdőkarcinómát tartunk fenn szokásos módon 1×10^5 sejt/egér i.m. passzázs útján (minden 10-14. napon) C57BL/6J egerekben. A tumorelleses hatás vizsgálatokhoz tumorokat metszünk ki donor egerekből, és mechanikus deszegregáció és enzimés emésztés után a tumorsejtek életképességét tripán kék festék kizárásos vizsgálattal megbecsüljük. Ezután 1×10^5 sejt/100 µl/egér i.m. injekciót adunk be C57BL/6J egerek jobb hátsó végtag izmába.

Digitális mérőkörző (Vernier mérőkörző) alkalmazásával hetente kétszer megmérjük a tumor méretét azon naptól kezdve, amelyen annak tömege mérhetővé válik. A tumor tömegét a két fő térirány (hosszúság és szélesség) méretéből becsüljük meg és milliméterben fejezzük ki a $(\text{hosszúság} \times \text{szélesség}^2) / 2$ összefüggés alkalmazásával, amely a tumor térfogatát adja mm³-ben. Minden kísérleti csoportban kiszámítjuk a tumor térfogatának százalékos gátlását (TVI%) a kontrollhoz viszonyítva $[100 - (T/C\%)]$. A TVI értéket az ST 1926 beadása után két nappal számítjuk ki.

Meghatározzuk a közepes túlélési időt (MST), és a közepes élettartam növekedését ILS% (élettartam növekedése) értékben fejezzük ki, amelyet az $(MST_T / MST_C) \times 100 - 100$ összefüggés alapján számítjuk ki.

A TVI és a túlélési idő értékek közötti összehasonlítást mindegyik csoport esetén a nem-párosított adatok nem-parametrikus Mann Whitney tesztjével végezzük (Instat szoftver, GraphPad Inc.).

Az ST 1926 oldatot közvetlenül felhasználás előtt állítjuk elő, és 1:1 kremofor:etanol eleggyel szolubilizáljuk, majd 1:4 arányban hígítjuk pufferekt sóoldattal. Az állatok kezelését 10 ml/kg térfogatban végezzük. Az ST 1926 esetében a kezelési eljárás különböző dózisek öt egymást követő napon történő beadásából áll (qdx5), amelyet a tumoros sejttel történő beoltás utáni első napon kezdünk és három ciklusban megismétlünk.

Minden kezelés előtt az egereket lemérjük (minden csoportban 8 egér van), először is a beadandó anyag-mennyiség pontos meghatározása céljából, amely a hatóanyag beadási időtartam alatt észlelt egyenletes tömegváltozatokon alapul, továbbá a kezelés folyamán bekövetkező legnagyobb tömegveszteség meghatározása céljából (BWL% max).

Az eredményt az alábbi 5. táblázatban mutatjuk be. Az ST 1926 10 mg/kg p.o. dózisban és 15 mg/kg i.p. dózisban qdx5x3w kezelési előírás szerint beadva az M109 rágszáló tüdőtumороkat tartalmazó állatoknál a túlélés növekedését eredményezi, továbbá a tumor tömegének gátlását eredményezi.

Ezen túlmenően az ST 1926 10 mg/kg p.o. dózisban beadva növeli a 3LL-tumort tartalmazó egerek élet-tartamát és 65%-kal csökkenti a tumortérfogatot.

5. táblázat

Az ST 1926 tumorelles hatása (qdx5x3w) M109 rágszáló tüdőtumороkkal szemben

Kezelés	Dózis (mg/kg)	BWL% Max	MST (időszak napokban)	ILS%	TVI%
M109					
Kontroll	/	9	22(13-34)	/	/
ST 1926	10, i.p.	9	*28(25-35)	27	18
ST 1926	15, i.p.	10	**36(30-42)	64	*46
ST 1926	10, p.o.	10	**35(27-42)	59	*49
3LL					
Kontroll	/	3	21(15-33)	/	/
ST 1926	10, p.o.	7	*32(24-42)	52	***65

*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 kontrollal szemben (Mann-Whitney).

Az ST 1926 tumorelles hatása A2780 és A2780/Dx humán petefészek karcinóma modellen és NCI-H460 humán nem-kissejtes tüdőkarzinómán vizsgálva

A2780, A 2780/Dx humán petefészek karcinóma sejteket és NCI-H460 sejteket 10% FCS-t, 2 mmol/l glutamint és 50 µg/ml gentamicint tartalmazó RPMI 1640 közegben tartunk 37 °C-on 5% szén-monoxidot tartalmazó nedvesített légtérben. A sejteket tripszinnel kezeljük, teljes közegben összegyűjtjük, körülbelül 1100 perc⁻¹ fordulatszámra centrifugáljuk 10 percig és a csapadékot Hank 199 közeggel újra szuszpendáljuk, ezt a műveletet kétszer hajtuk végre. A sejteket Hank 199 közegben újra szuszpendáljuk 20x10⁶/ml sűrűségben és 0,1 ml térfogatot s.c. injektálunk (2x10⁶ sejt/egér) CD1 nu/nu 6 hetes nőstény egerek jobb oldali ágyékába.

Az ST 1926 oldatot közvetlenül felhasználás előtt állítjuk elő, és 1:1 kremofor:etanol eleggyel szolubilizáljuk, majd 1:4 arányban hígítjuk puffereit sóoldattal. Az állatok kezelését 10 ml/kg térfogatban végezzük. Az ST 1926 esetében a kezelési eljárás különböző dózisok öt egymást követő napon történő beadásából áll (qdx5), amelyet a tumoros sejttel történő beoltás utáni első napon kezdünk és három ciklusban megismétlünk.

Digitális mérőkörző (Vernier mérőkörző) alkalmazásával hetente kétszer megmérjük a tumor méretét azon naptól kezdve, amelyen annak tömege mérhetővé válik. A tumor tömegét a két fő ténirány (hosszúság és szélesség) méretéből becsüljük meg, milliméterben fejezzük ki a (hosszúság x szélesség²)/2 összefüggés alkalmazásával, amely a tumor térfogatát adja mm³-ben. Minden kísérleti csoportban kiszámítjuk a tumor térfogatá-

nak százalékos gátlását (TVI%) a kontrollhoz viszonyítva $[100-(T/C\%)]$. A TVI értéket az ST 1926 utolsó beadása után két nappal számítjuk ki.

Az egerek mérését addig folytatjuk, amíg a kontrollesoportban a tumorok tömege eléri a 2 g-ot, ezután az egereket nyaki diszlokációval leöljük.

A TVI értékek közötti összehasonlítást mindegyik csoportban nem-párosított adatok nem-parametrikus Mann Whitney tesztjével végezzük (Instat szoftver, GraphPad Inc.).

Minden kezelés előtt az egereket lemérjük, először is a beadandó anyagmennyiség pontos meghatározása céljából, amely a hatóanyag beadási időtartam alatt észlelt egyenletes tömegváltozatokon alapul, továbbá a kezelés folyamán bekövetkező legnagyobb tömegvesztés meghatározása céljából (BWL% max).

Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be. Az ST 1926 ebben az esetben is gátolja az A2780 humán petefészek adenokarcinómát, a többszörösen hatóanyag-rezisztens A2780/Dx humán petefészek adenokarcinómát és az NCI-H460 humán nem-kissejtes tüdőkarcinómát tartalmazó egerek tumortömegét 15-5 mg/kg dózistartományban qdx5x3w kezelési előírás szerint p.o. beadva.

6. táblázat

Az ST 1926 tumorelles hatása (qdx5x3w) A2780, A2780/Dx humán petefészek karcinómával és NCI-H460 nem-kissejtes tüdőkarcinómával szemben

Kezelés	Dózis (mg/kg)	BWL% Max	Pusztulás	TVI%±SE
A2780				
Kontroll	/	0	0/8	/
ST 1926	5, p.o.	3	0/8	*34±8
ST 1926	10, p.o.	5	0/8	*39±5
A2780/Dx				
Kontroll	/	0	0/8	/
ST 1926	10, p.o.	0	0/8	*34±3
ST 1926	15, p.o.	6	0/8	*54±9
NCI-H460				
Kontroll	/			
ST 1926	15, p.o.	4	0/8	*40±2

*P<0,05 kontrollal szemben

Az ST 1926 hatékonynak bizonyul p.o. 15 mg/kg dózishoz qdx4x3w előírás szerint beadva és taxol nélkül (15 mg/kg i.p. q7dx3 előírás szerint) beadva NCI-H460 nem-kissejtes tüdőkarcinómával szemben, ahogy ez a 7. táblázatban bemutatott adatokból látható.

7. táblázat

Az ST 1926 tumorelles hatása (qdx5x3w) NCI-H460 nem-kissejtes tüdőkarcinómával szemben taxollal és taxol nélkül (q7dx3)

Kezelés	Dózis (mg/kg)	BWL% max	Pusztulás	TVI%±SE
Kontroll	/	3	/	/
ST 1926	15, p.o.	14	0/8	**38±8
Taxol	15, i.p.	4	0/8	0
ST 1926+Tax	15, p.o. 15, i.p.	16	0/8	***56±6

**P<0,01 kontrollal szemben; P<0,05 ST 1926-tal szemben (Mann-Whitney)

Az ST 1926 jelentős tumorelles hatást mutat 15 mg/kg p.o. dózisban beadva qdx3x3w előírás szerint (ahogy az a 8. táblázatban látható).

8. táblázat

ST 1926 tumorelles hatása (qdx5x3w) NCI-H460 nem-kissejtes tüdőkarcinómával szemben

Kezelés	Dózis (mg/kg)	BWL% max	Pusztulás	TVI%±SE
Kontroll	/	3	/	/
ST 1926	15, p.o.	4	0/8	*52±7

**P<0,05 kontrollal szemben; (Mann-Whitney)

Az ST 1879 citotoxicitása marha mikrociklus endotélium (BMEC) sejtvonallal szemben

BMEC endotélium sejt vonalat használunk, amelyet előzőleg friss marha mellékveséből állítunk elő az alábbiak szerint. A mellékveséket az állatokból közvetlenül leölés után eltávolítjuk és jégen tároljuk a laboratórium megérkezéséig. A mellékveséket Betadin oldatban mossuk 5 percig steril körülmények között (Bio-Hazard lamináris áramban), majd 2 liter steril PBS-sel mossuk. Ezután a mellékveséket steril eldobható szikével körülbelül 2 mm-es darabokra vágjuk és PBS-t tartalmazó (30 ml/mellékvese) polisztirol Falcon csövekbe visszük át. 600 perc⁻¹ fordulatszámon centrifugáljuk 4 °C-os hűtött centrifugában és a felülúszót dekantáljuk. A csapadékot azonos térfogat (a csapadék térfogatára vonatkoztatva) 0,12%-os A kollagenázzal (Boehringer Mannheim) újra szuszpendáljuk és 37 °C-on 2 órán át inkubáljuk, közben keverjük. Egymás után 200 mesh, majd 100 mesh méretű szűrőkön (Sigma) szűrjük, és a felülúszót 15%-os DMEM FBS oldathoz adjuk a kollagenáz A hatásának gátlása céljából. Az oldatot 1000 perc⁻¹ fordulatszámon centrifugáljuk szobahőmérsékleten, és a csapadékot 20% FBS, 50 µg/ml marhaagy extraktumot (BBE), 50 µg/ml heparint (Sigma), 0,5 térfogat% gentamicint (Sigma), 1 térfogat% L-glutamint tartalmazó DMEM közegben újra szuszpendáljuk, és zselatinizált Petri-csészéken tenyészjük 1% zselatinnal (sertés zselatin Sigma). Az összefolyás elérésekor a sejteket endotélium markerekkel jellemezzük, mint a VIII faktor.

A citotoxicitás vizsgálatokat BMEC sejtek alkalmazásával végezzük. A sejteket 200 µl térfogatban tenyészjük 96 mérőhelyes tálcákon és 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk. A következő napon hozzáadjuk az ST

1879 vizsgálati vegyületet 200 $\mu\text{mol/l}$ és 1,56 $\mu\text{mol/l}$ közötti csökkenő koncentrációban. A sejteket további 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk 5% szén-dioxidot tartalmazó nedvesített légtérben. A harmadik napon a közeget a tálcák megforgatásával eltávolítjuk, és a harmadik napon a tálcákat négyszer mossuk oly módon, hogy megforgatjuk és 300 μl PBS-t adunk hozzá. Mosás után az előzőekben ismertetett, zselatínon történő szélesítéshez használt közeg 200 μl -ét adjuk hozzá. Az ötödik napon a közeget a tálcák megforgatásával eltávolítjuk, és a sejteket egy órán át hideg 15%-os TCA oldattal kezeljük. A mérőhelyeket a tálca vízbemerítésével és megforgatással történő eltávolítással háromszor mossuk. Mindegyik mérőhelyhez 200 μl 0,4%-os szulforodamin B-t adunk 1%-os ecetsavban. A tálcákat szobahőmérsékleten további 30 percig inkubáljuk. A szulforodamin B-t megforgatással eltávolítjuk, a tálcákat 1%-os ecetsavba történő merítéssel háromszor mossuk, majd először abszorbens papíron, majd forró levegősugárral megszáritjuk. Mindegyik mérőhelyhez 200 μl 10 mmol/l-es trisz-bázist adunk, és a tálcákat legalább 20 percig rázódni hagyjuk. 540 nm-nél meghatározzuk az optikai sűrűséget Multiskan spektrofotométer alkalmazásával.

A sejttúlélés meghatározásához a vegyület eltávolítása után ST 1879-cel inkubáljuk 24 óráig és 48 óráig. A termék 24 órán át végzett inkubálásával a sejt szaporodás koncentrációfüggő módon gátolható. Az 5. táblázatban bemutatjuk a kiszámított IC_{50} értékeket (a sejttúlélés 50%-os gátlásához szükséges termék koncentráció). Az ST 1879 gyenge, 105 $\mu\text{mol/l}$ citotoxicitást mutat és nem-toxikus koncentrációja 25 $\mu\text{mol/l}$, amelyet később az ST 1879 endotéliumsejt migrációra gyakorolt hatásának vizsgálatánál használunk, amelyet a 9. táblázatban mutatunk be.

9. táblázat

ST 1879 endotéliumsejtekkel szemben mutatott sejtcitotoxicitása

Sejtvonal	IC ₅₀ ±SD ($\mu\text{mol/l}$)	IC ₀
BMEC	105±14	25 $\mu\text{mol/l}$

Endotélium BMEC sejtek kemotaxisa

Az ST 1879 endotéliumsejt kemotaxisra gyakorolt hatásának vizsgálatához Boyden kamrát használunk, amely kamra két mérőhelyet tartalmaz, az egyik alulról, a másik felülről egy 8 μm meghatározott pórusméretű polikarbonát szűrővel van elválasztva. Az alsó mérőhelyre DMEM-ben 1%-os FBS kemoattraktáns faktort mérünk be, a felső mérőhelyre marha szubrenális mikrociklusos endotéliumsejteket (BMEC) mérünk be, amely sertés szérum albumintól mentes 1%-os zsírsavat tartalmazó DMEM-ben van szuszpendálva. Az ST 1879-nek a polikarbonát szűrőn át a kemoattraktáns faktor irányába történő sejtmigrációt gátló képességét a szűrő alsó oldalán jelenlévő sejtek számának megszámlálásával mennyiségileg meghatározzuk. A 8. táblázatban bemutatott százalékos migrációt a következő összefüggés alapján számítjuk ki:

$$(\text{kezelt} - \text{kontroll}/\text{kontroll}) \times 100$$

Az ST 1926 50 $\mu\text{mol/l}$ és 25 $\mu\text{mol/l}$ közötti koncentrációban gátolja a BMEC sejtek kemoattraktáns stimuláns FCS-sel szemben mutatott kemotaxisát, ahogy az a 10. táblázatban látható.

10. táblázat

A BMEC sejtek migrációjának ST 1879-cel indukált gátlása

Sejtvonal	Migráció %-os gátlása	
	50 $\mu\text{mol/l}$	25 $\mu\text{mol/l}$
BMEC	91% (6,1 sejt \pm 2,4 szemben a kontrollban lévő 72,1 \pm 7,4 sejttel)	42,7% (41,3 sejt \pm 10,2 szemben a kontrollban lévő 72,1 \pm 7,4 sejttel)

Az ST 1879-nek a HUVEC sejtek differenciálódására gyakorolt hatása matrigélen

Az endotéliumsejtek matrigélen végzett differenciálódási vizsgálatát elterjedten használják egy termék antiangiogén aktivitásának becslésére. A matrigél tumorokból származó újra felépített bazális membrán extraktum, amely főleg laminint és kollagén IV-t tartalmaz, amelyen az endotéliumsejtek a kapillárisokhoz hasonló háromdimenziós szerkezetekbe szerveződnek. A hálózat intenzitása a "csomópontok" mikroszkópos megszámlálásával mérhető, amelyeket az olyan metszéspontok alapján határozunk meg, ahol kettőnél több csőszerű szerkezet elágazik, vagy ez a kapilláris szerkezetek által elfoglalt százalékos terület kiszámítására alkalmas számítógépesített leképzőrendszerrel mérhető.

A matrigélt 24 mérőhelyes tálcákra helyezzük 4 °C-on (Becton-Dickinson) és egy inkubátorban 37 °C-on 30 percig hagyjuk gélesedni. A HUVEC humán köldökzsinór endotéliumsejteket (Clonetics) 500 μl tenyésztőközegben újrászuszpendáljuk 25 $\mu\text{mol/l}$ nem-toxikus ST 1879 koncentráció jelenlétében vagy távollétében és a matrigélen szélesztjük. 5 óra inkubálás után a sejteket PBS-sel készült 4%-os paraformaldehid oldatban fixáljuk. Az eredményeket az egységnyi területen lévő csomópontok számának mikroszkópos számlálásával határozzuk meg három egymástól független területen és a pozitív kontrollra vonatkoztatott százalékban fejezzük ki.

Az ST 1879 endotélium sejtek differenciálódásának 61%-os gátlását mutatja a matrigélen 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációnál, ahogy ez a 10. táblázatban látható.

11. táblázat

A HUVEC sejt differenciálódás ST 1879-cel indukált gátlása

Sejtvonal	A matrigélen bekövetkező differenciálódás százalékos gátlása
HUVEC	ST 1879 (25 $\mu\text{mol/l}$) = 61% (8,2 csomópont szemben a kontrollnál lévő 21,2 csomóponttal)

Az ST 1879 és az ST 1898 humán tumor sejtvonalakkal szemben mutatott celluláris citotoxicitása

A citotoxicitás vizsgálatokban 10% borjúembrió szérumot (FCS) és 1% glutamint tartalmazó RPMI 1640 közegben tartott NB4 humán akut promielocitás leukémia sejtvonalat használunk.

További két szilárd tumor sejtvonalat is használunk:

1. PC3 humán prosztata karcinóma; ezt a sejtvonalat 10% FCS-t, 1% nátrium-piruvátot és 1% glutamint tartalmazó RPMI 1640 közegben tartjuk;

2. LoVo humán vastagbél adenokarcinóma; ezt a sejtvonalat 10% FCS-t és 1% glutamint tartalmazó HAM F-12 közegben tartjuk.

A citotoxicitás vizsgálatokat mérőhelyenként 10 000 NB4 sejt alkalmazásával végezzük. A sejteket 96 mérőhelyes tálcákban 250 µl térfogatban tenyésztjük és 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk. A következő napon növekedő koncentrációkban hozzáadjuk az ST 1879 vizsgálati vegyületet, és a sejteket további 24 órán át 37°C-on inkubáljuk 5% szén-dioxidot tartalmazó nedvesített légtérben. A harmadik napon a közeget a tálca 1600xg értéken 10 percig végzett centrifugálásával eltávolítjuk, és a felülűszót dekantáljuk. 250 µl PBS-t adunk hozzá, majd a tálcákat ismét 1600xg értéken 10 percig centrifugáljuk és a felülűszót dekantáljuk. Mérőhelyenként 200 µl 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 közeget adunk hozzá, és a tálcákat 37 °C-on további 48 órán át inkubáljuk. Az ötödik napon a tálcákat ismét 1600xg értéken 10 percig centrifugáljuk, és a közeget a tálcák megfordításával eltávolítjuk, majd 200 µl PBS-t és 50 µl 80%-os hideg TCA oldatot adunk hozzá. Ezután a tálcákat jégen legalább egy órán át hagyjuk inkubálódni. A TCA-t megforgatással eltávolítjuk, a tálcákat desztillált vízbe történő merítéssel háromszor mossuk, és először papírral, majd forró levegősugárral megszáritjuk. Mindegyik mérőhelyre 200 µl 0,4%-os szulforodamin B-t adunk 1%-os ecetsavban. A tálcákat szobahőmérsékleten további 30 percig inkubáljuk. A szulforodamin B-t megforgatással eltávolítjuk, a tálcákat 1%-os ecetsavba merítéssel háromszor mossuk, majd először abszorbens papíron, majd forró levegősugárral megszáritjuk. Mindegyik mérőhelyre 200 µl 10 mmol/l trisz-bázist adunk, és a tálcákat legalább 20 percig keverjük. 540 nm-nél meghatározzuk az optikai sűrűséget Multiskan spektrofotométer alkalmazásával.

A PC3 és LoVo megtapadt sejtvonalak esetében ugyanezt az eljárást használjuk, de a harmadik napon a tálcák mosását megforgatással és PBS háromszori hozzáadásával és nem 1600xg értéken történő centrifugálásal végezzük. Az ötödik napon a felülűszót szintén a tálcák megforgatásával távolítjuk el.

A sejttúlélést ST 1879-cel vagy ST 1898-cal végzett inkubálással határozzuk meg 24 órán át a vegyület eltávolítása után 48 órával. A termék 48 órán át történő inkubálása elegendő a sejtszaporodás koncentrációfüggő módon történő gátlásához. Az egyes vizsgált tumoros sejtvonalakra kiszámított IC₅₀ értékeket (a sejttúlélés 50%-os gátlásához szükséges termék koncentráció) a 10. táblázatban mutatjuk be. Az ST 1879 a LoVo sejtekkel szemben nagyobb citotoxicitást mutat (IC₅₀= 5,2 µmol/l) a PC3 prosztata karcinóma vonalra (IC₅₀=13,6 µmol/l) és az NB4 humán promielocita vonalra (58,5 µmol/l) kiszámított értékekhez képest. Az ST 1898 aktívabbnak mutatkozik a LoVo vastagbél karcinómával szemben, ahogy ez a 12. táblázatban látható.

12. táblázat

Az ST 1879 és az ST 1898 sejt citotoxicitása

Vizsgált vegyület	Sejtvonal	IC ₅₀ ±SD (µmol/l)
ST 1879	NB4	58,5±3,2
ST 1879	PC3	13,6±2,1
ST 1879	LoVo	5,2±0,9
ST 1898	NB4	8,8±0,6
ST 1898	PC3	1,7±0,2
ST 1898	LoVo	0,38±0,02

Az ST 1879 és az ST 1898 NB4 sejtekre gyakorolt differenciálódást előmozdító hatása

NB4 sejteket 1 ml 10%-os embriószerűment tartalmazó RPMI 1640 közegre számítva 150 000 sejtsűrűségben szélesztünk. Ezután a sejteket ST 1879 vagy ST 1898 0,4 µmol/l és 0,01 µmol/l közötti csökkenő kon-

centrációjával kezeljük és három napra inkubátorba helyezük a közeg megváltoztatása nélkül. A differenciálóból méréséhez mindegyik mintából 500 000 sejtet gyűjtünk össze, centrifugáljuk és 1 ml 10% szérumot, 1 mg/ml nitrokek tetrazoliumot (NBT) és 100 ng PMA-t (forbol-mirisztol-acetát) tartalmazó RPMI 1640 közeggel újrasszuszpendáljuk. A fentiek szerint újrasszuszpendált sejteket 37 °C-on 60 percig inkubáljuk. Az inkubálás végén a sejteket centrifugáljuk és a csapadékot 10% Tritonx100-at tartalmazó PBS 1 ml-ével újrasszuszpendáljuk. A mintákat lizálásig ultrahangozzuk, majd 540 nm hullámhossznál spektrométerben leolvassuk. A differenciált sejteket tartalmazó minták bíborszínűvé válnak, míg a kontroll minták és/vagy a nem-differenciált sejtek fehérek vagy kevésbé intenzív színek maradnak. Az ST 1879 és az ST 1898 differenciálódást előmozdító hatását az AC₅₀ értékek alapján becsüljük meg (az 50%-os sejtdifferenciálódáshoz szükséges aktiváló koncentráció) az alábbiak szerint. Az ST 1898 jó differenciálódást előmozdító kapacitással rendelkezik, AC₅₀ értéke 19 nmol/l, ahogy ez a 13. táblázatban látható.

13. táblázat

Az ST 1879 és az ST 1898 NB4 sejtekre gyakorolt differenciálódást előmozdító hatása

Termék	AC ₅₀ (nmol/l±SD)
ST 1879	55±9
ST 1898	19±0,8

Az ST 1879, az ST 1926 és az ST 1898 angiosztatikus hatása csirke chorioallantoin membrán (CAM) modellen

A csirke chorioallantoin membrán egy nagyon erezett membrán, amelyben az edények a fejlesztés 4. napján megjelennek, a fejlesztés nyolcadik napjára arteriovenás rendszert fejlesztenek ki és a tizenegyedik napig aktívan szaporodnak.

A vizsgálat célja a CAM-ban bázisos körülmények között és egy, az érképződés bFGF-ét (bázis fibroblaszt növekedési faktorát) indukáló anyag jelenlétében mutatott érfejlődés követése. Ebben a vizsgálatban csirke embrionális tojásokat használunk fejlődésük kezdeti szakaszán. A fejlődés harmadik napján a héjakat operációval felnyitjuk, ezzel láthatóvá válnak a CAM edényei. A kezelést a fejlődés kilencedik napján végezzük a CAM felületén körülbelül 1 mm² térfogatú, steril zselatin fragmens alkalmazásával (GELFOAM Pharmacia Upjohn), amelyre adagoljuk a bFGF-t (50 ng/embrió) vagy a kérdéses terméket három egymás utáni napon.

A molekula érfejlődésre gyakorolt hatásának becsülését úgy végezzük, hogy összehasonlítjuk az edényeket a kezelés nulla időpontjában és a későbbi időpontokban (12. nap).

Az eredményeket az alábbi 14. táblázatban mutatjuk be. A három termék angiosztatikus hatást mutat a csirke chorioallantoin membrán modellen 0,25 µg/embrió és 0,5 µg/embrió közötti koncentrációban, ahogy az a 14. táblázatban látható.

14. táblázat

Az ST 1879, az ST 1926 és az ST 1898 angiosztatikus hatása

Kezelés	Koncentráció (µg/embrió)	n	9. nap (t0)	12. nap (72 óra)	Δ edények
bFGF	0,05	7	5±1	19±1	15±1
bFGF+1879	0,05+0,5	6	4±1	8±1	4±1

					(-73%)
bFGF	0,05	6	3±1	22±1	19±1
bFGF+1926	0,05±0,25	8	3±1	12±2	9±2
					(-53%)
bFGF	0,05	4	3±1	28±2	24±1
bFGF+1898	0,05±0,25	6	3±1	10±1	7±1
					(-71%)

Az eredményeket a szivacsenkénti edények számának középértéke \pm SE értékben adjuk meg.

Szabadalmi igénypontok

1. (I) képletű vegyület, a képletben

R jelentése cikloalkil-, adamantilcsoport, amelyben a CH-csoportok legalább egyike C-halogén-atommal vagy C-alkilcsoporttal lehet helyettesítve, és a CH₂-csoportok egyike oxigén- vagy kén-atommal, CH-halogén, CH-aril, CH-heteroaril, CH-arilalkil vagy CH-heteroarilalkil csoporttal lehet helyettesítve;

R' jelentése OR^m, OCOR^m vagy COR^{IV} képletű csoport;

R'-D jelentése O-(CH₂)_n-O képletű csoport, ahol n értéke 1-3;

D jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport, O-alkil, (CH₂)_n-NH₂, (CH₂)_n-NH-alkil vagy (CH₂)_n-OH képletű csoport, ahol n értéke 1-4;

R'' jelentése tetrazol, SO₃H, NHSO₃H, CHO, COOH, COO-alkil, CONHOH, CONH-aril, CONH-C₆H₄OH, CH₂OR^m, PO₃H₂, CO-(CH₂)_n-aril csoport, ahol n értéke 0-4;

R''' jelentése hidrogénatom, alkil-, aril-, arilalkil-, heteroaril-, heteroarilalkil-csoport, -SO₃H, α vagy β D- vagy L-glikozil-csoport;

R^{IV} jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport vagy OR^m képletű csoport;

[A] jelentése [C(R^V,R^{VI})-C(R^{VII},R^{VIII})]_n, [C(R^{IX})=C(R^X)]_m, [C=C]_n képletű csoport, ahol n értéke 0-3;

R^V, R^{VI}, R^{VII} és R^{VIII} jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, halogénatom, hidroxilcsoport, OR^m képletű csoport, nitro-, amino- vagy arilcsoport, -O-, -CH₂-, -CX₂- (ahol X jelentése halogénatom) vagy -CH(Rⁿ)- képletű csoport;

R^{IX} és R^X jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport, halogénatom, alkil-, aril-, ciano-, nitrocsoport vagy COOR^m képletű csoport.

2. A következő vegyületek:

metil-2-[4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]ciklopropánkarboxilát;

2-[4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]ciklopropánkarbonsav;

cisz-2-[4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]ciklopropánkarbonsav;

transz-2-[4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]ciklopropánkarbonsav;

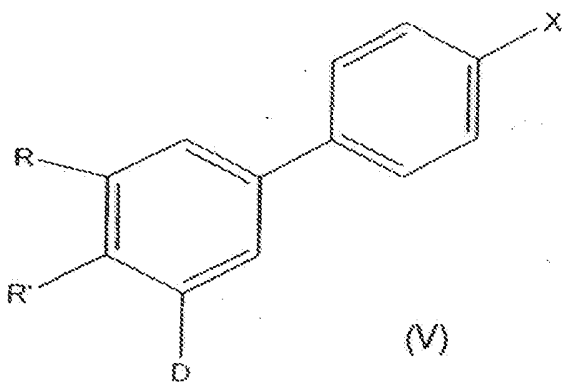
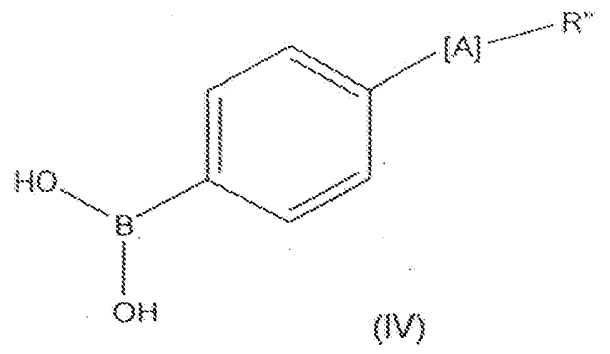
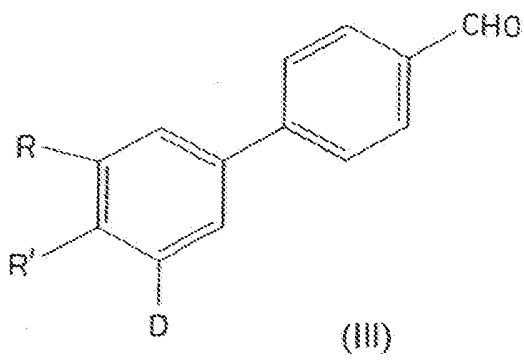
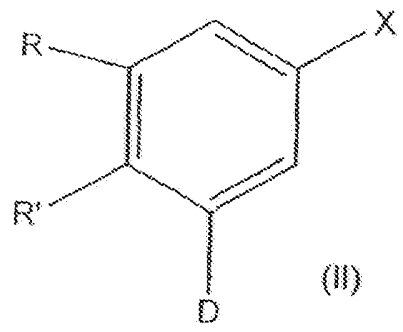
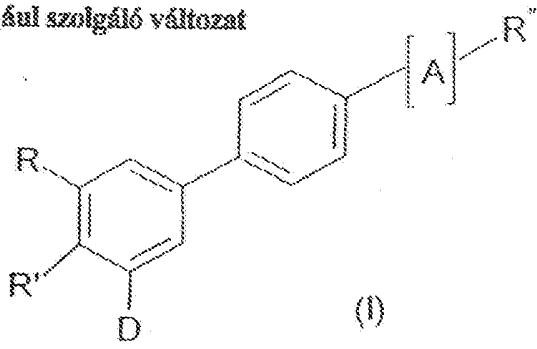
3. Gyógyszerkészítmény, amely hatóanyagként egy az 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyületet és legalább egy gyógyszerészetiileg elfogadható adalékanyagot és/vagy hígítószeret tartalmaz.

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyületek alkalmazása gyógyszerkészítmény előállítására.

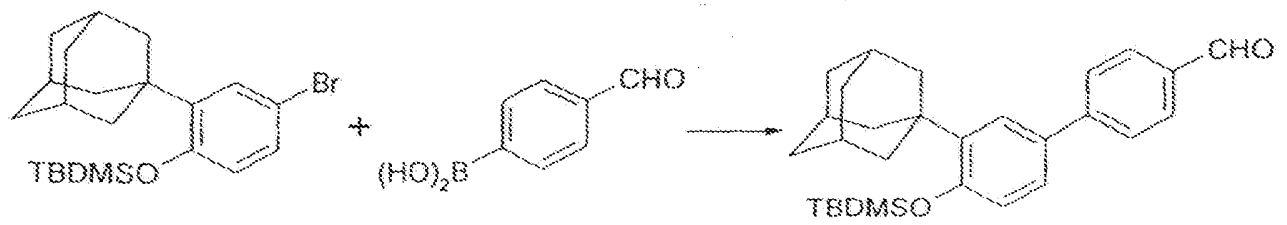
5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás megváltozott angiogenezissel összefüggő patológiás állapotok kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.
6. Az 5. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a patológiás állapot arthritisz patológiás állapot, tumorok, áttétképződés, diabetikus retinopátia, pszoriázis, krónikus gyulladás vagy ateroszklerózis.
7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a patológiás állapot diabetikus retinopátia.
8. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a patológiás állapot pszoriázis.
9. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a patológiás állapot krónikus gyulladásos betegség.
10. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a patológiás állapot ateroszklerózis.
11. A 6. igénypont szerinti alkalmazás arthritisz patológiás állapotok kezelésére.
12. A 4. igénypont szerinti alkalmazás tumorelles hatású gyógyszerkészítmény előállítására.
13. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a tumorelles hatás citotoxikus jellegű.
14. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a tumorelles hatás apoptotikus jellegű.
15. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a tumorelles hatás antiangiogén jellegű.
16. A 4. igénypont szerinti alkalmazás tumor áttét megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.
17. A 12-16. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a tumor szarkóma, karcinóma, karcinoid, csonttumor, neuroendokrin tumor, limfoid leukémia, mieloid leukémia, monocitikus leukémia, megakariocitikus leukémia vagy Hodgkin betegség.
18. A 17. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a tumor akut promielocitikus leukémia.
19. Kombináció, amely egy vagy több 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyületet tartalmaz egy vagy több ismert rákellenes hatóanyaggal együtt.
20. A 19. igénypont szerinti kombináció, amelyben a rákellenes hatóanyag alkilezőszerek, topoizomeráz inhibitorok, antitubulin hatású szerek, interkaláló vegyületek, antimetabolitok, természetes termékek, például vinka alkaloidok, epipodofilotoxinok, antibiotikumok, enzimek, taxánok, sejtdifferenciáló hatású vegyületek, foszfortirozin kináz inhibitorok, például Iressa vagy Glivec, TRAIL (tumor nekrozis faktorról kapcsolatos apoptózist indukáló ligandum), DR4 vagy DR5 receptor agonisták (TRAIL helyei), immunológiai tumorelles terápiában alkalmazható vegyületek, tumorelles vakcinák vagy α , β , γ interferon.
21. Gyógyszerkészítmény, amely a 19. igénypont szerinti kombinációt és egy vagy több gyógyszerészeti-leg elfogadható segéd- és/vagy hordozóanyagot tartalmaz.
22. A 19. igénypont szerinti kombináció alkalmazása tumor kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.
23. A 23. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy az 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyület a rákellenes hatóanyag mellett társ-hatásfokozóként van jelen.

NYOMDAPÉLDÁNY

Megadás alapjául szolgáló változat

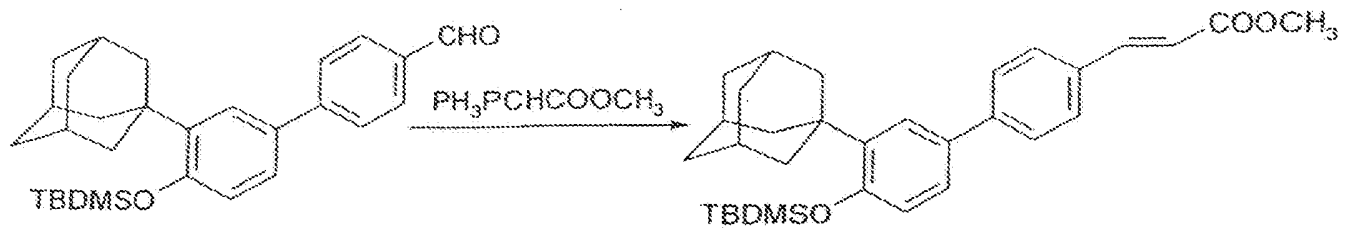


1. reakcióvázlat

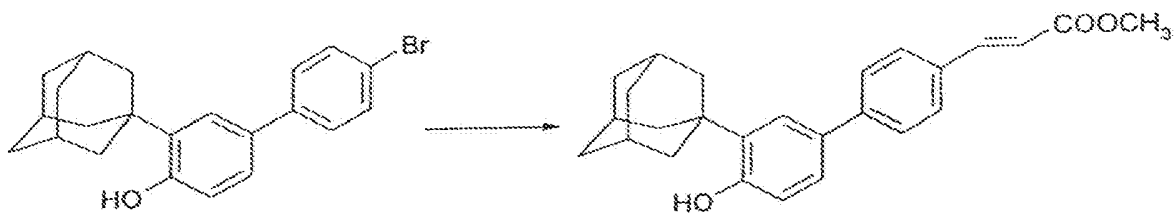


2. reakcióvázlat

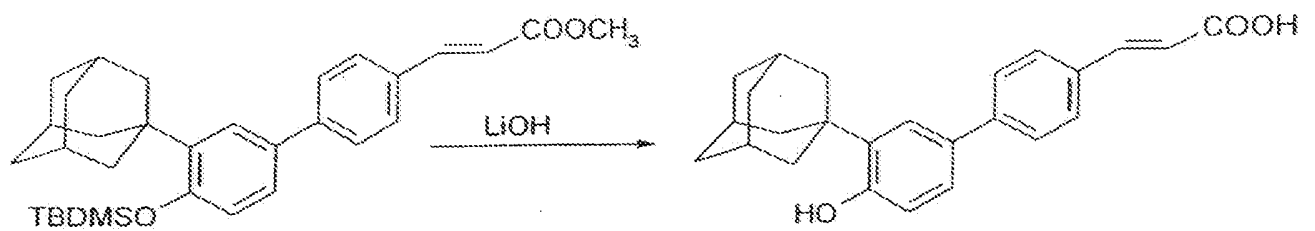
NYOMDAPÉLDÁNY



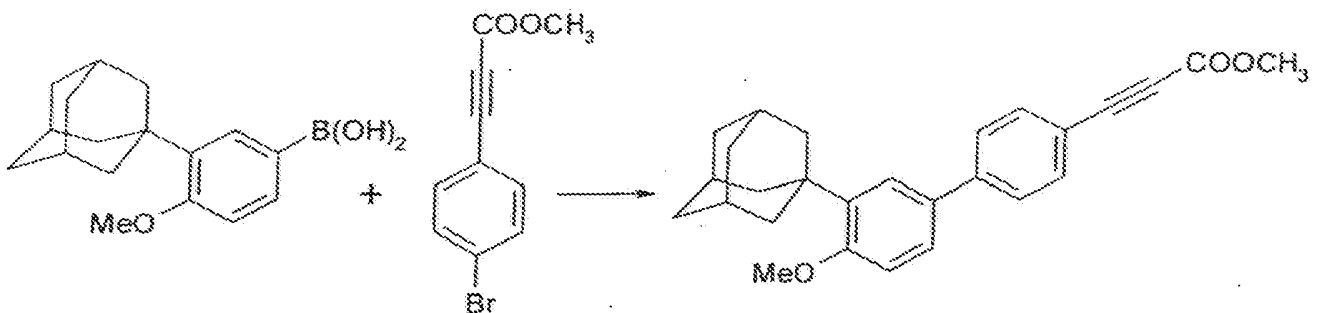
3. reakcióvázlat



4. reakcióvázlat

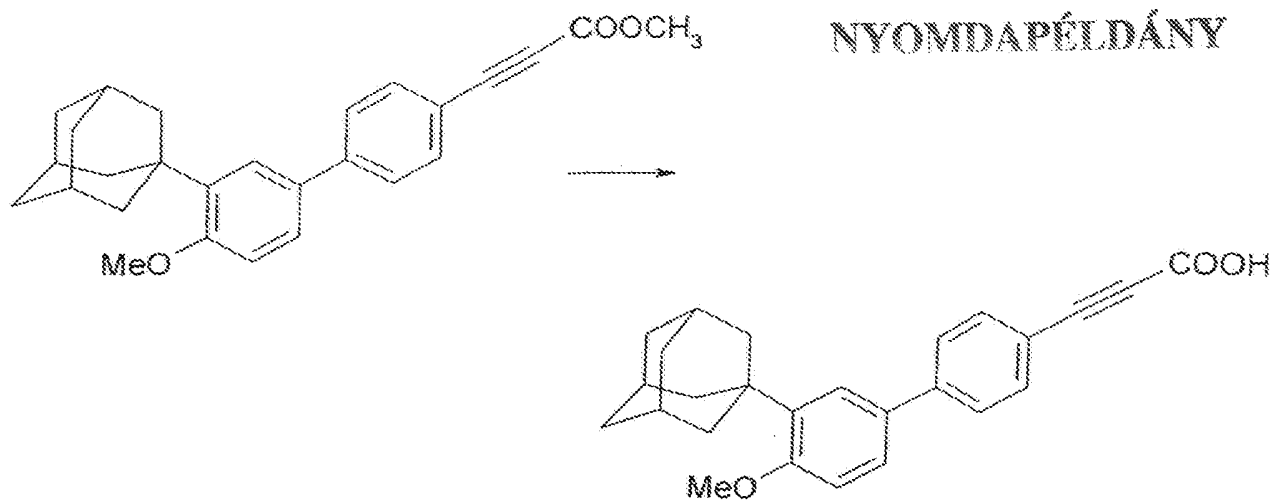


5. reakcióvázlat

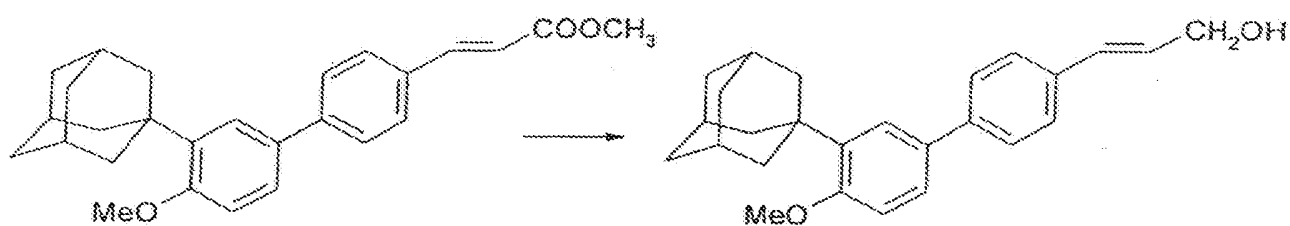


6. reakcióvázlat

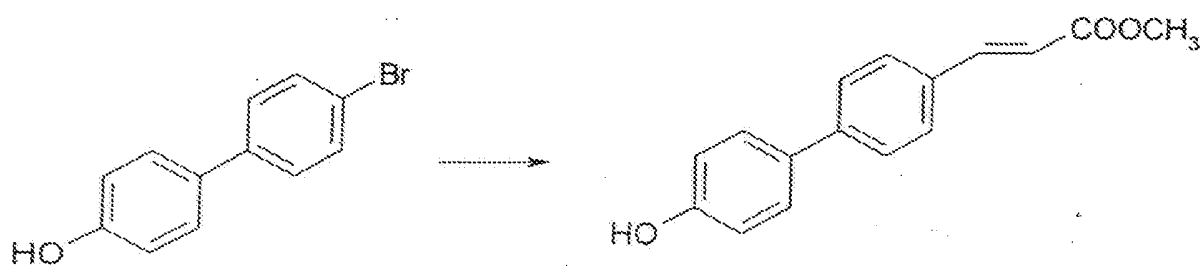
NYOMDAPÉLDÁNY



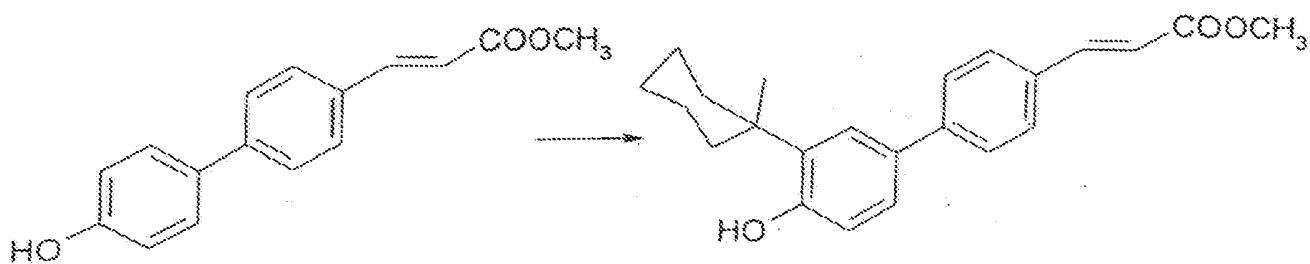
7. reakcióvázlat



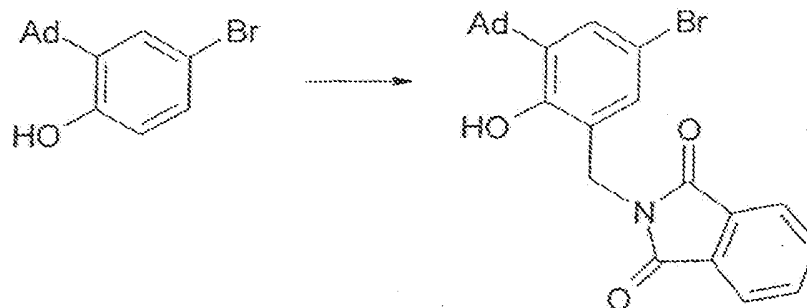
8. reakcióvázlat



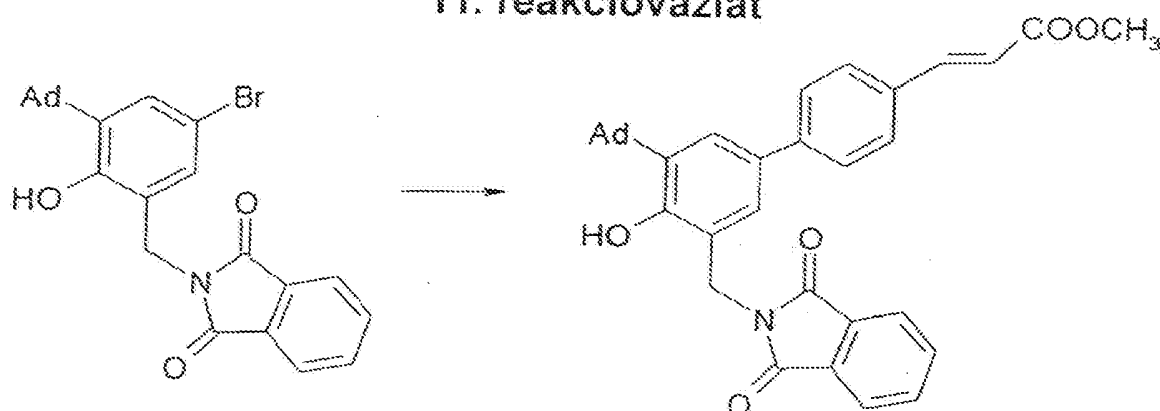
9. reakcióvázlat



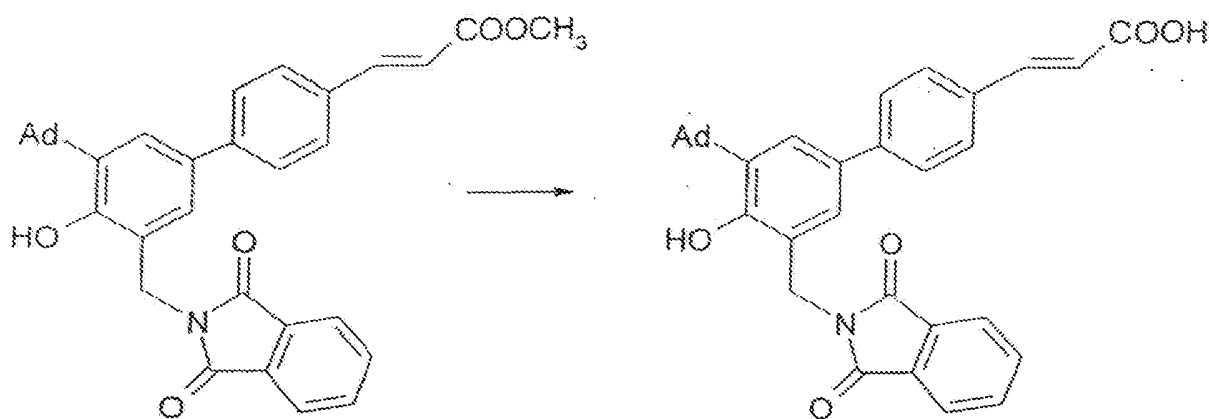
10. reakcióvázlat NYOMDAPÉLDÁNY



11. reakcióvázlat

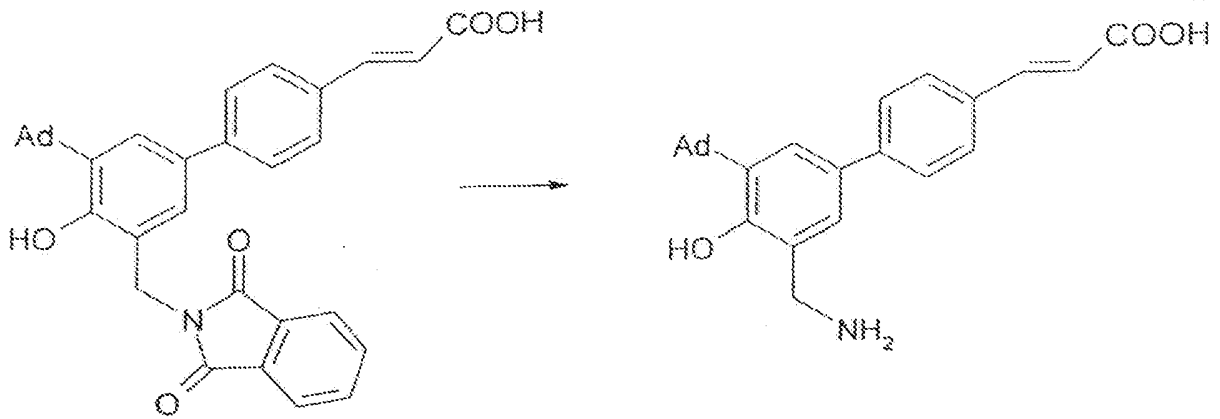


12. reakcióvázlat

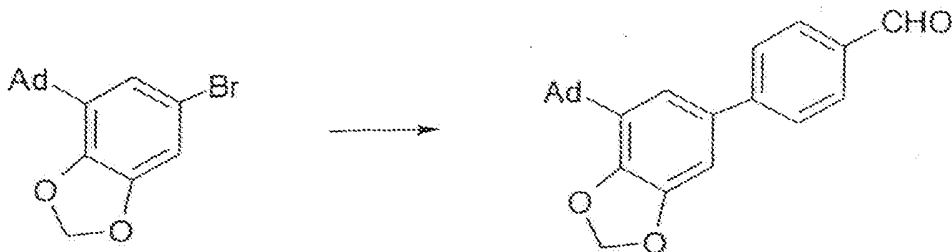


13. reakcióvázlat

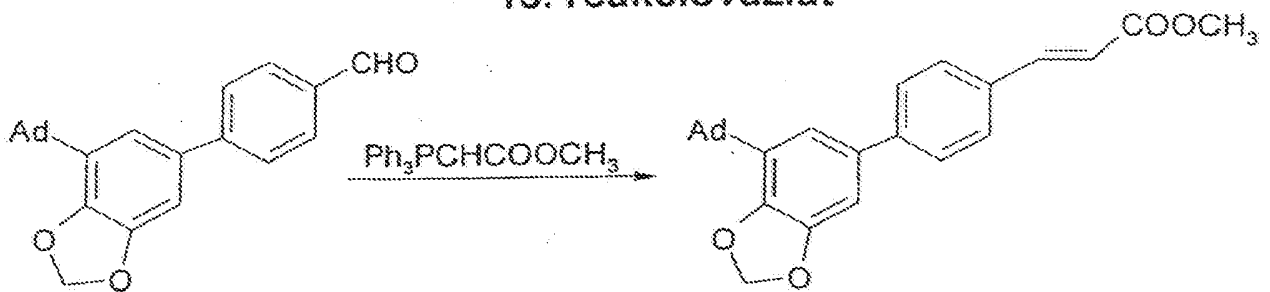
NYOMDAPÉLDÁNY 5/8



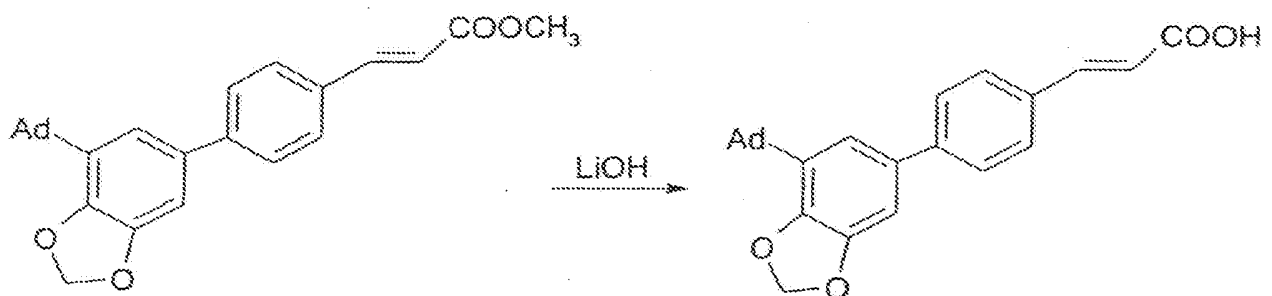
14. reakcióvázlat



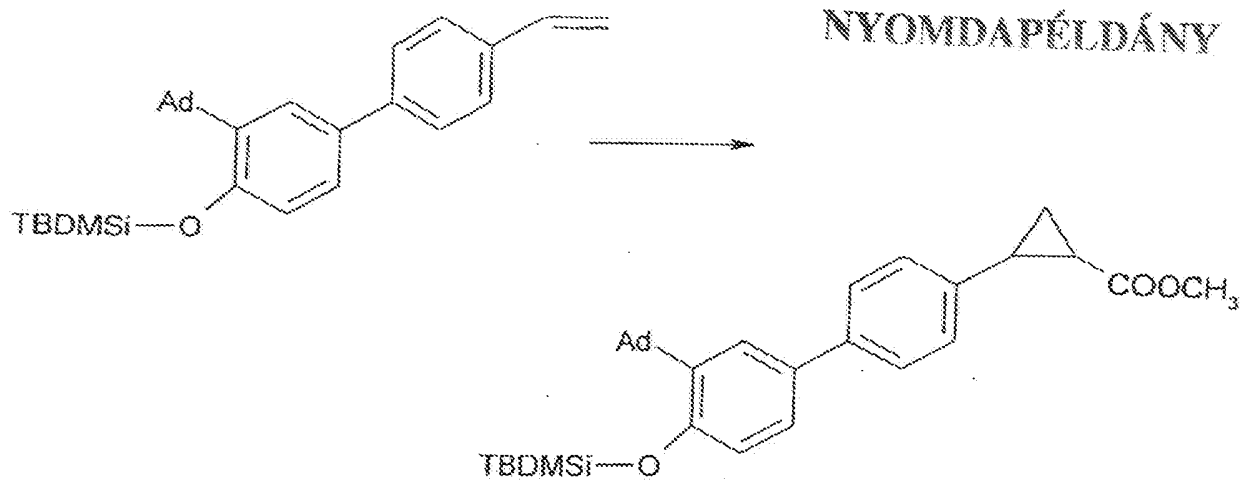
15. reakcióvázlat



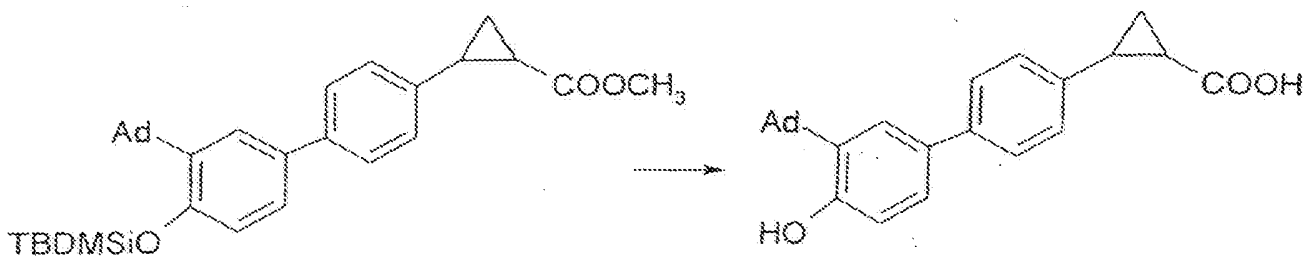
16. reakcióvázlat



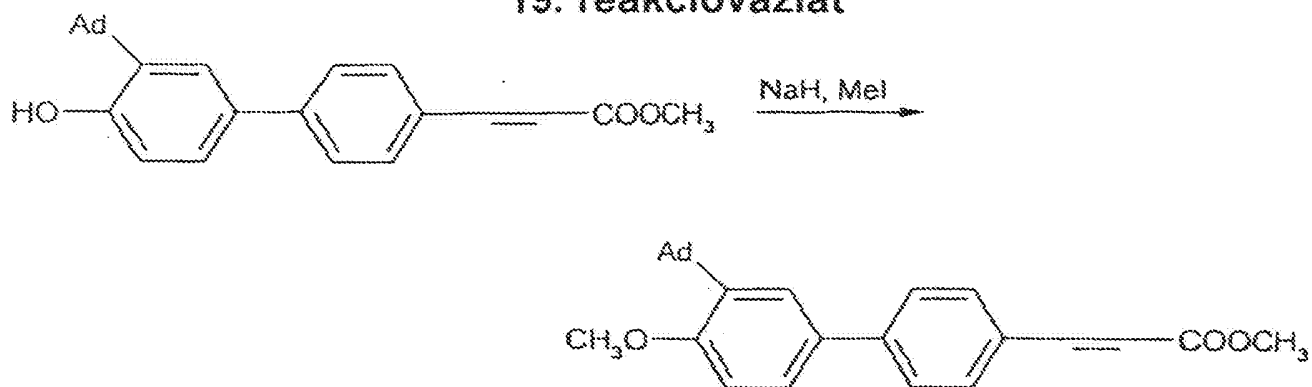
17. reakcióvázlat



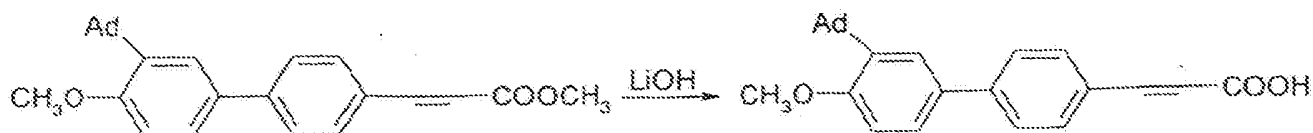
18. reakcióvázlat



19. reakcióvázlat

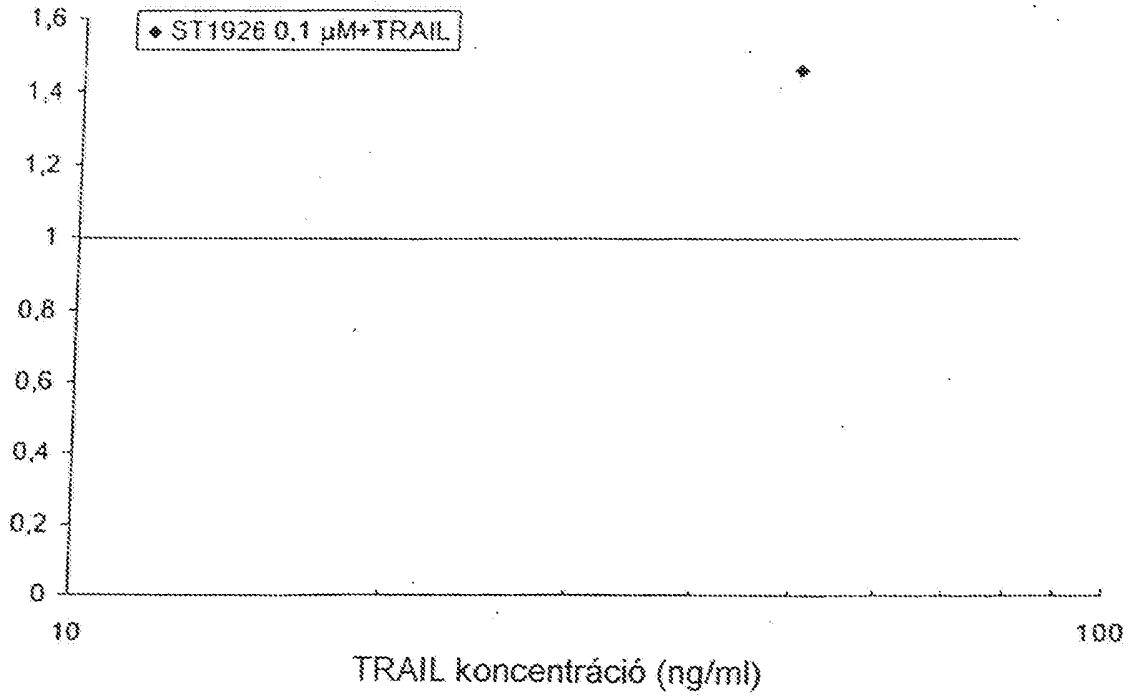


20. reakcióvázlat



NYOMDAPÉLDÁNY

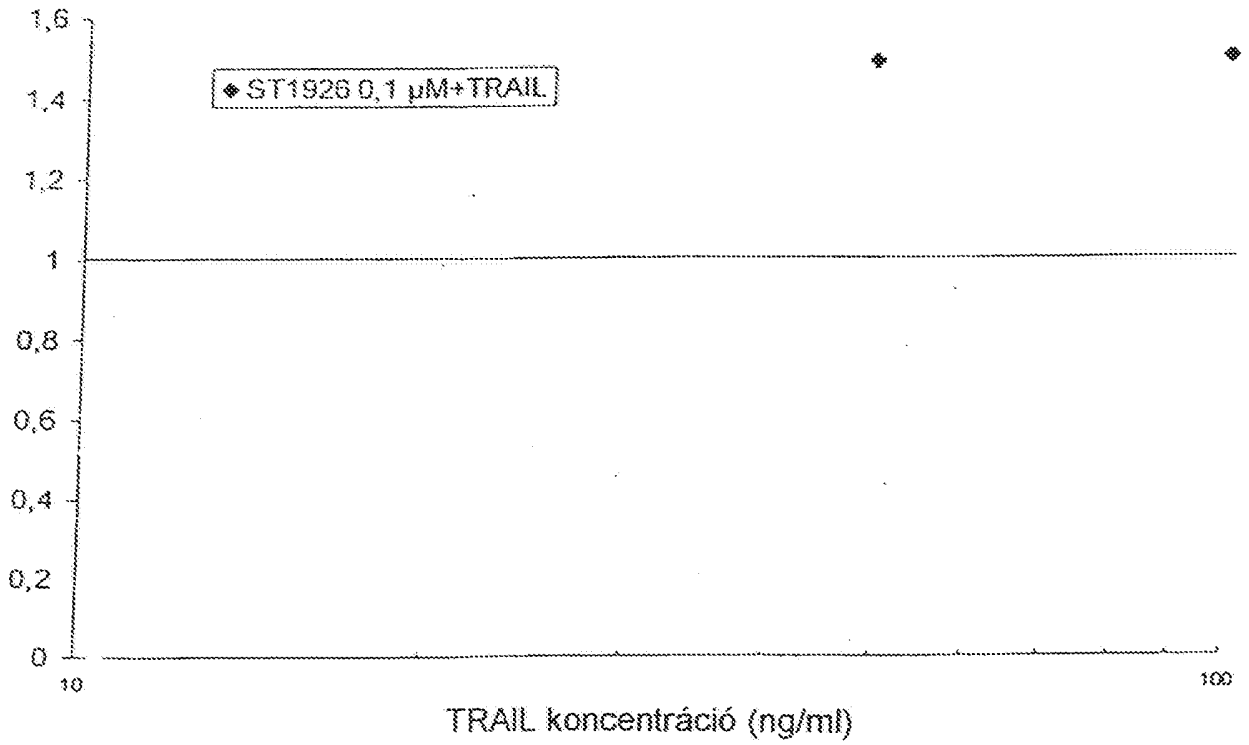
A2780/Dx (ST1926+TRAIL)



1. ábra

NYOMDAPÉLDÁNY

M109 (ST1926+TRAIL)



2. ábra