(19) Országkód:
HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS TALÁLMÁNYI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:
211 556 A9

(21) A kérelem ügyszáma: P/P 00240
(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 16.
(30) Elsőbbségi adatok:
171 605/89 1989. 07. 03. JP

Az alapul szolgáló szabadalom
száma: 5,070,092 országkódja: US
Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak
az oltalmi idő számítása szempontjából
figyelembe veendő kezdő napja: 1991. 12. 03.
Az oltalom e naptól számított 17 évig tartható fenn.

A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(51) Int. Cl.[6]
C 07 D 487/04
C 07 D 487/08
A 61 K 31/495
A 61 K 31/40

(72) Feltalálók:
Kanda, Yutaka, Houston, Texas (US)
Uosaki, Youichi, Machida (JP)
Saito, Hiromitsu, Sagamihara (JP)
Sano, Hiroshi, Machida (JP)
Kobayashi, Eiji, Shizuoka (JP)
Morimoto, Makoto, Machida (JP)
Nagamura, Satoru, Machida (JP)

(73) Szabadalmas:
Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokió (JP)

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

(54) **DC-88A jelzésű vegyület pirroloindolszármazékai**

Az átmeneti oltalom az 1–9. igénypontokra vonatkozik.

HU 211 556 A9

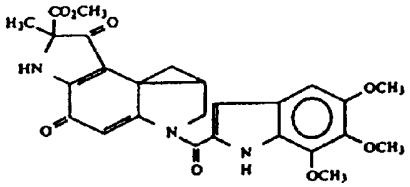
A leírás terjedelme: 18 oldal

A technika állásának ismertetése

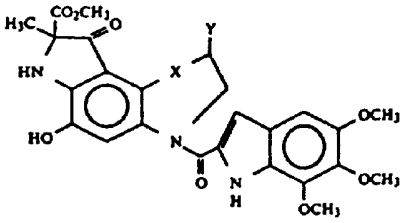
A találmány tárgyát új DC–88A származékok képezik. E vegyületeknek kiváló tumorellenes hatása van, és tumorellenes szerként eredményesen alkalmazhatók.

A WO 87/06265 számú közzétételi iratban ismertetésre került, hogy a Streptomyces fajtához tartozó mikroorganizmusok olyan DC–88A jelzésű vegyületet termelnek, amelynek nemcsak antibakteriális hatása van különféle baktériumokkal szemben, hanem a P388 jelzésű limfocita leukémiával szemben kedvező daganatellenes hatást mutatnak, stb.

A DC–88A a következő szerkezetet mutatja:



E vegyületek rokon szerkezetet mutatnak a WO 87/06265-ben ismertetett DC–88A, DC–88A1-gyel, valamint a 119787/90 számú nem vizsgált japán szabadalmi bejelentésben (EP-A-0351865) és a 139590/89 számú japán közzétett, nem vizsgált szabadalmi bejelentésben ismertetett DC–89A2, DC–89B1 és DC–89B2 vegyületekkel. A DC–89A1, DC–89A2, DC–89B1 és DC–89B2 a következő szerkeze-



tet mutatja:

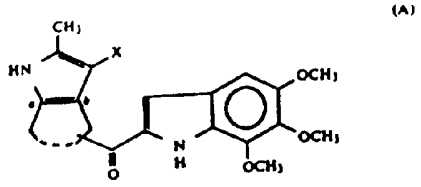
DC-89A1: X = $-CH_2-$, Y = Cl,
DC-89A2: X = egy vegyértékkötés, Y = $-CH_2Cl$,
DC-89B1: X = $-CH_2-$, Y = Br,
DC-89B2: X = egy vegyértékkötés, Y = $-CH_2Br$.

Ezek a vegyületek különféle baktériumokkal szemben antibakteriális hatást mutatnak, továbbá a P388 jelzésű limfocita leukémiával szemben dagantellenes hatással rendelkeznek, stb.

Ezen túlmenően a CC-1065 jelzésű vegyület és ennek származékai, valamint az SF2582C jelzésű vegyület származékai, amelyek szerkezetileg a DC-88A-hoz hasonlítanak, és daganatellenes hatást mutatnak, a 64695/79 számú közzétett vizsgálatlan japán szabadalmi bejelentésben, a 193989/85 számú (EP-A-0154445) közzétett vizsgálatlan japán szabadalmi bejelentésben, valamint a 275581/89 számú (EP-A-0339681) közzétett vizsgálatlan japán szabadalmi bejelentésben kerültek ismertetésre.

A találmány összefoglalása

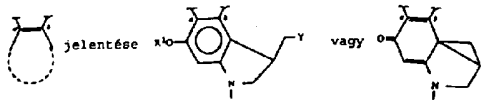
A találmányt az (A) általános képletű vegyületek és ezek gyógyászatilag megfelelő sói képezik



(A)

ahol a képletben

X jelentése hidrogénatom vagy $-CO_2R^1$ csoport (ahol a képletben R^1 jelentése hidrogénatom, egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport, allil- vagy benzilcsoport); és

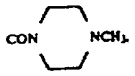


ahol Y jelentése klór- vagy brómatom;

R^2 jelentése hidrogénatom, CO_3-csoport (ahol a képletben R^3 jelentése egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport), $CONR^4R^5$ csoport (ahol a képletben R^4 és R^5 jelentése egymástól függetlenül egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport),

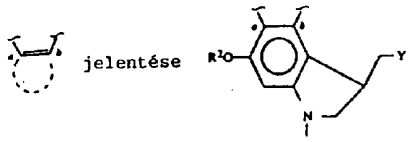


(ahol a képletben n jelentése 4 vagy 5),

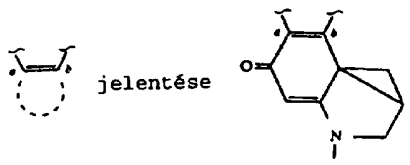


CO_2R^6 csoport (ahol a képletben R^6 jelentése egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport vagy allilcsoport), vagy $SiR^7R^8R^9$ (ahol a képletben R^7, R^8 és R^9 jelentése egymástól függetlenül egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport).

Azokat az (A) általános képletű vegyületeket, amelyek képletében



a továbbiakban (I) általános képletű vegyületként fogjuk említeni; azokat az (I) általános képletű vegyületeket pedig, amelyek képletében



(II) képletű vegyületként fogjuk említeni.

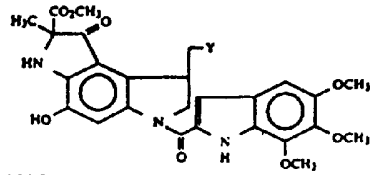
Az (A) általános képletű vegyület meghatározásánál szereplő egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport jelentése például metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, izobutil-, szek-butil- vagy terc-butilcsoport.

Az (I) és (II) képletű vegyületek gyógyászatilag megfelelő sói közül megemlítjük például a szervetlen savakkal képzett addíciós sókat, mint például a sósavas sót, hidrogén-bromiddal, hidrogén-jodiddal képzett sókat, a nitrátokat, szulfátokat és foszfátokat, továbbá a szerves savakkal képzett savaddíciós sókat, mint például az acetátokat, benzoátokat, maleátokat, fumarátokat, szukcinátokat, tartarátokat, citrátokat, oxalátokat, glioxalátokat, a metán-szulfonátokat, valamint az aszparaginsavval képzett savaddíciós sókat.

Az (I) és (II) képletű vegyületek előállítására szolgáló eljárást a következőkben ismertetjük.

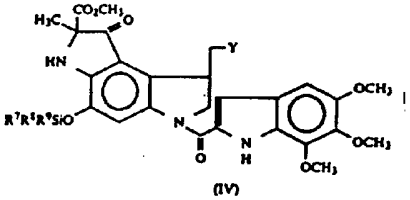
Az (I) és (II) általános képletű vegyületeket az alábbi reakciólépések segítségével állíthatjuk elő, ahol az (I-1), valamint az (I-2) képletű vegyületek az (I) képletű vegyületek köréhez tartoznak, továbbá az (I-1)a képletű vegyületek az (I-1) képletű vegyületek körébe tartoznak.

1. lépés



(Y=Cl: DC-89A2

Y=Br: DC-89B2) ↓ 1. lépés



(IV)

E képletekben Y, R^7, R^8 és R^9 jelentése a fentiekben megadottal azonos.

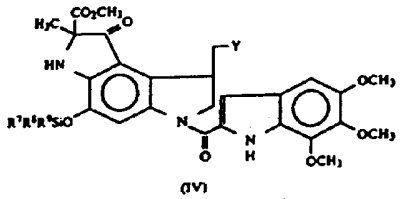
A (IV) általános képletű vegyületeket oly módon állíthatjuk elő, hogy DC-89A2 vagy DC-89B2 jelzésű vegyületeket valamely (III) általános képletű vegyülettel reagáltatunk

$Cl\text{-}SiR^7R^8R^9$ (III)

(ahol a képletben R^7, R^8 és R^9 jelentése a fentiekben megadottal azonos), a műveletet közömbös oldószerben, valamely bázis jelenlétében végezzük.

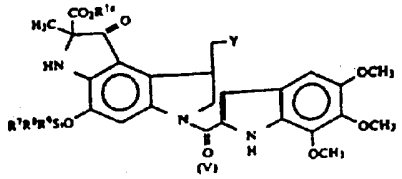
Bázisként használhatunk például imidazolt, kálium-karbonátot, kálium-terc-butoxidot, trietil-amint, stb. Közömbös oldószerként szerepelhet dimetil-formamid (DMR), tetrahidrofurán (THF), metilén-klorid, acetonitril, toluol, benzol, piridin, stb. Ezen oldószereket alkalmazhatjuk önmagukban vagy egymással elegyítve. A (III) általános képletű vegyületet 1–2 ekvivalens mennyiségben alkalmazzuk a DC-89A2 vagy DC-89B2 kiindulási vegyületre számítva; a bázist is 1–2 ekvivalens mennyiségben alkalmazzuk. A reakciót általában –30 °C és +50 °C közötti hőmérsékleten végezzük, a reakció lefutásának ideje 2 óra–1 nap.

2. lépés



(IV)

↓ 2. lépés



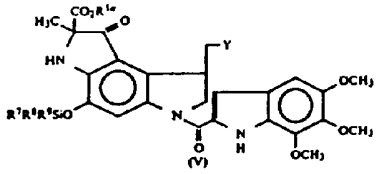
(V)

A képletekben Y, R^7, R^8 és R^9 jelentése a fentiekben megadottal azonos; az R^{1a} jelentése a fentiekben R^1-re megadottal azonos hidrogénatom kivételével.

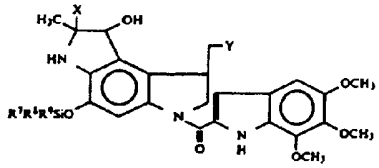
Az (V) általános képletű vegyületeket oly módon állíthatjuk elő, hogy a (IV) általános képletű vegyületeket $R^{1a}OH$ általános képletű vegyülettel reagáltatjuk, valamely bázis jelenlétében oldószer nélkül vagy közömbös oldószerben.

Közömbös oldószerként számításba jöhet metilén-klorid, kloroform, THF, toluol, stb. Bázisként alkalmazhatunk kálium-karbonátot, nátrium-karbonátot, nátrium-hidrogén-karbonátot, trietil-amint, stb., a bázis mennyiségét általában 0,1–2 ekvivalens arányban alkalmazzuk a (IV) általános képletű vegyületre számítva. Az $R^{1a}OH$-t a (IV) általános képletű vegyületre számítva két ekvivalens arányban vagy nagy feleslegben alkalmazzuk. Ez utóbbi esetben e vegyület a műveletnél oldószerként is szolgál. A reakciót általában –20 °C és +40 °C közötti hőmérsékleten végezzük, a reakció lefutásának időtartama 1 óra–3 nap.

3. lépés



Redukálószer ↓ 3. lépés



(V): $X=CO_2R^{1a}$

(VII): X=H

A képletekben Y, R^1, R^7, R^8 és R^9 jelentése a fentiekben megadottal azonos.

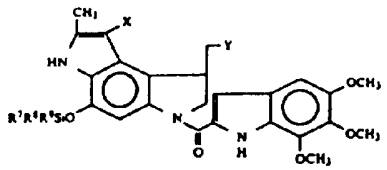
A (VI) és/vagy (VII) általános képletű vegyületet oly módon állíthatjuk elő, hogy az (V) általános képletű vegyületeket közömbös oldószerben reagáltatjuk.

Redukálószerként használhatunk például $NaBH_4$-et, $NaBH_3CN$-t, $LiAl[OH(CH_3)_3]_3H$-t, $Al[CH_2CH(CH_3)_2]_2H$-t és $NaAl(OCH_2CH_2OCH_3)_2H_2$-t, e vegyületeket az (V) általános képletű vegyületre számítva 1–30 ekvivalens mennyiségben használjuk. Közömbös oldószerként víz, metanol, etanol, terc-butanol, THF, dietil-éter, toluol, stb. jöhet figyelembe, ezeket alkalmazhatjuk önmagukban vagy egymással kombinálva. A műveletet –50 °C és +80 °C közötti hőmérsékleten végezzük; a reakció lefutásának időtartama 1 óra–1 nap.

4. lépés

(VI), (VII)

↓ 4. lépés



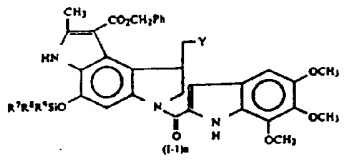
(I–1): $X=CO_2R^{1a}$

(I–2): X=H

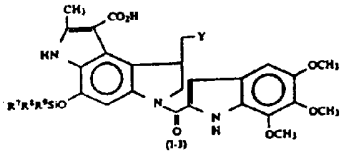
A képletekben Y, R^{1a}, R^7, R^8 és R^9 jelentése a fentiekben megadottal azonos. Az (I–1) és (I–2) általános képletű vegyületeket oly módon állíthatjuk elő, hogy a (VI) és (VII) általános képletű vegyületeket egy savval reagáltatjuk közömbös oldószerben.

Közömbös oldószerként alkalmazhatunk metilén-kloridot, kloroformot, THF-et, étert, toluolt, benzolt, stb., ezen oldószereket alkalmazhatjuk önmagukban vagy egymással kombinálva. Savként használhatunk például metán-szulfonsavat, p-toluol-szulfonsavat, kámfor-szulfonsavat, kénsavat, bór-trifluorid-dietil-éter komplexet, alumínium-kloridot vagy cink-kloridot, e vegyületeket a (VI) vagy (VII) általános képletű vegyületre számítva általában 0,1–3 ekvivalens mennyiségben használjuk. A reakciót 0 °C és 80 °C közötti hőmérsékleten végezzük, a reakció lefutásának időtartama 1 óra–10 óra.

5. lépés



↓ 5. lépés



A képletekben Y, R^7, R^8 és R^9 jelentése a fentiekben megadottal azonos; Ph jelentése fenilcsoport.

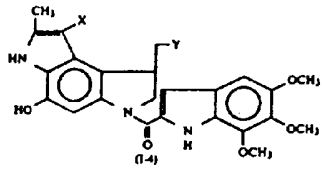
Az R^1 helyében hidrogénatomot tartalmazó (I–3) általános képletű vegyületeket oly módon állíthatjuk elő, hogy az (I-1)a általános képletű vegyületeket (amely vegyület az R^{1a} helyében benzilcsoportot tartalmazó (I-1) általános képletű vegyületnek felel meg) közömbös oldószerben hidrogenolízisnek vetünk alá.

Közömbös oldószerként alkalmazhatunk metanolt, etanolt, THF-et, dioxánt, etil-acetátot, stb., ezen oldószereket alkalmazhatjuk önmagukban vagy egymással kombinálva. A hidrogenolízishez katalizátorként használhatunk szenes palládiumot, palládium-bárium-szulfátot, Raney-nikkelt, stb.; a katalizátort alkalmazhatjuk 10–50 tömeg%-os arányban az (I-1)a általános képletű vegyületre számítva. A reakciót általában 0 °C és 60 °C közötti hőmérsékleten végezzük; a reakció lefutásának időtartama 1 óra–1 nap.

6. lépés

(I-1), (I-2), (I-3)

↓ 6. lépés



A képletben X és Y jelentése a fentiekben megadottal azonos.

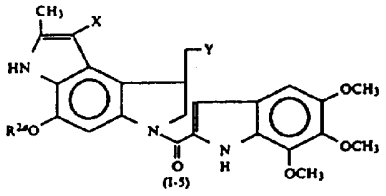
Az (I-4) általános képletű vegyületeket oly módon állíthatjuk elő, hogy az (I-1), (I-2) vagy (I-3) képletű vegyületeket valamely fluor-vegyülettel, mint például tetrabutil-ammónium-fluoriddal vagy cézium-fluoriddal reagáltatjuk közömbös oldószerben, majd a kapott vegyületet sósavval vagy hidrogén-bromiddal reagáltatjuk.

Közömbös oldószerként használhatunk THF-et, acetonitrilt, metilén-kloridot, metanolt, etanolt, toluolt, vizet, stb., ezeket alkalmazhatjuk önmagukban vagy egymással kombinálva. A fluor-vegyületet általában 1–3 ekvivalens mennyiségben használjuk az (I-1), (I-2) vagy (I-3) képletű vegyületre számítva. A sósavat vagy a hidrogén-bromidot 3 ekvivalens mennyiségben vagy nagy feleslegben ahsználjuk az (I-1), (I-2) vagy (I-3) képletű vegyületre számítva. A reakciót általában –20 °C és +60 °C közötti hőmérsékleten végezzük; a reakció végbemeneteléhez 1–12 óra szükséges.

7. lépés

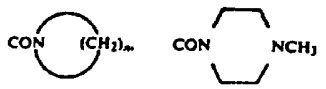
(I-4)

↓ 7. lépés



A képletben X és Y jelentése a fentiekben megadottal azonos; R^{2a} jelentése R^2-re megadott jelentéssel azonos hidrogénatom és $SiR^7R^8R^9$ csoport kivételével.

Az (I-5) képletű vegyületet, amely az R^2 helyében COR^3, $CONR^4R^5$,



vagy CO_2R^6 csoportot hordozó (I) általános képletű vegyületnek felel meg (ahol a képletekben R^3, R^4, R^5, R^6 és n jelentése a fentiekben megadottal azonos), oly módon állíthatjuk elő, hogy az (I-4) általános képletű vegyületet egy (VIII) képletű vegyülettel reagáltatunk:

R^{2a}-Hal (VIII),

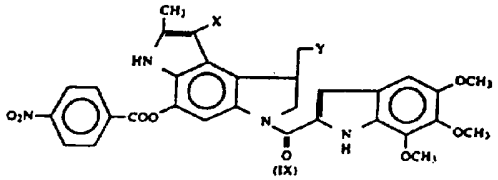
ahol a képletben R^{2a} jelentése a fentiekben megadottal azonos, és Hal jelentése klóratom vagy brómatom; a műveletet közömbös oldószerben valamely bázis jelenlétében végezzük. Azokat a vegyületeket, amelyek képletében R^{2a} jelentése COR^3 valamely $(R^3CO)_2O$ általános képletű savanhidrid alkalmazásával (ahol a képletben R^3 jelentése a fentiekben megadottal azonos) állíthatjuk elő.

Bázisként használhatunk például kálium-karbonátot, kálium-terc-butoxidot, nátrium-hidridet, trietil-amint, dimetil-amino-piridint, vagy piridint. Közömbös oldószerként használhatunk például DMF-et, THF-et, metilén-kloridot, acetonitrilt, toluolt, benzolt, piridint, stb.; ezeket használhatjuk önmagukban vagy egymással kombinálva. A (VIII) általános képletű vegyületet vagy a savanhidridet alkalmazhatjuk 1–10 ekvivalens mennyiségben az (I-4) általános képletű vegyületre számítva, a bázist 1–10 ekvivalens mennyiségben használjuk. A reakciót általában –30 °C és +50 °C közötti hőmérsékleten végezzük; a reakció teljes végbemeneteléhez szükséges idő 2 óra – 1 nap.

8. lépés

(I-4)

↓ 8. lépés



A képletben X és Y jelentése a fentiekben megadottal azonos.

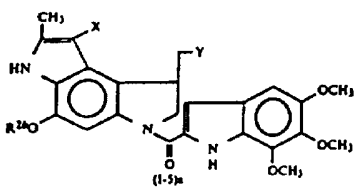
A (IX) általános képletű vegyületeket oly módon állíthatjuk elő, hogy valamely (I-4) általános képletű vegyületet klór-hangyasav-(p-nitrofenil)-észterrel reagáltatjuk közömbös oldószerben valamely bázis jelenlétében.

Bázisként szerepelhet például trietil-amin, piridin vagy 4-dimetil-amino-piridin, ezeket általában 1–5 ekvivalens mennyiségben alkalmazzuk az (I-4) általános képletű vegyületre számítva. Azonban az esetben, ha a bázis oldószerként is szerepel, akkor a bázist az (I-4) általános képletű vegyületre számítva nagy feleslegben használjuk. Közömbös oldószerként piridin, metilén-klorid, DMF, THF, toluol, stb. jöhet figyelembe, ezen oldószereket használhatjuk önmagukban vagy egymással kombinálva. A klór-hangyasav-(p-nitro-fenil)-észtert általában 1–5 ekvivalens mennyiségben használjuk az (I-4) általános képletű vegyületre számítva. A reakciót –10 °C és +50 °C közötti hőmérsékleten végezzük, a reakció teljessé válásához szükséges idő 30 nap – 1 nap.

9. lépés

(IX)

↓ 9. lépés



A képletben R^{2b} jelentése $CONR^4R^5$,



R^2 jelentésénél megadottak szerint; X, Y és n jelentése a fentiekben megadottal azonos.

Az (I-5)a általános képletű vegyületeket oly módon állíthatjuk elő, hogy a (IX) általános képletű vegyületeket (X) általános képletű R^4R^5NH,



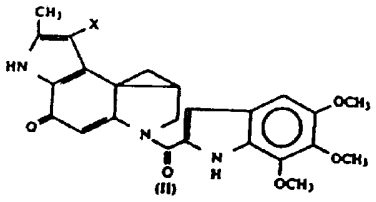
vegyületekkel reagáltatjuk (ahol a képletekben R^4, R^5 és n jelentése a fenntiekben megadottal azonos), a műveletet közömbös oldószerben végezzük.

Közömbös oldószerként használhatunk piridint, metilén-kloridot, DMF-et, THF-et, toluolt, stb., ezeket alkalmazhatjuk önmagukban vagy egymással kombinálva. A (X) általános képletű vegyületeket általában 1–5 ekvivalens mennyiségben alkalmazzuk a (IX) képletű vegyületre számítva. A reakciót –10 °C és +50 °C közötti hőmérsékleten végezzük, a reakció teljessé váláshoz 30 perc–1 nap szükséges.

10. lépés

(I-4)

↓ 10. lépés

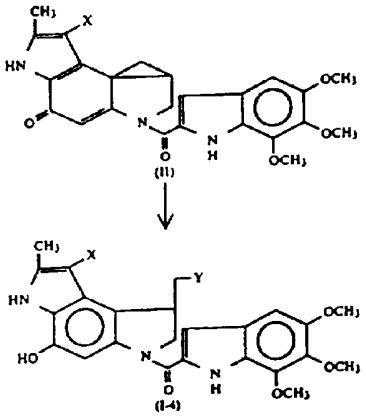


A képletben X jelentése a fenntiekben megadottal azonos. A (II) általános képletű vegyületeket oly módon állíthatjuk elő, hogy az (I-4) általános képletű vegyületet valamely bázissal reagáltatjuk közömbös oldószerben.

Közömbös oldószerként szerepelhet acetonitril, DMF, metilén-klorid, THF, dimetil-szulfoxid, stb., ezeket alkalmazhatjuk önmagukban külön-külön vagy egymással elegyítve. Bázisként szerepelhet például trietil-amin, diizopropil-etil-amin, kálium-terc-butoxit, 1,8-diaza-biciklo[5.4.0]undeka-7-én, kálium-karbonát vagy nátrium-hidrid, stb., amelyeket általában 1–2 ekvivalens mennyiségben alkalmazunk az (I-4) általános képletű vegyületre számítva. A reakciót általában –20 °C és +50 °C közötti hőmérsékleten végezzük, a reakció 10 perc–5 óra alatt teljes mértékben végbemegy.

Másik megoldásként a (II) általános képletű vegyületet a 6. lépésben ismertetett művelet segítségével állíthatjuk elő, azzal az eltéréssel, hogy (I-1), (I-2) vagy (I-3) képletű vegyületet alkalmazunk a reakcióhoz, sósavas vagy hidrogén-bromidos kezelés nélkül.

A (II) általános képletű vegyületeket (I-4) képletű vegyületekké alakíthatjuk át. E művelethez sósavat vagy hidrogén-bromidot alkalmazunk.



A képletekben X és Y jelentése a fenntiekben megadottal azonos.

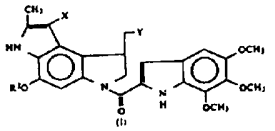
A reakció befejeződése után minden egyes lépésben vizet, pufferoldatot, sósavat, stb. adhatunk szükség esetén a reakcióelegyhez, ily módon a reakciót leállítjuk, majd vízzel nem elegyedő oldószerrel, mint például etil-acetáttal, kloroformmal vagy dietil-éterrel extrahálunk. Az extraktumot vízzel, nátrium-hidrogén-karbonát vizes oldatával, nátrium-klorid telített vizes oldatával, stb. mossuk, majd az extraktumot vízmentes nátrium-szulfáttal, stb. mossuk, ezután az oldószert ledesztilláljuk. Másik megoldásként a reakcióelegyet betöményítjük, a maradékot szilikagéllel töltött oszlopon kromatografáljuk, vékonyrétegkromatográfiának vetjük alá, nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás tisztítást végzünk, vagy a kapott terméket átkristályosítjuk, stb., ily módon tiszta terméket állítunk elő. A közbenső terméket további tisztítás nélkül közvetlenül alkalmazhatjuk a további reakciólépésekben.

Az (I), (II) általános képletű vegyületek, valamint ezek gyógyászatilag megfelelő sói vízzel adduktumot képezhetnek, vagy egyéb oldószerrel szolvátokat képezhetnek, ezek is a találmány oltalmi körébe tartoznak.

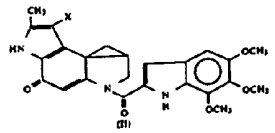
Az (I) és (II) általános képletű vegyületekhez tartozó származékok szerkezetét és a vegyületek számozását az 1. táblázatban tüntetjük fel. A táblázatban szereplő „I és II típus" megjelölés az (I) és (II) képletű vegyületekre utal.

Az 1. táblázatban szereplő vegyületek előállításához szükséges közbenső termékek szerkezetét és a vegyületek számát a 2. táblázat tünteti fel.

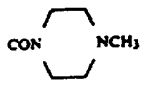
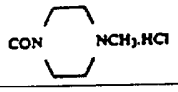
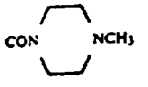
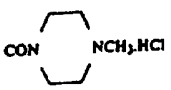
1. táblázat



(I)

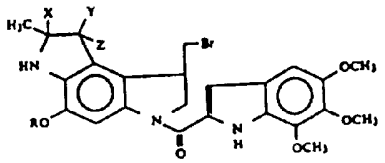


(II)

Vegyület száma	Típusa	X	Y	R^2
1	(I)	CO_2CH_3		
2	(I)	CO_2CH_3		
3	(I)	CO_2CH_3		
4	(II)	CO_2CH_3		
5	(I)	H		
6	(I)	H		
7	(I)	H		
8	(II)	H		
9	(I)	CO_2CHCH_3 | CH_3	Br	
10	(I)	CO_2CHCH_3 | CH_3	Cl	
11	(II)	CO_2CHCH_3 | CH_3	–	
12	(I)	CO_2CH_2Ph	Br	
13	(I)	CO_2CH_3	Br	
14	(I)	CO_2CH_3	Br	
15	(I)	CO_2CH_3	Br	
16	(I)	CO_2CH_3	Br	
17	(I)	CO_2CH_3	Cl	
18	(I)	CO_2CH_3	Br	
19	(I)	CO_2CH_3	Cl	
20	(I)	CO_2CH_3	Cl	

Megjegyzés:
Ph jelentése fenilcsoport.

2. táblázat



a	X	Y	Z	R
b	CO_2CH_3	H	OH	$(CH_3)_3CSi(CH_3)_2$
c	CO_2CHCH_3 | CH_3	H	OH	$(CH_3)_3CSi(CH_3)_2$
d	CO_2CH_2Ph	H	OH	$(CH_3)_3CSi(CH_3)_2$
e	CO_2CH_3	H	OH	$(CH_3)_3CSi(CH_3)_2$

Megjegyzés:
Ph jelentése fenilcsoport.

Az (I) és (II) általános képletű vegyületek gyógyászati hatását az alábbiakban ismertetjük.

$HeLaS_3$ sejtekkel szemben mutatott növekedés inhibitor hatás

$HeLaS_3$ sejteket szuszpendálunk olyan táptalajban, amely MEM táptalajt, 10%-os borjúmagzatszérumot és 2 mmol glutamint tartalmaz 3×10^4 sejt/ml koncentrációban (ezt a továbbiakban A táptalajként jelöljük). A szuszpenzióból 0,1 ml-t viszünk egy 96 nyílású mikrotiter lemezre.

A lemezt 37 °C hőmérsékleten CO_2 atmoszférában inkubáljuk, majd minden egyes nyíláshoz 0,05 ml A táptalajjal hígított vizsgálati mintát adunk.

A sejteket ezután 72 óra hosszat tovább inkubáljuk a CO_2 atmoszférájú inkubátorban, majd a táptalaj felúszóját eltávolítjuk. A maradékot foszfát puffer tartalmú fiziolóiás sóoldattal (PBS) mossuk, majd 0,02% semleges vörös festéket (Neutral Red) tartalmazó 0,1 ml A táptalajt viszünk minden egyes nyílásba, ezután 37 °C hőmérsékleten a CO_2-inkubátorban további 1 óra hosszat inkubálást végzünk, ily módon a sejteket megfestjük. A táptalaj felülúszóját eltávolítjuk, a sejteket fiziológiás sóoldattal mossuk, majd a festéket 0,001 n HCl/30% etanol oldattal extraháljuk. Az extraktum abszorpcióját 550 nm-en mérjük mikrolemez leolvasó segítségével. A kezeletlen sejtek extraktumának abszorpcióját összehasonlítjuk az ismert koncentrációjú vizsgálati anyaggal kezelt sejtekével, ily módon meghatározzuk a vizsgálati vegyületeknek azon koncentrációját, amellyel a sejtek növekedése 50%-ban inhibitálható (IC_{50}).

Szarkóma 180 tumorsejtek elleni terápiás hatás vizsgálata

A vizsgálathoz 18–20 g testtömegű öt-öt hím ddY-törzshöz tartozó egeret alkalmazunk; az állatok hónaljába 5×10^5 Szarkóma 180 tumorsejtet implantálunk szubkután. Egy nappal az implantációt követően az egereknek intravénásan 0,2 ml fiziológiás sóoldatot adunk, amely oldat a vizsgálati vegyületeket tartalmazza a 3. táblázatban feltüntetett koncentrációban. T/C értékét [T: átlagos tumortérfogat (mm^3) a vizsgálati vegyülettel kezelt állatcsoport esetében, C: átlagos tumortérfogat 0,2 ml fiziológiás sóoldattal intravénásan kezelt kontrollcsoport esetében] 7 nappal az inplantációt követően határozzuk meg.

Az eredményeket a 3. táblázat foglalja magában.

3. táblázat

Vegyületszám	HeLaS	Szarkóma 180	
	IC_{50}(nmol)	Dózis (mg/kg)	T/C
1.	0,0020	0,25	0,043
2.	0,00045	–	–
3.	0,00024	–	–
4.	0,0052	0,25	0,21
6.	0,0019	–	–
7.	0,00024	–	–
8.	0,00040	–	–
13.	–	1,0	0,063
14.	–	1,0	0,098
		0,50	0,20
15.	–	1,0	0,088
		0,50	0,21
16.	–	0,50	0,24
18.	–	0,50	0,14

Megjegyzés: –: nem lett vizsgálva

Akut toxicitás vizsgálata

20 ± 1 g testtömegű dd törzshöz tartozó hím egereknek intraperitoneálisan vizsgálati vegyületeket adunk. Az MLD értéket (minimális letális dózis) oly módon határozzuk meg, hogy 14 nappal a beadást követően megállapítjuk a mortalitás mértékét.

Az eredményeket a 4. táblázat tünteti fel.

4. táblázat

Vegyületszám	Akut toxicitás (MLD) mg/kg
1.	1,0
2.	1,0
4.	0,5
13.	1,0
14.	1,0
15.	1,0
16.	1,0
18.	0,84

Az (I) és (II) képletű vegyületeket antitumorszerként alkalmazhatjuk önmagukban vagy legalább egy, gyógyászatilag megfelelő vivőanyaggal elegyítve. Így például az (I), (II) általános képletű vegyületeket vagy ezek sóit fiziológiás sóoldatban vagy pedig vizes glükóz, laktóz, mannit, stb. oldatban feloldva injekciós beadásra alkalmas gyógyászati készítményeket állítunk

elő. Másik megoldásként az (I) és (II) képletű vegyületeket vagy ezek gyógyászatilag megfelelő sóit szokásos módon fagyasztva szárítjuk, vagy nátrium-kloriddal elegyítve poralakú injekciót állítunk elő. A gyógyászati készítmények a gyógyászati gyakorlatból jól ismert segédanyagokat tartalmazhatják, így például gyógyászatilag megfelelő sókat, stb. A készítmények dózisa változhat a kezelt beteg korától, állapotától, stb., célszerű az (I) vagy (II) képletű vegyületeket 0,00001–10 mg/kg/nap dózisban adni az emlős betegeknek, ideértve a humán betegeket is. A kezelést végezhetjük naponta egyszeri alkalommal (egyszeri dózis) vagy egymást követő több alkalommal, vagy pedig 1–3-szor hetente, vagy 2–3 hetente egy alkalommal intravénás kezelés formájában. Kívánt esetben végezhetünk orális kezelést is hasonló dózisokban, hasonló módon. Az orális beadásra alkalmas készítmények közül megemlítjük a tablettákat, kapszulákat, porokat, granulátumokat és ampullákat, amely készítmények a gyógyászati gyakorlatban jól ismert gyógyászati segédanyagokat tartalmaznak. Kívánt esetben végezhetünk intraartériás vagy intraperitoneális kezelést, a készítményt adhatjuk a toraxba, stb., az alkalmazott dózisok ez esetben is hasonlóak, a beadás hasonló módszer szerint történik.

A találmány szerinti tumorellenes készítmények eredményesen alkalmazhatók leukémia esetében, gyomorrák, bélrák, tüdőrák, mellrák, méhrák, stb. kezelésére emlősöknél, ide értve a humán betegeket is.

A találmány szerinti megoldást az alábbi példákkal szemléltetjük.

A találmány szerinti vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságait az alábbi berendezések segítségével vizsgáltuk:

NMR	JEOL, Ltd.	FX–100 (100 MHz)
	JEOL, Ltd.	PS–100 (100 MHz)
	Bruker	AM–400 (400 MHz)
MS	Hitachi Ltd.	M–80B
	Shimadzu	QP–1000
IR	Nippon Bunko	IR–810

Szilikagélként Wakogel C–200-t alkalmaztunk, amit Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd. hoz forgalomba.

1. példa

(1) vegyület előállítása

110 mg (0,16 mmol) 4. referenciapélda szerint előállított (a) vegyületet kloroformban feloldunk, majd 40 mg (0,17 mmol) kámfor-szulfonsavat adunk az oldathoz, ezután az elegyet 50 °C hőmérsékleten 2 óra 40 percig keverjük. A reakcióelegyhez ezután telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldatot adunk, majd az elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-klorid oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatográfiás úton tisztítjuk, ehhez 20 ml szilikagélt és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 3:1–2:1 arányú elegyét alkalmazzuk. Így 81 mg (76%-os hozam) (1) vegyületet kapunk.

Az (1) vegyület fizikai-kémiai jellemzői a következők:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,40 (1H, br s), 8,30 (1H, br s), 7,98 (1H, s), 6,99 (1H, d, J=2,3 Hz), 6,89 (1H, s) 4,73 (1H m), 4,6–4,5 (2H, m), 4,07 (3H, s), 3,98 (3H, s), 3,95 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,8 (1H, m), 3,21 (1H. t J=10,0 Hz), 2,76 (3H, s), 1,07 (9H, s), 0,39 (3H, s), 0,37 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3466, 1697, 1628, 1493, 1414, 1306, 1111, 839.

EIMS m/z: 687, 685 (M^+), 592, 454, 452, 359, 234.

2. példa

(2) vegyület előállítása

38 mg (0,055 mmol) (1) vegyületet 10 ml THF-ben feloldunk, az oldathoz 2 ml 0,2 mólos foszfát puffer oldatot (pH=4) és 0,55 ml (0,055 mmol) 0,1 mólos tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluorid oldatot adunk, majd az elegyet 0 °C és szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten 4 óra hosszat keverjük. Ezután a reakcióelegyet 2 n sósavoldathoz öntjük, majd az elegyet etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos fázist egymást követően telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal, telített vizes nátrium-klorid oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatográfia segítségével tisztítjuk (ehhez 10 ml szilikagélt és eluálószerként kloroform és metanol 97:3 arányú elegyét alkalmazzuk); így 28 mg (97%-os hozam) (2) vegyületet kapunk.

A (2) vegyület fizikai-kémiai jellemzői a következők:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,76 (1H, br s), 9,36 (1H, br s), 9,05 (1H, br s), 8,30 (1H, s), 7,00 (1H, d, J=2,2 Hz), 6,87 (1H, s), 4,71 (1H, m), 4,48 (2H, m), 4,10 (3H, s), 3,97 (3H, s), 4,0–3,8 (1H, m), 3,923 (3H, s), 3,916 (3H, s), 3,30 (1H, m), 2,67 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3320, 2940, 1696, 1586, 1444, 1430, 1315, 1216, 1109.

SIMS m/z: 528 (M+1), 494, 294, 257, 234, 213.

3. példa

(3) vegyület előállítása

52,9 mg (0,077 mmol) (1) vegyületet 3,8 ml tetrahidrofuránban feloldunk, az oldathoz ezután 1,54 ml (0,15 mmol) 0,1n vizes nátrium-hidroxid oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez 5 ml 1n hidrogén-bromid-oldatot adunk, majd a kapott elegyet etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos fázist egymást követően telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatográfia segítségével

tisztítjuk (ehhez 12 ml szilikagélt és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 1:2 arányú elegyét alkalmazzuk); így 29,4 mg (66%-os hozam) (3) vegyületet kapunk.

A (3) vegyület fizikai-kémiai jellemzői a következők:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,93 (1H, br s), 9,81 (1H, br s), 9,42 (1H, br s), 8,35 (1H, s), 6,95 (1H, d, J=2,1 Hz), 6,84 (1H, s), 4,65 (3H, s), 3,96 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,90 (3H, s), 3,76 (1H, dd, J=10,1; 2,5 Hz), 3,16 (1H, t, J=9,8 Hz), 2,62 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3420, 2948, 1694, 1587, 1495, 1444, 1318, 1217, 1110.

SIMS m/z: 574, 572 (M+1), 257, 234.

4. példa

(4) vegyület előállítása

13 mg (0,025 mmol) (2) vegyületet 2 ml acetonitrilben feloldunk, majd az oldathoz 7,4 µl (0,049 mmol) diaza-biciklo-undecént adunk, ezután az elegyet szobahőmérsékleten egy óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez 0,2 mólos foszfát puffer oldatot (pH=4) adunk, majd a kapott elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist vízzel, majd ezt követően vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatográfia segítségével tisztítjuk (ehhez 10 ml szilikagélt és eluálószerként kloroform és metanol 98:2 arányú elegyét alkalmazzuk); így 9,2 mg (76%-os hozam) (4) képletű vegyületet kapunk.

A (4) vegyület fizikai-kémiai jellemzői a következők:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11,58 (1H, br s), 9,40 (1H, br s), 7,12 (1H, s), 6,95 (1H, d, J=2,3 Hz), 6,81 (1H, s), 4,45 (2H, m), 4,08 (3H, s), 3,90 (3H, s), 3,82 (3H, s), 3,67 (1H, m), 2,63 (3H, s), 2,38 (1H, dd, J=7,5; 3,4 Hz), 1,37 (1H, t, J=4,2 Hz).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3470, 3225, 2934, 1700, 1637, 1607, 1385, 1295, 1264, 1106.

SIMS m/z: 494 (M+3), 493, 492, 260, 234, 213.

5. példa

(5) vegyület előállítása

22,9 mg (77%-os hozam) (5) vegyületet állítunk elő, kiindulási anyagként 30,5 mg (0,047 mmol) 5. referenciapélda szerint előállított (b) vegyületből; az 1. példában leírtak szerint járunk el.

Az (5) vegyület fizikai-kémiai jellemzői a következők:

^{1}H-NMR (100 MHz, CDCl) δ (ppm): 9,44 (1H, br s), 7,90 (1H, br s), 7,83 (1H, s), 6,95 (1H, d, J=2,4 Hz), 6,88 (1H, s), 6,14 (1H, q, J=1,1 Hz), 4,9–4,4 (2H, m), 4,06 (3H, s), 3,94 (3H, s), 3,91 (3H, s), 4,0–3,8 (1H, m), 3,38 (1H, t, J=10,3 Hz), 2,48 (3H, s), 1,07 (9H, s), 0,36 (6H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3465, 2934, 1631, 1609, 1493, 1413, 1307, 839.

EIMS m/z: 629, 627 (M^+), 547, 396, 394, 314, 313, 234, 73.

6. példa

(6) vegyület előállítása

12 mg (0,019 mmol) (b) vegyületet 3 ml kloroformban feloldunk, az oldathoz 4 mg (0,017 mmol) kámforszulfonsavat adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldatot adunk, majd az oldatot kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott maradékot 2 ml tetrahidrofuránban feloldjuk, majd az oldathoz 0,5 ml vizet, 0,5 ml 0,2 mol foszfát puffer oldatot (pH = 4) és 0,2 ml (0,02 mmol) 0,1 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluoridot adunk, majd az elegyet 18 óra hosszat szobahőmérsékleten keverjük. A reakcióelegyet 2n sósav-oldathoz öntjük, majd etil-acetáttal extrahálunk. Az etil-acetátos fázist telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket preparatív szilikagél vékonyrétegkromatográfia segítségével tisztítjuk, az előhíváshoz kloroform és metanol 95:5 arányú elegyét alkalmazzuk; így 5,9 mg (62%-os hozam) (6) vegyületet kapunk.

A (6) vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai a következők:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,65 (1H, br, s), 8,87 (1H, br, s), 8,48 (1H, br, s), 8,14 (1H, s), 6,99 (1H, d, J = 2,5 Hz), 6,89 (1H, s), 6,12 (1H, q, J = 1,0 Hz), 4,65 (1H, dd, J = 11,3 ; 9,1 Hz), 4,57 (1H, dd, J = 11,1; 3,7 Hz), 4,20 (2H, m), 4,13 (3H, s), 3,97 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,52 (1H, dd, J = 11,3; 11,6 Hz), 2,45 (3H, d, J = 0,9 Hz).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3350, 2938, 1608, 1495, 1388, 1312, 1220, 1105.

EIMS m/z: 469 (M^+), 416, 234, 200.

SIMS m/z: 470, (M+1), 436, 434, 242, 234, 201.

7. példa

(7) vegyület előállítása

22,7 mg (0,036 mmol) (5) vegyületet 1,6 ml tetrahidrofuránban feloldunk, majd az oldathoz 0,7 ml 0,2 mólos foszfát puffer oldatot (pH = 4) és 40 µl (0,040 mmol) 1 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluoridot adunk; az elegyet azután 6 óra hosszat szobahőmérsékleten keverjük. A reakcióelegyhez 2 ml 1n hidrogén-bromid-oldatot adunk, majd 5 percig keverjük, és diklór-metánnal extrahálást végzünk. A diklór-metános fázist telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatográfiával tisztítjuk (ehhez 12 ml szilikagélt és eluálószerként kloroform és metanol 98:2 arányú elegyét alkalmazzuk); így 8,7 ml (46%) (7) vegyületet kapunk.

A (7) vegyület fizikai-kémiai jellemzői a következők:

^{1}H- NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,71 (1H, br s), 8,92 (1H, br s), 8,41 (1H, br s), 8,16 (1H, m), 6,98

(1H, d, J = 2,3 Hz), 6,88 (1H, d, J = 2,1 Hz), 6,11 (1H, m), 4,8–4,6 (1H, m), 4,6–4,5 (1H, m), 4,11 (3H, s), 4,1–3,9 (2H, m), 3,96 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,38 (1H, t, J = 10,5 Hz), 2,44 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3406, 2936, 1604, 1495, 1429, 1313.

SIMS m/z: 516, 514 (M+1), 436, 434, 234, 201.

8. példa

(8) vegyület előállítása

22,9 mg (0,036 mmol) (5) vegyületet 2,3 ml acetonitrilben feloldunk, az oldathoz 55 µl (0,055 mmol) 1 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluoridot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 2 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután 0,1 mólos foszfát puffer oldatot (pH = 7) adunk, majd az elegyet etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos fázist telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, majd vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket kromatográfia segítségével tisztítjuk (ehhez szilikagéllel töltött oszlopon 12 ml szilikagélt, eluálószerként kloroform és metanol 99:1 arányú elegyét használjuk); így 14,9 mg (hozam 94%) (8) vegyületet kapunk:

A (8) vegyület fizikai-kémiai jellemzői a következők:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,99 (1H, br s), 9,31 (1H, br s), 6,94 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,92 (1H, s), 6,78 (1H, s), 5,67 (1H, m), 4,40 (1H, dd, J = 10,4; 4,5 Hz), 4,36 (1H, d, J = 10,3 Hz), 4,07 (3H, s), 3,93 (3H, s), 3,89 (3H, s), 2,69 (1H, m), 2,36 (3H, s), 1,70 (1H, m), 1,53 (1H, t, J = 4,6 Hz).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3455, 3295, 2938, 1636, 1477, 1388, 1305, 1265.

SIMS m/z: 436, (M+3), 435, 434, 234, 202, 201.

9. példa

(9) vegyület előállítása

Kiindulási anyagként 55 mg (0,95 mmol) 6. referenciapélda szerinti (c) vegyületet alkalmazzuk, az 1. példában leírtak szerint járunk el, így 37,5 mg (70%) (9) vegyületet kapunk.

A (9) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (100 MHz, CDCl) δ (ppm): 9,49 (1H, br s), 8,45 (1H, br s), 8,02 (1H, s), 7,01 (1H, d, J = 2,4 Hz), 6,90 (1H, s), 5,33 (1H, m), 4,9–4,5 (3H, m), 4,1–3,8 (1H, m), 4,05 (3H, s), 3,94 (3H, s), 3,91 (3H, s), 3,24 (1H, t, J = 10,4 Hz), 2,73 (3H, s), 1,44 (6H, d, J = 6,0 Hz), 1,07 (9H, s), 0,36 (6H, s).

10. példa

(10) és (11) vegyületek előállítása

37 mg (0,052 mmol) (9) vegyületet 4 ml tetrahidrofuránban feloldunk, majd az oldathoz 0,5 ml 0,5 mólos foszfát puffer oldatot (pH = 4) és 0,52 ml (0,052 mmol) 0,1 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluorid oldatot adunk jeges hűtés közben, majd az elegyet 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyet ezután 2n sósav-oldathoz adjuk, majd etil-acetáttal extrahálunk. Az etil-acetátos fázist telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket kromatográfiával tisztítjuk (ehhez szilikagéllel töltött oszlopot, 10 ml szilikagélt, eluálószerként n-hexán és etil-acetát 2:1 arányú elegyét alkalmazzuk); így 11 mg (38%-os hozam) (10) és 12 mg (44%-os hozam) (11) vegyületet kapunk.

A (10) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl) δ (ppm): 10,16 (2H, br s), 9,42 (1H, br s), 8,44 (1H, s), 6,94 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,82 (1H, s), 5,26 (1H, qq, J = 6,3; 6,3 Hz), 4,67 (1H, d, J = 10,3 Hz), 4,55 (1H, m), 4,43 (1H, m), 4,1–3,8 (1H, m), 3,98 (3H, s), 3,96 (3H, s), 3,89 (3H, s), 3,27 (1H, t, J = 10,2 Hz), 2,56 (3H, s), 1,38 (3H, d, J = 6,3 Hz), 1,36 (3H, d, J = 6,3 Hz).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3325, 1684, 1589, 1494, 1428, 1316, 1218, 1102.

SIMS m/z: 556 (M+1), 522, 323, 234, 213.

A (11) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl) δ (ppm): 11,59 (1H, br s), 9,45 (1H, br s), 7,12 (1H, s), 6,96 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,81 (1H, s), 5,16 (1H, qq, J = 6,3; 6,3 Hz), 4,45 (2H, m), 4,07 (3H, s), 3,94 (3H, s), 3,90 (3H, s), 3,69 (1H, m), 2,63 (3H, s), 2,41 (1H, dd, J = 7,5; 3,3 Hz), 1,38 (1H, m), 1,36 (3H, d, J = 6,3 Hz), 1,35 (3H, d, J = 6,2 Hz).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3470, 3190, 1695, 1635, 1608, 1385, 1292, 1264, 1100.

SIMS m/z: 522 (M+3), 521, 520, 506, 289, 234, 213.

11. példa

(12) vegyület előállítása

38,5 mg (0,049 mmol) 9. referenciapélda szerint előállított (d) vegyületet 3,9 ml toluolban feloldunk, az oldathoz 12,6 mg (0,054 mmol) kámfor-szulfonsavat adunk, majd az elegyet 50 °C hőmérsékleten 5 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután nátrium-hidrogén-karbonátot adunk, majd kloroformmal extrahálunk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatográfiás úton tisztítjuk (12 ml szilikagél és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 5:1 arányú elegye); így 30,4 mg (80%-os hozam) (12) vegyületet kapunk:

A (12) vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai:

^{1}H-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,38 (1H, br s), 8,35 (1H, br s), 7,92 (1H, s), 7,6–7,2 (5H, m), 6,92 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,82 (1H, s), 5,50 és 5,28 (2H, ABq, J = 12,4 Hz), 4,8–4,4 (3H, m), 4,00 (3H, s), 3,89 (3H, s), 3,86 (3H, s), 3,72 (1H, m), 3,18 (1H, t, J = 9,4 Hz), 2,68 (3H, s), 1,06 (9H, s), 0,38 (6H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3460, 1696, 1628, 1418, 1308, 840.

EIMS m/z: 763, 761 (M^+), 683, 591, 530, 528, 447, 358, 300, 234, 91.

12. példa

(13) vegyület előállítása

50 mg (0,073 mmol) (1) vegyületet 5 ml tetrahidrofuránban feloldunk, az oldathoz 0,087 ml (0,087 mmol) 1,0 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluoridot adunk, majd az oldatot szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez 0,2 mólos foszfát-puffer oldatot (pH = 7) adunk, ezután kloroformmal extrahálunk. A kloroformos fázisokat telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, majd vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, ezután csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyerstermékhez 5 ml acetonitrilt és 0,1 ml 48%-os hidrogén-bromid-oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 2 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután 0,2 mólos citrát puffer oldatot (pH = 4) adunk, majd a kapott elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyerstermékhez 5 ml piridint és 0,067 ml (0,73 mmol) N,N-dimetil-karbamoil-kloridot adunk 0 °C hőmérsékleten, majd az elegyet 0 °C–szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten 5 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután 1n sósav oldatot adunk, majd a kapott elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, ezután telített vizes nátrium-klorid oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatográfiás úton tisztítjuk (ehhez 20 ml szilikagélt, eluálószerként kloroform és metanol 100:1 arányú elegyét alkalmazzuk); így 32 mg (67%) (13) vegyületet kapunk.

A (13) vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,37 (1H, br s), 9,09 (1H, br s), 8,14 (1H, s), 7,00 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,90 (1H, s), 4,73 (1H, br d, J = 9,7 Hz), 4,58 (2H, m), 4,08 (3H, s), 3,97 (3H, s), 3,95 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,81 (1H, dd, J = 9,9; 2,3 Hz), 3,22 (1H, dd, J = 9,9; 9,9 Hz), 3,20 (3H, s), 3,07 (3H, s), 2,59 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3470, 3300, 2946, 1701, 1411, 1313, 1217, 1167, 1109.

SIMS m/z: 645, 643 $(M+1)^+$, 565, 411, 409, 234.

13. példa

(14) vegyület előállítása

10 mg (0,015 mmol) (1) vegyületet 2 ml tetrahidrofuránban feloldunk, az oldathoz 0,020 ml (0,020 mmol) 1,0 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluorid-oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. Ezután a reakcióelegyhez 0,2 mólos foszfát-puffer-oldatot (pH = 7) adunk, majd etil-acetáttal extrahálunk. Az etil-acetátos extraktumot telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. A kapott nyerstermékhez 2 ml acetonitrilt és 1 ml 1 mólos hidrogén-bromid oldatot adunk, ezután az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. Az elegyhez 0,2 mólos citrát-puffer oldatot (pH = 4) adunk, majd a kapott elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázisokat telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket 1 ml diklór-metánban feloldjuk, majd az oldathoz 0,004 ml (0,029 mmol) trietil-amint és 6 mg (0,03 mmol) klór-hangyasav-p-nitrofenil-észternek 1 ml diklór-metánnal készült oldatát adjuk 0 °C hőmérsékleten, majd az elegyet 0 °C-on 1 óra hosszat keverjük. Ezután a reakcióelegyhez 0,004 ml (0,045 mmol) piperidint adunk, és az elegyet 0 °C és szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten 24 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez n sósav-oldatot adunk, majd kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, ezután telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket kromatográfiás úton tisztítjuk, ehhez szilikagéllel töltött oszlopot használunk (20 ml szilikagél, eluálószerként n-hexán/etil-acetát 1:2 arányú elegye szerepel); így 6 mg (58%) (14) vegyületet kapunk.

A (14) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,38 (1H, br s), 9,09 (1H, br s), 8,14 (1H, s), 7,00 (1H, d, J = 2,4 Hz), 6,90 (1H, s), 4,74 (1H, dd, J = 10,3; 1,0 Hz), 4,61 (2H, m), 4,07 (3H, s), 3,96 (3H, s), 3,95 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,81 (1H, dd, J = 9,9; 2,1 Hz), 3,69 (2H, br), 3,54 (2H, br), 3,22 (3H, dd, J = 10,1; 10,1 Hz), 2,59 (3H, s), 1,68 (6H, br).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3470, 3250, 2940, 2858, 1698, 1491, 1410, 1312, 1255, 1214, 1165, 1109.

SIMS m/z: 685, 683 $(M+1)^+$, 605, 234.

14. példa

(15) vegyület előállítása

30 mg (0,44 mmol) (1) vegyületet 6 ml tetrahidrofuránban feloldunk, az oldathoz 0,053 ml (0,053 mmol) 1,0 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluorid oldatot adunk, majd az oldatot szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután 0,2 mólos foszfát puffer oldatot (pH = 7) adunk, majd kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-klorid oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. A kapott nyerstermékhez 6 ml acetonitrilt és 3 ml 1 mólos hidrogén-bromid-oldatot adunk, ezután 1 óra hosszat szobahőmérsékleten keverjük. A kapott elegyhez 0,2 mólos citrát puffer oldatot (pH = 4) adunk, majd az elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-kloriddal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket 3 ml diklór-metánban feloldjuk, majd ehhez 0,012 ml (0,088 mmol) trietil-amint és 17,6 mg (0,088 mmol) klór-hangyasav-p-nitro-fenil-észternek 3 ml diklór-metánnal készült oldatát adjuk –10 °C hőmérsékleten, ezután az elegyet –10 és 0 °C

közötti hőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. Ezután az elegyhez 0,011 ml (0,13 mmol) pirrolidint adunk, a reakcióelegyet 0 °C és szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután 1n sósav-oldatot adunk és kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket kromatográfiás úton tisztítjuk, ehhez szilikagéllel töltött oszlopot (30 ml szilikagélt és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 1:2 arányú elegyét használjuk); így 19 mg (65%) (15) vegyületet kapunk.

A (15) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,36 (1H, br s), 9,06 (1H, br s), 8,16 (1H, s), 7,00 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,90 (1H, s), 4,74 (1H, dd, J = 10,2; 1,0 Hz), 4,63 (1H, m), 4,55 (1H, dd, J = 10,1; 2,4 Hz), 4,08 (3H, s), 3,97 (3H, s), 3,95 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,81 (1H, dd, J = 10,4; 2,1 Hz), 3,67 (2H, t, J = 6,5 Hz), 3,52 (2H, t, J = 6,6 Hz), 3,22 (1H, dd, J = 10,1; 10,1 Hz), 2,65 (3H, s), 1,99 (4H, m).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3230, 2942, 1699, 1490, 1415, 1312, 1216, 1109.

SIMS m/z: 671, 669 $(M+1)^+$, 591, 234.

15. példa

(16) vegyület előállítása

30 mg (0,044 mmol) (1) vegyületet 6 ml tetrahidrofuránban oldunk, az oldathoz 0,053 ml (0,053 mmol) 1,0 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluorid-oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez 0,2 mólos foszfát puffer oldatot (pH = 7) adunk, majd a kapott elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-klorid oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. A kapott nyerstermékhez 6 ml acetonitrilt és 0,1 ml 48%-os hidrogén-bromid-oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez 0,2 mólos citrát puffer oldatot (pH = 4) adunk, majd a kapott elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket 3 ml diklór-metánban feloldjuk, majd az oldathoz 0,012 ml (0,088 mmol) trietil-amint és 17,6 mg (0,088 mmol) klór-hangyasav-p-nitrofenil-észtert adunk +10 °C hőmérsékleten, majd az elegyet –10 °C és 0 °C közötti hőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. Ezután a reakcióelegyhez 0,015 ml (0,13 mmol) N-metil-piperazint adunk, az elegyet 0 °C hőmérsékleten 24 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez 1n sósav oldatot adunk, majd kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd ezután telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítjuk, ehhez szilikagéllel töltött oszlopot (30 ml szilikagélt, eluálószerként kloroform és metanol 50:1 arányú elegyét használjuk); így 18 mg (58%) (16) vegyületet kapunk.

A (16) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,34 (1H, br s), 8,81 (1H, br s), 8,15 (1H, s), 6,99 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,90 (1H, s), 4,74 (1H, dd, J = 10,2; 1,2 Hz), 4,63 (2H, m), 4,08 (3H, s), 3,97 (3H, s), 3,95 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,82 (1H, dd, J = 9,9; 2,2 Hz), 3,78 (2H, br), 3,64 (2H, br), 3,23 (1H, dd, J = 10,0; 10,0 Hz), 2,70 (3H, s), 2,50 (4H, br), 2,37 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3475, 3232, 2944, 1698, 1491, 1410, 1313, 1217, 1110.

SIMS m/z: 700, 698 $(M+1)^+$, 466, 464, 339, 234.

16. példa

(17) vegyület előállítása

20 mg (0,029 mmol) (1) vegyületet 2 ml tetrahidrofuránban feloldunk, az oldathoz 0,044 ml (0,044 mmol) 1,0 mólos, tetrahidrofuránnal készült tetra-n-butil-ammónium-fluorid-oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez 0,2 mólos foszfát puffer oldatot (pH = 2) adunk, majd az elegyet etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos fázist telített vizes nátrium-kloriddal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. A kapott nyerstermékhez 2 ml acetonitrilt és 1 ml 6n sósav-oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 2 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután 0,2 mólos citrát-puffer oldatot (pH = 4) adunk, majd etil-acetáttal extrahálunk. Az etil-acetátos fázist telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. A kapott nyerstermékhez 0 °C hőmérsékleten 2 ml piridint és 0,027 ml (0,29 mmol) N,N-dimetil-karbamoil-kloridot adunk, majd az elegyet 0 °C hőmérsékleten 24 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyhez ezután 1n sósav-oldatot adunk, majd kloroformmal extrahálunk. A kloroformos fázist csökkentett vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd ezt követően telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket oszlopkromatográfia segítségével tisztítjuk, ehhez 20 ml szilikagélt és eluálószerként kloroform és metanol 80:1 arányú elegyét alkalmazzuk; így 15 mg (86%-os hozam) (17) vegyületet kapunk.

A (17) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,34 (1H, br s), 8,86 (1H, br s), 8,16 (1H, s), 6,99 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,89 (1H, s), 4,77 (1H, br, d, J = 9,1 Hz), 4,55 (1H, m), 4,09 (3H, s), 3,95 (3H, s), 3,94 (4H, br s), 3,92 (3H, s), 3,35 (1H, dd, J = 10,0; 10,0 Hz), 3,20 (3H, s), 3,07 (3H, s), 2,67 (3H, s).

IR (KBR) ν (cm^{-1}): 2940, 1702, 1697, 1490, 1382, 1313, 1219, 1175, 1110.

SIMS (m/z): 599 $(M+1)^+$, 366, 294, 234.

17. példa

(18) vegyület előállítása

300 mg (0,429 mmol) (16) vegyületet 30 ml etanolban feloldunk, majd az oldathoz 5 ml 5,88 n, metanollal készült sósav-oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyet csökkentett nyomáson betöményítjük, így 279 mg (88%) (18) vegyületet kapunk.

A (18) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12,13 (1H, br s), 11,30 (1H, d, J = 1,0 Hz), 10,70 (1H, br s), 7,93 (1H, s), 7,00 (1H, d, J = 1,9 Hz), 6,97 (1H, s), 4,65 (1H, dd, J =9,9 Hz), 4,46 (3H, m), 4,14 (2H, br), 3,94 (3H, s), 3,85 (3H, s), 3,82 (3H, s), 3,80 (3H, s), 3,58 (2H, br), 3,49 (4H, br), 3,4 (1H, dd, J = 9,3; 9,3 Hz), 2,84 (3H, br s), 2,69 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 2948, 1719, 1697, 1609, 1492, 1414, 1312, 1220, 1168, 1109, 1088.

18. példa

(19) vegyület előállítása

Kiindulási anyagként 30 mg (0,044 mmol) (1) vegyületet alkalmazunk; a 15. példában leírtak szerint járunk el, azzal az eltéréssel, hogy 6n sósav-oldatot használunk az ott említett 48%-os hidrogén-bromid-oldat helyett; így 19 mg (66%-os hozam) (19) képletű vegyületet kapunk.

A (19) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 2940, 1698, 1637, 1491, 1410, 1314, 1218, 1154, 1109.

SIMS m/z: 654 $(M+1)^+$, 420, 234.

19. példa

(20) vegyület előállítása

17 mg (0,026 mmol) (19) vegyületet 1 ml etanolban feloldunk, majd az oldathoz 0,04 ml etanolos 5,8n hidrogén-klorid-oldatot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyet csökkentett nyomáson betöményítjük, így 18 mg (100%-os hozam) (20) képletű vegyületet kapunk.

A (20) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12,13 (1H, br s), 11,30 (1H, br s), 10,72 (1H, br s), 7,93 (1H, s), 7,00 (1H, d, J = 2,0 Hz), 6,96 (1H, s), 4,65 (1H, dd, J = 10,2, 9,6 Hz), 4,43 (3H, m), 4,15 (2H, br), 3,94 (3H, s), 3,85 (3H, s), 3,82 (3H, s), 3,80 (3H, s), 3,61 (2H, br), 3,51 (5H, br), 2,84 (3H, br s), 2,69 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 2946, 1700, 1609, 1527, 1491, 1410, 1313, 1217, 1172, 1109, 1090.

1. referenciapélda

A beoltáshoz Streptomyces lydicus DO-89-et (FERM BP-988) használunk. A törzset 200 ml talajjal inokuláljuk [a táptalaj 25 g/l oldható keményítőt, 5 g/l glükózt, 1 g/l élesztőextraktumot, 10 g/l pepton-A-t (Kyokuto Pharmaceutical Co., Ltd) és 1 g/l kalcium-karbonátot tartalmaz sterilezés előtt; az elegy pH-ja 7,2], a műveletet 2 l-es Erlenmeyer lombikban végezzük, majd a lombikot 28 °C hőmérsékleten 48 óra hosszat rázatjuk (200 r.p.m.).

A kapott tenyészetet 30 l-es fermentorba visszük, amely 15 l fenti összetételű táptalajt tartalmaz, az átvitt tenyészet aránya 5% (térfogat%), majd a tenyésztést keverés és levegőztetés közben (rotáció: 200 r.p.m.; levegőztetés 15 l/perc) 28 °C hőmérsékleten 24 óra hosszat folytatjuk. Az így kapott tenyészetet 200 l-es tankfermentorba visszük, amely 150 l fermentációs táptalajt tartalmaz, ennek összetételét az alábbiakban adjuk meg; az előbbi táptalajból 10% (térfogat%) mennyiségű tápanyagot hozunk át, majd a tenyésztést keverés és levegőztetés közben (rotáció: 200 r.p.m., levegőztetés: 15 l/perc) 28 °C hőmérsékleten folytatjuk. A fermentációs táptalaj összetétele: 50 g/l maltóz, 15 g/l száraz élesztő, 25 g/l Ebios (Asahi Breweries, Ltd.), 10 g/l KCl, 0,5 g/l KH_2PO_4, 0,5 $MgSO_4.7H_2O$, 5 g/l kalcium-karbonát (pH = 5,0; ezt 6n H_2SO_4-gyel a sterilezés előtt állítjuk be).

A tenyésztést 100 óra hosszat folytatjuk anélkül, hogy a táptalaj pH-ját ellenőriznénk. A sejteket és a csapadékot a táptalajból szűréssel elkülönítjük, így 100 l szűrletet kapunk. Az elkülönített sejtekhez és csapadékhoz 50 l n-propanolt adunk, majd ezt elkeverjük, az elegyet leszűrjük, így 45 l n-propanol extraktumot kapunk. A táptalaj szűrletet és az n-propanol extraktumot egyesítjük (össz térfogat 140 l), majd az elegyet 5 l Diaion HP20-on (Mitsubishi Kasei Corporation gyártmánya) átengedjük, így a hatóanyagot abszorbeáltatjuk. Az oszlopot vízzel, majd 70%-os vizes metanollal átmossuk, ezután metanollal eluálunk. A metanollal eluált frakciókat betöményítjük, a koncentrátumot 10 l etil-acetáttal extrahálják. Az etil-acetátos extraktumot betöményítjük, majd a koncentrátumhoz n-hexánt adunk, így nyers DC-89A2-t kapunk por alakú termék formájában. A nyers DC-89A2 port ezután metanolból átkristályosítjuk, 1 g tiszta DC-89A2-t kapunk.

2. referenciapélda

Az 1. referenciapéldában leírtak szerint tenyésztést végzünk, azzal az eltéréssel, hogy a fermentációs közeg az alábbi összetétellel rendelkezik:

A fermentációhoz alkalmazott táptalaj összetétele: 50 g/l maltóz, 15 g/l száraz keményítő, 25 g/l Ebios (Asahi Breweries Ltd.), 10 g/l KBr, 0,5 g/l KH_2PO_4, 0,5 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 5 g/l kalcium-karbonát (pH = 5,0; amit a sterilezést megelőzően 6n H_2SO_4-gyel állítunk be).

A kapott táptenyészet pH-ját 12n HCl oldat segítségével 4,5 értékre állítjuk be, a tenyészetből a sejteket és a csapadékot szűréssel elkülönítjük, így 100 l szűrletet kapunk. Az elkülönített sejtekhez és csapadékhoz 50 l n-propanolt adunk, majd az elegyet alaposan elkeverjük, ezután leszűrjük, így 45 l n-propanol extraktumot kapunk. A tenyészet szűrletét és a n-propanol extraktumot egyesítjük (össz térfogat: 140 l), majd az elegyet 5 l Diaion HP-20 (Mitsubishi Kasei Corporation) engedjük át, így a hatóanyagot abszorbeáltatjuk. Ezután az oszlopot vízzel, majd 70%-os vizes metanollal mossuk, ezután metanollal eluálunk, amikor is metanolos frakciókat kapunk, amely DC-89B1-et, továbbá olyan metanolos frakciókat kapunk, amely DC-89B2-t tartalmaz. A DC-89B1-et tartalmazó frakciókat betöményítjük, a koncentrátumot 200 ml Diaion HP-20SS-n en-

gedjük át (Mitsubishi Kasei Corporation), majd 4,0 pH-jú, 80%-os vizes metanollal eluálunk. A DC-89B1-et tartalmazó frakciókat betöményítjük, a koncentrátumot etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos extraktumot betöményítjük, majd a koncentrátumhoz n-hexánt adunk, így 0,5 g tiszta DC-89B1-t kapunk.

A DC-89B2 tartalmú, metanollal készült frakciókat betöményítjük, majd a koncentrátumot 500 ml Diaion HP-20SS-n engedjük át (Mitsubishi Kasei Corporation), ezután 4,0 pH-jú, 85%-os vizes metanollal eluálunk. A DC-89B2-t tartalmazó frakciókat betöményítjük, majd a koncentrátumot etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos extraktumot betöményítjük, a maradékhoz n-hexánt adunk, így nyers DC-89B2-t kapunk poralakú termék formájában. A nyers DC-89B2-t metanolból átkristályosítva 1,5 g tiszta DC-89B2-t kapunk.

3. referenciapélda

(e) vegyület előállítása

123 mg 2. referenciapélda szerint kapott DC-89B2-t és 43 mg imidazolt 3,0 ml DMF-ben feloldunk, majd az oldathoz jeges hűtés közben 50 mg terc-butil-dimetil-szilil-kloridot adunk. Négy és fél óra hosszat az elegyet keverjük, majd 2n sósav-oldatot adunk a reakcióelegyhez, ezután etil-acetáttal extrahálunk. Az etil-acetátos fázist egymást követően telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal, majd telített vizes nátrium-klorid oldattal mossuk, ezután vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk. Az oldószert csökkentett nyomáson végzett desztillációval eltávolítjuk, majd a maradékot szilikagéllel töltött oszlopon kromatografáljuk (ehhez 30 ml szilikagélt és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 3:1 arányú elegyét alkalmazzuk); így 140 mg (95%-os hozam) (e) vegyületet kapunk.

Az (e) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,38 (1H, br.s), 8,23 (1H, br.s), 6,95 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,87 (1H, s), 5,04 (1H, br), 4,62 (1H, dd, J = 10,6; 9,1 Hz), 4,54 (1H, dd, J = 10,6; 4,4 Hz), 4,17 (1H, m), 4,06 (3H, s), 4,06 (1H, dd, J = 10,3; 3,0 Hz), 3,99 (3H, s), 3,91 (3H, s), 3,78 (3H, s), 3,57 (1H, dd, J = 9,8; 9,1 Hz), 1,69 (3H, s), 1,06 (9H, s), 0,36 (3H, s), 0,35 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 1745, 1700, 1618, 1497, 1293, 837.

4. referenciapélda

(a) vegyület előállítása

155 mg (0,22 mmol) 3. referenciapélda szerint előállított (e) vegyületet 7 ml allil-alkoholban feloldunk, ehhez az oldathoz 25 mg (0,66 mmol) nátrium-bórhidridet adunk, az oldatot jéggel hűtjük, majd 2 óra 40 percig keverjük. A reakcióelegyet 2n sósav oldathoz öntjük, majd az elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist egymást követően telített, vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyers terméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatografáljuk (ehhez 50 ml szilikagélt, és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 3:1–1:1 arányú elegyét alkalmazzuk); így 115 mg (74%-os hozam) (a) vegyületet kapunk.

Az (a) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,43 (1H, br.s); 7,91 (1H, br.s), 6,9 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,86 (1H, s), 5,31 (1H, br.s), 4,57 (1H, dd, J = 10,6; 8,9 Hz), 4,50 (1H, dd, J = 10,6; 3,91), 4,07 (1H, dd, J = 10,3; 3,2 Hz), 4,05 (3H, s), 3,93 (3H, s), 3,92 (1H, m), 3,91 (3H, s), 3,72 (3H, s), 3,49 (1H, dd, J = 10,1; 9,8 Hz), 2,09 (1H, br.s), 1,60 (3H, s), 1,04 (9H, s), 0,32 (3H, s), 0,30 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3406, 1734, 1621, 1485, 1111, 838.

SIMS m/z: 706, 704 (M+1).

5. referenciapélda

(a) és (b) vegyület előállítása

200 mg (0,28 mmol) (e) vegyületet 12 ml metanolban feloldunk, az oldathoz 23 mg (0,61 mmol) nátrium-bórhidridet adunk jeges hűtés közben, majd az elegyet szobahőmérsékleten 2 óra 40 percig keverjük. A reakcióelegyet ezután 2n sósav oldathoz öntjük, majd kloroformmal extrahálunk. A kloroformos fázist egymást követően telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyersterméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatografáljuk (ehhez 100 ml szilikagélt, és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 4:1–2:1 arányú elegyét alkalmazzuk); így 81 mg (40%-os hozam) (a) vegyületet, valamint 12 mg (6,5%-os hozam) (b) vegyületet kapunk.

A (b) vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai:

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,43 (1H, br.s); 7,87 (1H, br.s), 6,88 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,85 (1H, s), 4,90 (1H, d, J = 5,7 Hz), 4,55 (1H, dd, J = 10,3; 9,3 Hz), 4,40 (1H, dd, J = 10,8; 5,2 Hz), 4,05 (1H, m), 4,05 (3H, s), 3,93 (3H, s), 3,89 (3H, s), 3,81 (1H, dd, J = 10,1; 3,4 Hz), 3,71 (1H, m), 3,49 (1H, dd, J = 10,1; 9,6 Hz), 1,37 (1H, d, J = 6,9 Hz), 1,01 (9H, s), 0,30 (3H, s), 0,29 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3450, 2934, 1618, 1486, 1309, 840.

EIMS m/z: 629, 627 ($M-H_2O$).

6. referenciapélda

(c) képletű vegyület előállítása

300 mg (0,43 mmol) (e) vegyületet 10 ml izopropil-alkoholban feloldunk, az oldathoz 26 mg (0,69 mmol) nátrium-bórhidridet adunk jeges hűtés közben, majd az elegyet szobahőmérsékleten 10 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyet 2n sósav-oldathoz öntjük, majd kloroformmal extrahálunk. A kloroformos fázist egymást követően telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. Az így kapott nyers terméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatografáljuk (ehhez 50 ml szilikagélt és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 3:1 arányú elegyét alkalmazzuk); így 55 mg (18%-os hozam) (c) vegyületet és 128 mg (42%-os hozam) (a) vegyületet kapunk.

A (c) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

^{1}H-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,43 (1H, br.s), 7,90 (1H, s), 6,90 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,86 (1H, s);

5,31 (1H, d, J = 10,4 Hz), 4,98 (1H, m), 4,7–4,4 (2H, m), 4,2–3,7 (2H, m), 4,04 (3H, s), 3,92 (3H, s), 3,90 (3H, s), 3,45 (1H, t, J = 9,2 Hz), 2,09 (1H, d, J = 10,0 Hz), 1,22 (3H, d, J = 6,4 Hz), 1,18 (3H, d, J = 6,4 Hz), 1,04 (9H, s), 0,31 (3H, s); 0,28 (3H, s).

7. referenciapélda

(d) képletű vegyület előállítása

72,4 mg (0,10 mmol) (e) vegyületet 3,6 ml benzil-alkoholban feloldunk, az oldathoz 14,2 mg (0,10 mmol) vízmentes kálium-karbonátot adunk, majd az elegyet 20 óra hosszat szobahőmérsékleten keverjük. Az elegyhez jeges hűtés közben 206 µl (0,21 mmol) n sósav-oldatot, 16,6 mg (0,44 mmol) nátrium-bórhidridet adunk, majd az elegyet 2 óra hosszat keverjük. Ezután a reakcióelegyhez n sósav-oldatot adunk, majd etil-acetáttal extrahálunk. Az etil-acetátos fázist egymást követően telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, majd telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül csökkentett nyomáson betöményítjük. A kapott nyerstermékből azeotrópos desztilláció segítségével a benzil-alkoholt eltávolítjuk, az azeotrópos desztillációhoz terc-butil-benzolt használunk, a kapott terméket szilikagéllel töltött oszlopon kromatográfiás úton tisztítjuk (ehhez 22 ml szilikagélt és eluálószerként n-hexán/etil-acetát 4:1 arányú elegyét alkalmazzuk); 40,3 mg (50%-os hozam) (d) vegyületet kapunk.

A (d) vegyület fizikai-kémiai jellemzői:

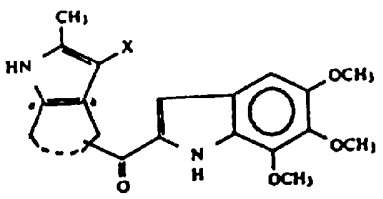
^{1}H-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,40 (1H, br.s); 7,84 (1H, s); 7,4–7,1 (5H, m), 6,84 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,80 (1H, s), 5,27 (1H, d, J = 9,6 Hz), 5,07 (2H, s), 4,7–4,3 (3H, m), 4,1–3,7 (1H, m), 4,00 (3H, s), 3,89 (3H, s), 3,86 (3H, s), 3,42 (1H, t, J = 9,0 Hz); 2,13 (1H, d, J = 9,6 Hz), 1,59 (3H, s), 1,02 (9H, s), 0,30 (3H, s), 0,27 (3H, s).

IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3450, 2936, 1730, 1623, 1483, 1311, 838.

EIMS m/z: 781, 779 (M^+), 701, 699, 548, 546, 448, 396, 394, 314, 234, 91.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

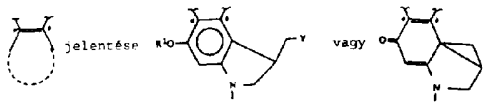
1. Az (I) általános képletű vegyületek,



valamint ezek gyógyászatilag megfelelő sói, ahol a képletben

X jelentése hidrogénatom vagy CO_2R^1, ahol

R^1 jelentése hidrogénatom, egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkil-, allil- vagy benzilcsoport,

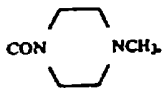


amelyben Y jelentése klór- vagy brómatom;

R^2 jelentése hidrogénatom, COR_3-csoport (ahol a képletben R^3 jelentése egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport), $CONR^4R^5$ csoport (ahol a képletben R^4 és R^5 jelentése egymástól függetlenül egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport),

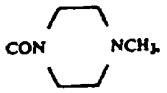


(ahol a képletben n jelentése 4 vagy 5),



CO_2R^6 csoport (ahol a képletben R^6 jelentése egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport vagy allilcsoport), vagy $SiR^7R^8R^9$ (ahol a képletben R^7, R^8 és R^9 jelentése egymástól függetlenül egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport).

2. Az 1. igénypont szerinti vegyületek és ezek gyógyászatilag megfelelő sói, ahol a képletben R^2 jelentése $CONR^4R^5$ vagy



képletű csoport.

3. A 2. igénypont szerinti vegyületek, ahol R^4 és R^5 jelentése metilcsoport.

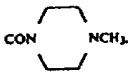
4. Az 1. igénypont szerinti vegyületek, ahol a képletben X jelentése CO_2R^1 képletű csoport.

5. A 4. igénypont szerinti vegyületek, ahol a képletben R^1 jelentése egyenes vagy elágazó láncú 1–4 szénatomos alkilcsoport.

6. Az 5. igénypont szerinti vegyületek, ahol a képletben R^1 jelentése metilcsoport.

7. A 6. igénypont szerinti vegyület, ahol a képletben Y jelentése brómatom; R^2 jelentése $CON(CH_3)_2$ képletű csoport.

8. A 6. igénypont szerinti vegyületek, ahol a képletben Y jelentése brómatom; R^2 jelentése



képletű csoport.

9. Gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy ezek daganatok ellen hatásos mennyiségben valamely 1. igénypont szerint meghatározott vegyületet, továbbá gyógyászatilag megfelelő segéd- és vivőanyagot tartalmaznak.