

3339/95

07081

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

77 355

61-572/SZE

K I V O N A T

Amino-ciklopentán-származékok

Képletű, a-ciklopentán-származékok, elhár. ezek általános képletű, a-ciklopentán-származékok

Seikagaku Kogyo Kabushiki Kaisha, TOKIÓ, JAPÁN

A bejelentés napja: 1995. 11. 22.

Elsőbbsége: 1994. 11. 22. (6-311264),

^A
JAPÁN

A találmány tárgya általános képletű, a-ciklopentán-származékok
~~képletű, (1), (2) általános képletű, (4), (5) képletű, továbbá~~
~~(b), (d), (d-1) és (d-2) képletű amino-ciklopentán-származékok,~~
ahol az (1) és (2) általános képletben

R₁ jelentése hidrogénatom, és ugyanakkor

R₂ jelentése hidroxil-csoport, vagy pedig

R₁ jelentése hidroxil-csoport, és ugyanakkor

R₂ jelentése hidrogénatom; és

R₃ jelentése helyettesített vagy helyettesítetlen aril-
csoport, vagy 1-10 szénatomos alkilcsoport, alkenil-
csoport, alkinilcsoport vagy hidroxil-alkil-csoport.

A találmány tárgya továbbá eljárás az (1) általános
kép-

letű vegyületek, valamint a (b) képletű vegyület előállítására.

Az (1) általános képletű vegyületek előállítására a
találmány értelmében úgy járnak el, hogy a (3) általános képletű
tiokarbamid-származékokat a kívánt gyűrűs izokarbamid-származé-
kokká alakítják, ahol a (3) általános képletben

Találmány képlet (1)

fin

3339/95

37091

61.572/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

A

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Közzététel: ciklopentán-származékok, amelyek ezek előállításán és ezeket tartalmazó anyagok készítését eredményezik

Amino-ciklopentán-származékok

Seikagaku Kogyo Kabushiki Kaisha, TOKIÓ, JAPÁN

Feltalálók:

OGAWA Seiichiro, TOKIÓ,

UCHIDA Chikara, AICHI,

KIMURA Hiroshi, SAITAMA,

INOKUCHI Jin-ichi, TOKIÓ,

JAPÁN

A bejelentés napja: 1995. 11. 22.

Elsőbbsége: 1994. 11. 22. (6-311264), JAPÁN

A jelen találmány tárgyát új szerkezetű amino-ciklo-pentán-származékok, továbbá az ezek előállításához használható köztitermékek képezik. Részletesebben, a találmány tárgyát glikozidáz inhibitorok (glikozidáz enzimeket gátló anyagok) képezik.

A közelmúltban folytatott vizsgálatok felderítették a sejtek felszínén levő cukorláncok biológiai szerepeit. Így az ezen cukorláncokat felépítő vagy azokat lebontó enzimek inhibitoraira irányult a figyelem, és széleskörű kémiai vizsgálatok kezdődtek. Továbbá, a közelmúlt éveiben a különböző glikozidáz enzimek specifikus inhibitorainak kifejlesztése került az érdeklődés középpontjába. Kísérletek folytak például a maltázt nem gátló, de a szacharázt gátló vegyületek kifejlesztésére (bár mindkét enzim egyaránt α -glükózid hidroláz), valamint olyan vegyületek előállítására, amelyek egy állati eredetű enzimet nem gátolnak, de egy rovarokból származót igen. A kutatás jelenlegi szakaszában általában úgy közelítik meg e célokat, hogy a célenzim által *in vivo* körülmények között ténylegesen elhidrolizált cukorlánc szerkezete szerint tervezik meg az inhibitorokat. Így glikózid hidroláz inhibitorokként úgynevezett szacharid-analógokat alkalmaztak, ahol a lead (vezér-) vegyületek egyszerű szerkezetű anyagok voltak. E szacharid-analógok között megkülönböztetünk karbaszacharidokat, azaszacharidokat, tiaszacharidokat, foszfaszacharidokat és más, hasonlókat.

Megfigyeltek olyan vegyületeket, amelyek esetében a fenti módon tervezett és előállított oligoszacharid lánc nem a

megcélzott enzimet látszik gátolni, hanem valamely más enzimet. Ezért a specifikus enzimek kifejlesztése során kapott lead vegyületekkel kapcsolatban többféle probléma is felmerül. E problémák megoldása céljából számos új lead vegyületet állítottak elő és vizsgáltak meg. C-H. Wong és munkatársai tanulmányaik körét az azapiranozokról [G. C. Lock, C. H. Fotsh és C-H. Wong, *Acc. Chem. Res.*, 26, 182 - 190. (1993)] az azafuranózkra [Y-F. Wang, Y. Takaoka és C-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 1242-1244. (1994)] terjesztik ki. Nemrég leírták, hogy amidinvázis vegyületek gátolják a glikozidázokat. Ezért megkíséreltek egy azaszacharidot ezen amidinvázon keresztül beépíteni egy oligoszacharid láncba [a) G. Papandreou, M. K. Tong és B. Ganem, *J. Amer. Chem. Soc.*, 115, 11682 - 11690. (1993); b) Y. Bleriot, A. Genre-Grandpierre és C. Tellier, *Tetrahedron Lett.*, 35, 1867 - 1870. (1994)].

Másrészt, az α -glükozidáz hidrolázok közé tartozik az α -glükozidáz I és II, amelyek az amilázon, maltázon, izomaltázon, szacharázon és trehalázon kívül a sejtben a glikoproteinek bioszintézisét befolyásolják. A közelmúltban nagy erőfeszítéseket tettek arra, hogy az ezen enzimek inhibitorait gyógyszerekként vagy kémiai növényvédőszerekként alkalmazzák; néhány inhibitor már a kereskedelemben kapható. Például az α -amilázt és szacharázt gátló acarbose-t cukorbeteg-ellenes vagy elhízás-ellenes szerként hozták forgalomba (védjegyzett neve: Glucobay, gyártja a Bayer cég). Továbbá a trehalázt gátló validamicineket a csíkos gabonarozsodás ellen használható növényvédőszerekként forgalmazzák (védjegyzett név: Validacin,

Takeda Chemical Industries, Ltd.), és e hatóanyagtól azt remélik, hogy rovarellenes szerként is hatásos lesz. Ezenkívül, az Egyesült Államokban a dezoxi-nodzsirimicin-származékokat mint vírusellenes szereket klinikailag vizsgálják. Továbbá olyan vizsgálatok is folynak, amelyekben az inhibitorokat bizonyos enzimek ismeretlen szerepének tisztázásához kívánják felhasználni. A közelmúltban arról is beszámoltak, hogy a dezoxi-nodzsirimicin (rövidítése: DNJ) AIDS (acquired immune deficiency syndrome, szerzett immunhiányos tünetegyüttes) ellen is hatásos. Ezért a glükózidáz inhibitorok a figyelem középpontjába kerültek, és jelenleg nagy igény van olyan új szerkezetű enzim inhibitorok kifejlesztésére, amelyeket gyógyszerekként és/vagy növényvédőszerként lehet alkalmazni.

A jelen találmány célkitűzése az volt, hogy olyan amino-ciklopentán-származékokat találjunk, amelyek új szerkezetű szacharid-analógok, amelyeknek rendkívül erős α -glükózidáz gátló hatásuk van, és amelyektől azt remélhetjük, hogy gyógyszerekként vagy növényvédőszerként lehet majd használni őket.

A jelen találmány tárgyát az alábbiak képezik:

1) az (1) általános képletű, ahol

R_1 jelentése hidrogénatom, és ugyanakkor

R_2 jelentése hidroximetil-csoport, vagy pedig

R_1 jelentése hidroximetil-csoport, és ugyanakkor

R_2 jelentése hidrogénatom; és

R_3 jelentése helyettesített vagy helyettesítetlen arilcsoport, vagy 1-10 szénatomos alkilcsoport, alkenilcsoport, alkinilcsoport vagy hidroxialkilcsoport,

amino-ciklopentán-származékok;

2) a fenti 1) pont szerinti amino-ciklopentán-származékok, ahol az (1) általános képletű amino-ciklopentán-származékokban

R_3 jelentése helyettesített vagy helyettesítetlen aril-csoport;

3) a fenti 2) pont szerinti amino-ciklopentán-származékok, ahol az (1) általános képletű amino-ciklopentán-származék például az (1-1L) képletű (1S,5R,6S,7S,8R)-6-hidroxi-metil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabiciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, az (1-1D) képletű (1R,5S,6R,7R,8S)-6-hidroxi-metil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabiciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, az (1-2L) képletű (1S,5R,6S,7R,8S)-1-hidroxi-metil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabiciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, vagy az (1-2D) képletű (1R,5S,6R,7S,8R)-1-hidroxi-metil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabiciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol

4) a fenti 1) pont szerinti amino-ciklopentán-származékok, ahol az (1) általános képletű amino-ciklopentán-származékokban

R_3 jelentése 1-10 szénatomos alkilcsoport;

5) a fenti 4) pont szerinti amino-ciklopentán-származékok, ahol az (1) általános képletű amino-ciklopentán-származék például a (2-1L) képletű (1S,5R,6S,7S,8R)-6-hidroxi-metil-3-butil-amino-2-oxa-4-azabiciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, a (2-1D) képletű (1R,5S,6R,7R,8S)-6-hidroxi-metil-3-butil-amino-2-oxa-4-azabiciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, a (2-2L) képletű (1S,5R,6S,7R,8S)-1-hidroxi-metil-3-butil-amino-2-oxa-4-azabiciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, vagy a (2-2D) képletű (1R,5S,6R,7S,8R)-1-hidroxi-metil-3-butil-amino-2-oxa-4-azabiciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol;

- 6) glikozidáz inhibitor készítmények, amelyek hatóanyagként valamely, a fenti 1) pont szerinti amino-ciklopentán-származékot tartalmaznak;
- 7) a fenti 6) pont szerinti glikozidáz inhibitor, ahol az említett glikozidáz inhibitor egy α -glükozidáz inhibitor;
- 8) a fenti 7) pont szerinti glikozidáz inhibitor, ahol az említett hatóanyag valamely, a fenti 2) vagy 4) pont szerinti amino-ciklopentán-származék;
- 9) a fenti 8) pont szerinti glikozidáz inhibitor, ahol az említett hatóanyag valamely, a fenti 3) vagy 5) pont szerinti amino-ciklopentán-származék;
- 10) eljárás a fenti 1) pont szerinti amino-ciklopentán-származékok előállítására, amely abban áll, hogy valamely (3) általános képletű, ahol
- R_1 , R_2 és R_3 jelentése a fenti 1) pontban megadott, tiokarbamid-származékot gyűrűs izokarbamid-származékká alakítunk.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra a HIV (humán immunhiányt okozó vírus) termelésére gyakorolt gátló hatást mutatja be fitohemagglutininnel aktivált, perifériás vérből származó egymagvú sejteken,

a 2. ábra a sejtek összeolvadására (óriássejtek képződésére) gyakorolt gátló hatást mutatja be a HIV-vel fertőzött Molt-4/C18 sejtek és Molt-4/IIIB sejtek együttes tenyésztése esetén.

A jelen találmányt az alábbiakban részletesen ismertetjük.

Úgy tekintjük, hogy a jelen találmány szerinti (1) általános képletű amino-ciklopentán-származékok [a továbbiakban egyszerűen: (1) általános képletű vegyületek] az A-reakcióvázlattal szemléltetett tautomer formákban létezhetnek. Így az (1) általános képletben szereplő folytonos és vele párhuzamos szaggatott vonal e tautomerekre utal. Az (1) általános képlet e vegyületek tetszés szerinti sztereoizomerjeit is jelöli.

Továbbá úgy tekintjük, hogy a gyűrűs izokarbamid- - kötést tartalmazó, biciklusos gyűrűrendszert képviselő (1) általános képletű vegyületekben a hidroxilcsoportok és a hidroximetil-csoportok térállása igen fontos tényező, és nagymértékben befolyásolja a vegyületek enzim inhibitor hatását. Feltételezzük, hogy az (1) általános képletű vegyületek izokarbamid-vázának két nitrogénatomja gyengén bázikus jellegű, és erősen kötődik az aktív centrumhoz, amikor az (1) általános képletű vegyület komplexet képez egy enzimmel. Ezáltal az enzimekre gyakorolt specifikus gátló hatás mértéke minden korábbit felülmúlhat.

Az (1) általános képletű vegyületekben

R_3 jelentése helyettesített vagy helyettesítetlen arilcsoport, vagy 1-10 szénatomos, és előnyösen 3-8 szénatomos alkilcsoport, alkenilcsoport, alkinilcsoport vagy hidroxil-alkil-csoport.

R_3 jelentése előnyösen fenilcsoport vagy butilcsoport.

Az arilcsoport helyettesítője lehet például 1-6 szénatomos alkilcsoport, alkenilcsoport vagy alkinilcsoport, továbbá

halogénatom, hidroxilcsoport, nitrocsoport és/vagy karboxilcsoport.

A jelen találmány szerinti (1) általános képletű vegyületek előnyös képviselői például az (1-1), (1-2), (2-1) és a (2-2) képletű vegyületek.

Az (1-1) és az (1-2) képletű vegyületek egymás szerkezeti izomerjei, másrészt a (2-1) és a (2-2) képletű vegyületek ugyancsak egymás szerkezeti izomerjei. Amint ezt a fenti 3) pontban leírtuk, az (1-1) képletű vegyület az (1-1L) és az (1-1D) szerkezeti képletű enantiomereket foglalja magában. Hasonló módon, amint ezt a fenti 3) pontban leírtuk, az (1-2) képletű vegyület az (1-2L) és az (1-2D) szerkezeti képletű enantiomereket foglalja magában. Ezenkívül, az (1-1) és az (1-2) képletű vegyületek tetszés szerinti diasztereomerek lehetnek, a 6-os, 7-es és 8-as helyzetű hidroxilcsoportok térállása szerint. Amint ezt a fenti 5) pontban leírtuk, a (2-1) képletű vegyület a (2-1L) és a (2-1D) szerkezeti képletű enantiomereket foglalja magában. Hasonló módon, amint ezt a fenti 5) pontban leírtuk, a (2-2) képletű vegyület a (2-2L) és a (2-2D) szerkezeti képletű enantiomereket foglalja magában. Ezenkívül, a (2-1) és a (2-2) képletű vegyületek tetszés szerinti diasztereomerek lehetnek, a 6-os, 7-es és 8-as helyzetű hidroxilcsoportok térállása szerint.

Az (1-1) és (1-2) képletű vegyületek glükózidáz inhibitor hatást mutatnak. E vegyületek mindegyike különösen erősen gátolja az α -glükózidáz enzimeket. E vegyületek HIV-ellenes hatást is kifejtenek. Hasonló módon, a (2-1) és a (2-2) képletű vegyületek is gátolják a glükózidázokat. E vegyületek különösen

erősen gátolják az α -glükoszidáz enzimeket. HIV-ellenes hatást is kifejtenek.

A jelen találmány szerinti (1-1L) és az (1-2L) képletű vegyületeket a B-reakcióvázlattal szemléltetett módon állíthatjuk elő.

E célból először az (a) képletű olefin-származékot [amelyet C. Uchida, T. Yamagishi és S. Ogawa, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 589 - 602. (1994) alatti közleményében leírt módon állítunk elő] feloldunk valamely, nem-keton típusú szerves oldószerben (előnyösen 1,2-diklór-etánban). Ezután az elegyet vizes puffer-oldat jelenlétében semleges pH-n tartjuk, és szoba-hőmérsékleten egy oxidálószer, például egy persavat (például m-klór-perbenzoesavat, perbenzoesavat, monoperoxi-ftálsavat, trifluor-perecetsavat vagy perhangyasavat), vagy pedig egy peroxidot (például dioxiránt) adunk hozzá. Egy másik módszer szerint eljárhatunk úgy is, hogy az elegyhez 0°C és körülbelül a reakcióelegy forrpointja (reflux) közötti hőmérsékleten valamely, hidropoxidot képezni képes fémkatalizátort [például vanádium-pentoxidot (V_2O_5) és tercier-butil-hidropoxidot (tBuOOH); nátrium-wolframátot (Na_2WO_4) és hidrogén-peroxidot (H_2O_2); vagy molibdén-pentoxidot (MoO_5), hexametil-foszfor-sav-triamidot (HMPA) és tercier-butil-hidropoxidot] adunk. Ezután a kapott elegyet 0,5 óra és 120 óra közötti ideig sötétben keverjük, így oxidáljuk a kiindulási (a) képletű vegyületet. Utána a reakcióelegyet valamely, nem alkohol típusú szerves oldószerrel (például kloroformmal, etil-acetáttal vagy más, hasonlókkal) hígítjuk, és egy vizes mosófolyadékkal (nátrium-

tioszulfát telített, vizes oldatával, nátrium-hidrogén-karbonát telített, vizes oldatával vagy más, hasonlókkal) mossuk. Ily módon a (b) képletű (3S,4R,5S,6R,7S)-7-acetamido-4,5,6-tri-O-acetil-1-oxaspiro[2.4]heptán-4,5,6-triolt kapjuk. Az így előállított terméket például kromatográfiás vagy más, hasonló módszerekkel tovább tisztíthatjuk. A (b) képletben

Ac jelentése acetilcsoport.

Ezután a (b) képletű vegyületet feloldjuk egy szerves oldószer vizes oldatában, például N,N-dimetil-formamid vizes oldatában, dimetil-szulfoxid vizes oldatában vagy 2-metoxi-etanol vizes oldatában. Az elegyhez nátrium-acetátot, nátrium-benzoátot vagy más, hasonlókat adunk. A reakcióelegyet szobahőmérséklet és 150°C közötti hőmérsékleten 1 óra és 48 óra közötti ideig keverjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A kapott maradékot egy bázis, például piridin, 4-dimetil-amino-piridin, lutidin vagy trietil-amin jelenlétében, ecetsav-anhidriddel, acetil-kloriddal vagy más, hasonlókkal acetilezzük. A terméket kromatográfiás vagy más, hasonló módszerrel megtisztítva szirupszerű anyag formájában kapjuk a (c) képletű 1L-(1,2,4,5/3)-5-acetamido-1-acetoxi-metil-2,3,4-tri-O-acetil-1,2,3,4-ciklopentán-tetraolt.

Ezután a (c) képletű vegyületet úgy dezacetilezzük, hogy feloldjuk 0,5 mólos és 6 mólos közötti koncentrációjú sósavban vagy kénsavban, és az elegyet szobahőmérséklet és 100°C közötti hőmérsékleten 0,5 óra és 5 óra közötti ideig keverjük. Ezután az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, és a kapott maradékot kationcserélő gyanta [például Dowex 50W-X2,

X4, X8 (kereskedelmi név), Amberlite IR-120B, CG-50 (kereskedelmi név)] vagy más, hasonlók segítségével megtisztítjuk, ily módon a (d) képletű epitrehazolaminhoz, vagyis az 1L-(1,2,4,5/3)-5-amino-1C-hidroximetil-1,2,3,4-ciklopentán-tetraolhoz jutunk, amelyet szirupszerű anyag formájában kapunk.

Egy másik módszer szerint a (d) képletű vegyülethez vezető szintézisúton eljárhatunk úgy is, hogy az (a) képletű vegyületet hidroxilezzük, mégpedig vagy acetone vizes oldatában az (a) képletű vegyületre számított 1 - 5 egyenértéknyi mennyiségű ozmium-tetroxiddal (OsO_4), vagy pedig 0,05 - 1 egyenértéknyi mennyiségű ozmium-tetroxiddal és 1 - 5 egyenértéknyi mennyiségű más oxidálószerrel, például N-metil-morfolin-N-oxiddal, a reakcióidő 1 óra és 72 óra között van. Ezután a kapott terméket acetilezzük, majd a (c) képletű vegyület diasztereomerjeit szilikagélen kromatografálva szétválasztjuk. Ily módon úgy állíthatjuk elő a (c) képletű vegyületet, hogy eközben nem készítjük el a (b) képletű vegyületet mint köztiterméket [J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 589 - 602. (1994)].

Ezt követően a (d) képletű vegyületet feloldjuk egy alkohol vizes oldatában vagy más, hasonló oldószerben. Az elegyhez hozzáadunk 1 - 5 egyenértéknyi mennyiségű fenil-izotiocianátot, és a kapott elegyet 1 óra és 72 óra közötti ideig 0°C és 80°C közötti hőmérsékleten keverjük. Utána az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, és a maradékot általában megoszlásos oszlop-kromatográfiás módszerrel tisztítjuk. Ily módon fehérszínű, szilárd anyag formájában a fenil-tiokarbamid-származékot, vagyis az (e) képletű N-[(1R)-(1,2,3,5/4)-2-hidroxime-

til-2,3,4,5-tetrahidro-ciklopentil]-N'-fenil-tiokarbamidot kapjuk.

Ezután az (e) képletű vegyületet feloldjuk egy keton típusú vagy alkohol típusú oldószerben, az oldathoz hozzáadunk az (e) képletű vegyületre számítva 1 - 10 egyenértéknyi mennyiségű katalizátort (sárga vagy vörös higany-oxidot, ólom-dioxidot, egy alkil-jodidot, trietil-oxónium-tetrafluoro-borátot, metil-triflátot, nátrium-hipoklorit és nátrium-hidroxid keverékét, vagy trifenil-foszfín és azodikarbonsav-dietil-észter keverékét), és az elegyet 1 óra és 72 óra közötti ideig 0°C és körülbelül a reakcióelegy forrpointja (reflux) közötti hőmérsékleten keverjük. Így a gyűrűs izokarbamid-származékhoz jutunk. A kész reakcióelegyet celiten vagy más szűrési segédanyagon átszűrjük, és a szűrőréteget metanollal vagy más, hasonló oldószerekkel kimossuk. A szűrletet egyesítjük a mosófolyadékkal, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az így kapott maradékot vékonyréteg-kromatográfiás vagy más, hasonló módszerrel tisztítjuk, így nagyjából szétválasztjuk az izomereket. Ennek során először a nyers 6-hidroxi-metil-izokarbamid-származékot, vagyis a nyers (1-1L) képletű vegyületet kapjuk. Ezt a nyers-terméket a fent leírt módon kationcserélő gyanta segítségével tisztítjuk, így fehérszínű, szilárd anyag formájában kapjuk az (1-1L) képletű vegyületet.

Ezután a fent leírt vékonyréteg-kromatográfiás tisztítás során másodikként a nyers 1-hidroxi-metil-izokarbamid-származékot, vagyis a nyers (1-2L) képletű vegyületet kapjuk, amelyet a fent leírt módon, kationcserélő gyanta segítségével

tisztítunk, ily módon fehérszínű, szilárd anyag formájában kapjuk az (1-2L) képletű vegyületet.

Az (1-1D) és az (1-2D) képletű vegyületek előállítása céljából a fentiekben leírt eljárást ismételjük meg, azzal az eltéréssel, hogy az (a) képletű vegyület helyett az (ad) képletű sztereoizomert használjuk, amelyet a J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1939 - 1942. (1992) alatti közleményben leírt módon állítunk elő. Így az (1-1D) és az (1-2D) képletű vegyületeket az A- illetve a B-reakcióvázzal szemléltetett módon állíthatjuk elő.

Az A- és B-reakcióvázzatokon feltüntetett módon, az olyan (e) vagy (ed) képletű vegyületeket, amelyek az (1) általános képletben szereplő R_3 csoportnak megfelelő helyzetben fenilcsoportot tartalmaznak, úgy állítjuk elő, hogy a (d) vagy (dd) képletű vegyületeket fenil-izotiocianáttal reagáltatjuk. Hasonló módon, más helyettesítő R_3 csoportot tartalmazó tio-karbamid-származékokat úgy állíthatunk elő, hogy a fenil-izotiocianát helyett a fenilcsoport helyén más, kívánt csoportot tartalmazó izotiocianátot alkalmazunk. Ezután a kapott tiokarbamid-származékot a fentivel azonos módszerrel alakítjuk át a gyűrűs izokarbamid-származékká, és a termék tisztítását is a fentivel azonos módon végezzük el. Ily módon a jelen találmány szerinti bármely, kívánt amino-ciklopentán-származékot előállíthatunk. Más szavakkal, a (2-1L), (2-2L), (2-1D) és a (2-2D) képletű vegyületeket úgy állíthatjuk elő, hogy a fent leírt eljárást ismételjük meg, de a fenil-izotiocianát helyett butil-izotiocianátot használunk.

Várható, hogy a jelen találmány szerinti amino-ciklo- pentán-származékok, és különösen az (1-1), (1-2), (2-1) és a (2-2) képletű vegyületek, amelyek a dezoxi-nodzsirimicinhez (rövidítése: DNJ) hasonló módon endo-helyzetű nitrogénatomot, továbbá a mannosztatinhoz hasonló módon exo-helyzetű nitrogénatomot tartalmazó új vegyületek, alkalmazhatók lesznek új gyógyszerekként és/vagy növényvédőszerekként. Várható továbbá, hogy a jelen találmány szerinti új vegyületekből kiindulva különféle analóg vegyületeket lehet majd előállítani, és ezáltal még specifikusabb származékokhoz lehet jutni.

Így a jelen találmány szerinti vegyületek elősegíthetik azon rendszerek kutatását, amelyek feltehetőleg befolyásolják a glükozidáz inhibitor hatásokkal kapcsolatos, különféle biokémiai kölcsönhatásokat. Így e vegyületeket felhasználhatjuk új gyógyszerek kifejlesztéséhez, ilyen gyógyszerek lehetnek például a vírusellenes szerek, mint például a HIV-ellenes szerek, a szacharidok és lipidek metabolizmusával kapcsolatos betegségek gyógyszerei (például elhízás-ellenes és cukorbetegség-ellenes szerek), az immunrendszert szabályozó gyógyszerek, mint például az immunológiai adjuvánsok (segédanyagok), a rákos áttételeket visszaszorító szerek, a (*Pellicularia sasakii*, *Rhizotonia solani* és más, hasonlóok által okozott) csíkos gabonarozsodás ellen használható növényvédőszerek, baktériumellenes szerek és rovarirtószerek. Miután HIV-ellenes hatásuk is van, a jelen találmány szerinti vegyületeket a kiújuló HIV-fertőzések kezelésére használhatjuk.

A jelen találmányt a továbbiakban, a találmány oltalmi körének szűkítése nélkül, példákkal szemléltetjük.

A példákban az alábbi eljárásokat, mérési módszereket és mintákat alkalmazzuk.

SZINTÉZIS

1) Vékonyréteg-kromatográfia

Kieselgel 60GF 254 jelzésű, kromatográfiás célra szolgáló szilikagélt (gyártja: Merck and Co., Inc.) üveglemezekre viszünk fel, és a lemezeket 30 percig 70°C hőmérsékleten aktiváljuk. A foltokat úgy hívjuk elő, hogy a lemezre tömény kén-savat permetezünk, majd a lemezt megmelegítjük. Az ultraibolya fény elnyelését ultraibolya lámpával (254 nm, gyártja: Hirai Rika Kenkyusho) vizsgáljuk, a tömény kénsavas bepermetezés előtt.

2) Fajlagos forgatóképesség ($[\alpha]_D$)

A méréshez egy digitális polarimétert használunk (DIP-370, gyártja: Nippon Bunko-sha). A mérést a nátrium D-vonálnál végezzük el, kvarc cellát alkalmazva (10 x 10 mm).

3) Mágneses magrezonancia spektroszkópia (^1H -NMR, ^{13}C -NMR)

Az ^1H -NMR-méréseket egy JNM-270 FT, 270 MHz térerejű NMR-spektrométeren végezzük (gyártja: JEOL Ltd.). Oldószerként deuterált kloroformot vagy deuterált vizet használunk, és belső referencia anyagként a deuterált kloroform esetében tetrametilszilánt ($\delta = 0,00$), illetve a deuterált víz esetében acetont ($\delta = 2,08$) használunk.

A ^{13}C -NMR-méréseket egy JNM-400 FT NMR-spektrométeren (gyártja: JEOL Ltd.) végezzük. Oldószerként metanolt, belső referencia anyagként pedig tetrametil-szilánt ($\delta = 0,00$) alkalmazunk.

4) Infravörös abszorpciós spektrum (IR-spektrum)

Az adhéziós módszer (neat) esetében a mintát egy kálium-bromidból készült kristálylemezre visszük fel, és a mérést egy Model IR-810 infravörös spektrométeren (gyártja: Nippon Bunko-sha) végezzük. A tablettás módszer (kálium-bromid-tabletta) esetében a mérést egy Hitachi 225 jelzésű, diffrakciós ráccsal működő, BIO-RAD DIGITAL FTS-65 Fourier-transzformációval működő infravörös spektrométeren végezzük.

5) Tömegspektrometria

A nagyfelbontású tömegspektrumokat (fast atom bombardment, rövidítése: FAB, gyorsatom ütköztetési módszer) egy JEOL JMS HX-110 tömegspektrométeren (gyártja: JEOL, Ltd.) vesszük fel. Az ionok kimutatási módja: FAB-pozitív, és a mátrix anyag: glicerín (cluster-ion $[93 + (92)_n]^+$). A tömegskála kalibrálására cézium-jodidot használunk.

6) Preparatív vékonyréteg-kromatográfia

Preparatív vékonyréteg-kromatográfiás célra készült, Merck Art 5744 jelzésű lapokat használunk (gyártja: Merck and Co., Inc.). Eluensként metanolt alkalmazunk.

7) Szilikagélen végzett oszlop-kromatográfia

E célra Wakogel-300 jelzésű szilikagélt (200 - 300 mesh, gyártja: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) használunk.

8) Desztilláció csökkentett nyomáson

Az oldószereket úgy desztilláljuk le csökkentett nyomáson, hogy egy vízsugár-szivattyúval csökkentett nyomáson működtetett, forgólombikos desztilláló készüléket alkalmazunk, körülbelül 40°C hőmérsékleten.

9) A reakciók oldószerei

Valamennyi reakcióban desztillálatlan oldószert használunk.

10) Reagensek

Az m-klór-perbenzoesavat (tisztasága: 70 %) a Tokyo Kasei cégtől vásároljuk.

A nátrium-acetát forrása: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

A fenil-izotiocianátot a Tokyo Kasei cégtől vásároltuk.

A higany(II)-oxidot higany(II)-kloridból nátrium-hidroxid segítségével állítjuk elő.

A kereskedelemben kapható reagenseket olyan állapotban használjuk, ahogyan vásároljuk azokat.

Enzimgátlási vizsgálat

1) Abszorbancia

96-lyukú mikrotitráló lemezen a mintákban felszabadult p- vagy o-nitro-fenol abszorbanciáját 405 nm hullámhossznál egy MPR-4Ai típusú mikrotitráló lemez leolvasó berendezéssel (gyártja: Tosoh Corporation) mérjük.

2) Inkubálás

Az inkubálásokat 37°C hőmérsékleten, egy Compact NIB-10 típusú természetes inkubátorban (gyártja: Iwaki Glass Co., Ltd.) végezzük.

3) Enzimek

Valamennyi itt alkalmazott enzimet [Ó-glükozidáz (sütő-élesztő), β-glükozidáz (mandula), Ó-galaktozidáz (E. coli), β-galaktozidáz (E. coli) és a β-galaktozidáz (szarvasmarha máj)] a Sigma cégtől vásároljuk.

4) Szubsztrát

A fenti enzimek valamennyi szubsztrátját (p- vagy o-nitro-fenil-glikozidok) a Sigma cégtől vásároljuk.

1. példa

(3S,4R,5S,6R,7S)-7-Acetamido-4,5,6-tri-O-acetil-1-oxaspiro[2.4]-heptán-4,5,6-triol

[(b) képletű vegyület]

21,7 mg (0,0725 mmól) (a) képletű vegyületet feloldunk

2 ml 1,2-diklór-etánban. Az oldathoz foszfát puffer-oldat jelenlétében, szobahőmérsékleten hozzáadunk 53,4 mg (0,218 mmól, 3 egyenérték) 70 %-os m-klór-perbenzoesavat. A reakcióelegyet 26 órán át sötétben keverjük, majd 30 ml kloroformmal hígítjuk. Az oldatot 5 ml telített, vizes nátrium-tioszulfát-oldattal, majd 5 ml telített, vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal mossuk, és mirabiliten megszárítjuk. A szárítószert kiszűrjük, a szűrletről az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, és a kapott maradékot egy 1 g Wakogel C-300 szilikagéllel töltött oszlopon kromatografálva tisztítjuk, eluensként acetone és toluol 1 : 2 arányú elegyét használjuk. Ily módon szirupszerű anyag formájában 19,8 mg (hozam: 86,5 %) (b) képletű vegyületet kapunk.

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értéke = 0,41 (eluens: etanol és toluol 1 : 5 arányú elegye, kétszeres futtatás)

$[\alpha]_D^{27} = -63,7^\circ$ ($c = 0,96$, kloroform).

IR-spektrum (neat): 3360 (OH és NH), 1740 (OAc) és 1670 (NAC) cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (270 MHz, CDCl_3 , delta): 5,59 (1H, d,

$J_{7,\text{NH}} = 9,2$ Hz, NH), 5,26 (1H, dd, $J_{4,5} = 1$,
 $J_{5,6} = 2,9$ Hz, 5-H), 5,21 - 5,17 (2H, m, 4 és
 6-H), 5,00 (1H, dd, $J_{6,7} = 5,1$, $J_{7,\text{NH}} = 9,2$ Hz,
 7-H), 2,98 és 2,68 (1-1H, ABq, $J_{\text{gem}} = 4,8$ Hz,
 2 x 2-H), 2,14, 2,12, 2,09 és 2,00 (3-3H, 4s,
 4Ac).

Analízis a $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_8$ képlet alapján:

számított: C: 51,06, H: 5,82, N: 4,25;

talált: C: 51,61, H: 5,82, N: 4,20 %.

2. példa

1L-(1,2,4,5/3)-5-Amino-1-hidroxi-metil-1,2,3,4-ciklopentán-
tetraol

[(d) képletű vegyület]

19,8 mg (0,0628 mmól) (b) képletű vegyületet feloldunk 1 ml 80 %-os, vizes dimetil-formamid-oldatban, és hozzáadunk 30,9 mg (0,377 mmól, 6 egyenérték) nátrium-acetátot. Az elegyet 20 órán át 120°C hőmérsékleten keverjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. Az így kapott maradékot 1 ml piridinben 0,5 ml ecetsav-anhidriddel acetilezzük. A kapott terméket egy 1 g Wakogel C-300 szilikagéllel töltött oszlopon kromatografálva tisztítjuk, eluensként acetone és toluol 1 : 2 arányú elegyét használjuk. Ily módon szirupszerű anyag formájában 16,0 mg (hozam: 65,3 %) pentaacetátot, vagyis (c) képletű vegyületet kapunk.

A (c) képletű vegyület adatai megegyeznek az irodalomban leírtakkal [C. Uchida, T. Yamagishi és S. Ogawa, J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1, 589 - 602. (1994)].

42,5 mg (0,109 mmól) (c) képletű vegyületet feloldunk 2 mólos sósavban, az oldatot 2 órán át 80°C hőmérsékleten keverjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A kapott maradékot 1 ml hidrogén-fázisú Dowex 50W-X2 ioncserélő gyantán, 1 mólos, vizes ammónium-hidroxid-oldat segítségével tisztítjuk. Ily módon szirupszerű anyag formájában 19,7 mg (hozam: 100 %) epitrehazolamint, vagyis (d) képletű vegyületet kapunk.

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értéke = 0,38 (futtató elegy: víz és acetonitril 1 : 4 arányú elegye)

$[\alpha]_D^{27} = -3,8^\circ$ ($c = 0,98$, víz).

IR-spektrum (neat): 3350 (OH és NH_2) cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (270 MHz, D_2O , referencia anyag: aceton, delta):

3,96 (1H, dd, $J_{2,3} = 8,1$, $J_{3,4} = 4,8$ Hz, 3-H),
 3,87 (1H, dd, $J_{3,4} = 4,8$, $J_{4,5} = 7,7$ Hz, 4-H),
 3,69 (1H, d, $J_{2,3} = 8,1$ Hz, 2-H), 3,51 (2H, s,
 2 x 6-H), 3,27 (1H, d, $J_{4,5} = 7,7$ Hz, 5-H).

3. példa

N-[(1R)-(1,2,3,5/4)-2-Hidroxi-metil-2,3,4,5-tetrahidroxi-ciklopentil]-N'-fenil-tiokarbamid

[(e) képletű vegyület]

15,3 mg (0,0584 mmól) (d) képletű vegyületet feloldunk 1 ml 60 %-os, vizes etanol-oldatban, és hozzáadunk 23 Šl (0,171 mmól, 2,0 egyenérték) fenil-izotiocianátot. Az elegyet 3 órán át keverjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, és a kapott maradékot egy 2 g Wakogel C-300 szilika-géllal töltött oszlopon kromatografálva tisztítjuk, eluensként először toluolt, majd etanol és toluol 1 : 5 arányú elegyét használjuk. Ily módon fehérszínű, szilárd anyag formájában 23,6 mg (hozam: 88,1 %) fenil-tiokarbamid-származékot, vagyis (e) képletű vegyületet kapunk.

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értéke = 0,41 (futtató elegy:

etanol és toluol 1 : 2 arányú elegye)

$[\alpha]_D^{22} = +43,9^\circ$ ($c = 1,18$, aceton).

IR-spektrum (KBr): 3280 (OH és NH) és 1540 (NH) cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (270 MHz, D_2O , referencia anyag: acetone, delta):

7,38 - 7,17 (5H, m, Ph), 4,66 (1H, m, 1-H), 3,97
 (1H, dd, $J_{1,5} = 8,1$, $J_{4,5} = 4,6$ Hz, 5-H), 3,87
 (1H, dd, $J_{3,4} = 8,4$, $J_{4,5} = 4,6$ Hz, 4-H), 3,67
 (1H, d, $J_{3,4} = 8,4$ Hz, 3-H), 3,38 és 3,33 (1-1H, ABq,
 $J_{\text{gem}} = 12,1$ Hz, 2 x 6-H).

Analízis a $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ képlet alapján:

számított: C: 49,67, H: 5,77, N: 8,91;

talált: C: 49,93, H: 6,17, N: 8,59 %.

4. példa

(1S,5R,6S,7S,8S)-6-Hidroxi-metil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabi-
ciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol [(1-1L) képletű vegyület] és
(1S,5R,6S,7R,8S)-1-hidroxi-metil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabi-
ciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol [(1-2L) képletű vegyület]

23,6 mg (0,0751 mmól) (e) képletű vegyületet feloldunk acetone és etanol 1,5 ml térfogatú elegyében, és hozzáadunk 55,2 mg (0,256 mmól, 3 egyenérték) sárga higany-oxidot. Az elegyet 2 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd egy celitből készült szűrőágyon átszűrjük, és a szűrőágyat metanollal alaposan kimossuk. A szűrletet egyesítjük a mosófolyadékkal, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A kapott maradékot preparatív vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, eluensként ecetsav, etanol és toluol 1 : 2 : 4 arányú elegyét használjuk, négyszeres futtatással. Így először nyers 6-hidroxi-metil-izokarbamid-származékot [(1-1L) képletű vegyüle-

tet] kapunk. Ezt 1 ml hidrogén fázisú Dowex 50W-X2 ioncserélő gyantán, 14 mólos, vizes ammónium-hidroxid-oldat és metanol 1:28 arányú elegyét használva tisztítjuk. Ily módon fehérszínű, szilárd anyag formájában 9,2 mg (hozam: 43,8 %) (1-1L) képletű vegyületet kapunk.

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értéke = 0,22 (futtató elegy:

etanol és toluol 1 : 2 arányú elegye)

$[\alpha]_D^{28} = +50,1^\circ$ ($c = 0,15$, metanol).

IR-spektrum (KBr): 3430 (OH és NH), 1660 (C=N) és 1580

(NH) cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (270 MHz, D_2O , referencia anyag: aceton, delta):

7,26 - 6,97 (5H, m, Ph), 4,56 (1H, dd, $J_{1,5} = 9,5$,
 $J_{1,8} = 4,2$ Hz, 1-H), 4,25 (1H, d, $J_{1,5} = 9,5$ Hz, 5-H),
4,13 (1H, dd, $J_{1,8} = 4,2$, $J_{7,8} = 9,5$ Hz, 8-H), 3,67
(1H, d, $J_{7,8} = 9,5$ Hz, 7-H), 3,46 (2H, s, 2 x 9-H).

Analízis a $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ képlet alapján:

számított: C: 55,71, H: 5,75, N: 9,99;

talált: C: 55,30, H: 5,81, N: 9,84 %.

Második termékként a nyers 1-hidroxi-metil-izokarbamid-származékot [(1-2L) képletű vegyületet] kapjuk, amelyet 1 ml hidrogén fázisú Dowex 50W-X2 ioncserélő gyantán, 14 mólos, vizes ammónium-hidroxid-oldat és 50 %-os, vizes metanol-oldat 1 : 28 arányú elegyét használva tisztítjuk. Ily módon fehérszínű, szilárd anyag formájában 10,6 mg (hozam: 50,5 %) (1-2L) képletű vegyületet kapunk.

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értéke = 0,17 (futtató elegy:

etanol és toluol 1 : 2 arányú elegye)

$[\alpha]_D^{28} = -27,5^\circ$ ($c = 0,26$, metanol).

IR-spektrum (KBr): 3420 (OH és NH), 1670 (C=N) és 1560

(NH) cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (270 MHz, D_2O , referencia anyag: acetone, delta):

7,29 - 6,97 (5H, m, Ph), 4,06 (1H, d, $J_{5,6} = 5,9$ Hz,

5-H), 3,76 és 3,56 (1-1H, ABq, $J_{\text{gem}} = 12,5$ Hz,

2 x 9-H), 3,72 - 3,61 (3H, m, 6, 7 és 8-H).

Analízis a $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ képlet alapján:

számított: C: 55,71, H: 5,75, N: 9,99;

talált: C: 55,25, H: 5,75, N: 10,01 %.

5. példa

Az (1-1D) és az (1-2D) képletű vegyületeket az 1 - 4. példákban leírtához hasonló módon eljárva, a C-reakcióvázlattal szemléltetett úton állítjuk elő.

6. példa

N-[(1R)-(1,2,3,5/4)-2-Hidroxi-metil-2,3,4,5-tetrahidroxi-ciklopentil]-N'-butil-tiokarbamid

Butil-izotiocianátot készítünk Furukawa és munkatársai (Nippon Kagaku Kaishi, 1989, 822 - 825.) módszerével, az alábbiak szerint. 31,47 g (0,12 mól) trifenil-foszfint feloldunk 20 ml benzolban, és hozzáadunk 41,8 ml (0,30 mól) trietil-amint és 7,3 ml (0,12 mól) szén-diszulfidot. Ezután 150 ml acetonitrilt adunk az elegyhez, majd -15°C hőmérsékletre hűtjük, és keverés közben 9,9 ml (0,10 mól) butil-amint, és 9,7 ml (0,10 mól) szén-

tetrakloridot adunk hozzá. Ezt követően az elegyet 30 percig keverjük, majd 0°C hőmérsékletre melegítjük, és további 1 órán át keverjük. Ezután az elegyet szobahőmérsékletre tovább melegítjük, és 5 órán át keverjük. Az oldatlan részeket kiszűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson körülbelül 50 ml térfogatra betöményítjük. A betöményített oldatot ötször 100 ml hexánnal kirázzuk, a szerves részeket egyesítjük, és mirabiliten megszárítjuk. A szárítószert ismételen kiszűrjük, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A kapott, cseppfolyós halmazállapotú maradékot csökkentett nyomáson desztillálva tisztítjuk. Ily módon folyadék formájában 6,34 g (hozam: 55,0 %) butil-izotiocianátot kapunk, fp.: 75 - 76°C/4,13 . 10³ Pa (a fenti irodalmi hely szerint fp.: 76 - 77°C/2,93 . 10³ Pa). 21,4 mg (0,119 mmól) (d) képletű vegyületet (epitreha-zolamint) feloldunk 1,5 ml 60 %-os, vizes etanol-oldatban. Utána hozzáadunk 44 Šl (0,358 mmól, 3 egyenérték), butil-aminból előállított, fent említett butil-izotiocianátot, és a kapott elegyet szobahőmérsékleten keverjük. 3 óra múlva, 5 óra múlva és 19 óra múlva az elegyhez hozzáadjuk butil-izotiocianát fenti mennyiségét (vagyis négy részletben összesen 176 μl, azaz 1,43 mmól, 12 egyenérték butil-izotiocianátot használunk). A reakcióelegyet 22 órán át keverjük. Ezt követően az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, és a kapott maradékot egy 8 g szilikagél 60-nal (kereskedelmi jelzés, forgalmazza: Katayama Chemical) töltött oszlopon kromatografálva tisztítjuk, eluensként etanol és toluol 1 : 3 arányú elegyét használjuk. Ily módon fehérszínű, szilárd anyag formájában 35,2 mg (hozam: 100 %)

butil-tiokarbamid-származékot kapunk.

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értéke = 0,36 (futtató elegy:

etanol és toluol 1 : 2 arányú elegye)

$[\alpha]_D^{21} = +38,1^\circ$ ($c = 2,06$, metanol).

IR-spektrum (KBr): 3370 (OH és NH) és 1560 (NH) cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (270 MHz, D_2O , referencia anyag: acetone, delta):

4,70 - 4,60 (1H, m, 1-H), 3,95 - 3,87 (2H, m,
4 és 5-H), 3,67 (1H, d, $J_{3,4} = 8,4$ Hz, 3-H),
3,40 - 3,25 (2H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,37 és 3,30
1-1H, ABq, $J_{\text{gem}} = 11,9$ Hz, 2 x 6-H), 1,49 - 1,37
 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,29 - 1,14 (2H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$),
0,76 (3H, t, $J_{3',4'} = 7,3$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Analízis a $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ képlet alapján:

számított: C: 44,88, H: 7,53, N: 9,52;

talált: C: 44,26, H: 7,94, N: 9,38 %.

7. példa

(1S,5R,6S,7S,8R)-6-Hidroxi-metil-3-butil-amino-2-oxa-4-azabi-
ciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol [(2-1L) képletű vegyület] és
(1S,5R,6S,7R,8S)-1-hidroxi-metil-3-butil-amino-2-oxa-4-azabi-
ciklo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol [(2-2L) képletű vegyület]

35,2 mg (0,119 mmól), a 6. példában leírt módon elő-
állított butil-tiokarbamid-származékot feloldunk acetone és etanol
1 : 1 arányú elegyének 2 ml térfogatú részletében, és az oldat-
hoz hozzáadunk 77,0 mg (0,357 mmól, 3 egyenérték) higany-oxidot.
A kapott elegyet 6 órán át keverjük, majd hozzáadunk a fentivel
azonos mennyiségű (77 mg) higany-oxidot, és az elegy keverését

további 3 órán át folytatjuk. Ezután az elegyet egy celitből készült szűrőrétegen átszűrjük, és a szűrőréteget metanollal alaposan kimossuk. A szűrletet egyesítjük a mosófolyadékkal, és az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A kapott maradékot egy 8 g szilikagél 60-nal (kereskedelmi jelzés, forgalmazza: Katayama Chemical) töltött oszlopon kromatografálva tisztítjuk, eluensként ecetsav, etanol és toluol 1 : 2 : 4 arányú elegyét használjuk. Így először a nyers 6-hidroximetil-izokarbamid-származékot [(2-1L) képletű vegyületet] kapjuk, amelyet 1 ml hidrogén fázisú Dowex 50W-X2 ioncserélő gyantán, 14 mólos, vizes ammónium-hidroxid-oldat és metanol 1 : 28 arányú elegyének alkalmazásával tisztítjuk. Ily módon fehérszínű, szilárd anyag formájában 8,4 mg (hozam: 23,1 %) (2-1L) képletű vegyületet kapunk.

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értéke = 0,14 (futtató elegy: ecetsav, etanol és toluol 1 : 2 : 4 arányú elegye).

$[\alpha]_D^{23} = +35,2^\circ$ ($c = 0,41$, metanol).

IR-spektrum (KBr): 3400 (OH és NH), 1655 (C=N) és 1555 (NH) cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (270 MHz, D_2O , referencia anyag: acetone, delta):

4,45 (1H, dd, $J_{1,5} = 9,2$, $J_{1,8} = 4,4$ Hz, 1-H),
 4,18 (1H, d, $J_{1,5} = 9,2$ Hz, 5-H), 4,02 (1H, dd,
 $J_{1,8} = 4,4$, $J_{7,8} = 9,7$ Hz, 8-H), 3,63 (1H, d,
 $J_{7,8} = 9,7$ Hz, 7-H), 3,44 és 3,39 (1-1H, ABq,
 $J_{\text{gem}} = 11,7$ Hz, 2 x 9-H), 3,01 (2H, t,
 $J_{1',2'} = 7,0$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,41 - 1,31
 (2H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,25 - 1,11 (2H, m,

$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,74 (3H, t, $J_{3',4'} = 7,3$ Hz,
 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR-spektrum (100 MHz, CD_3OD , referencia anyag: tetra-
 metil-szilán, delta): 164,89, 87,34, 82,24, 78,57, 77,19, 67,78,
 64,23, 43,47, 32,83, 21,01, 14,16.

Analízis a $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ képlet alapján:

számított: C: 50,76, H: 7,74, N: 10,76;

talált: C: 50,35, H: 8,09, N: 10,46 %.

Második termékként a nyers 1-hidroxi-metil-izokarbamid-
 -származékot [(2-2L) képletű vegyületet] kapjuk, amelyet 1 ml
 hidrogén fázisú Dowex 50W-X2 ioncserélő gyantán, 14 mólos, vizes
 ammónium-hidroxid-oldat és 50 %-os, vizes metanol-oldat 1 : 28
 arányú elegyét használva tisztítjuk. Ily módon fehérszínű,
 szilárd anyag formájában 11,7 mg (hozam: 32,1 %) (2-2L) képletű
 vegyületet kapunk.

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értéke = 0,12 (futtató elegy:

ecetsav, etanol és toluol 1 : 2 : 4 arányú elegye).

$[\alpha]_D^{23} = +16,7^\circ$ ($c = 0,58$, metanol).

IR-spektrum (KBr): 3400 (OH és NH), 1660 (C=N) és 1560

(NH) cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (270 MHz, D_2O , referencia anyag: acetone, delta):

3,97 (1H, d, $J_{1,5} = 6,2$ Hz, 5-H), 3,68 és 3,49

(1-1H, ABq, $J_{\text{gem}} = 12,5$ Hz, 2 x 9-H), 3,64 - 3,54

(3H, m, 6, 7 és 8-H), 3,02 (2H, t, $J_{1',2'} = 6,8$ Hz,

$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,42 - 1,32 (2H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$),

1,26 - 1,02 (2H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,74 (3H, t,

$$J_{3',4'} = 7,1 \text{ Hz, NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3).$$

^{13}C -NMR-spektrum (100 MHz, CD_3OD , referencia anyag: tetrametil-szilán, delta): 163,59, 91,02, 80,12, 75,90, 75,16, 68,78, 63,31, 43,49, 32,86, 21,05, 14,19.

Analízis a $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ képlet alapján:

számított: C: 50,76, H: 7,74, N: 10,76;

talált: C: 50,41, H: 8,16, N: 10,61 %.

1. vizsgálati példa

Vizsgáljuk a fenti példákban leírt módon előállított (1-1L), (1-1D), (1-2L), (1-2D) és a (2-2L) képletű vegyületek, továbbá a dezoxi-nodzsirimicin (rövidítése: DNJ), az N-butil-dezoxi-nodzsirimicin (rövidítése: N-B-DNJ) és a trehazolamin mint vizsgálati minta gátló hatását az alábbiakban megadott enzimekre.

1) Ó-glükozidáz (sütőélesztő, EC 3.2.1.20) [leírta: H. Halvorson és L. Ellias, Biochim. Biophys. Acta, 30, 28 - 40. (1958)].

A mikrotitráló lemez minden mélyedésébe bemérünk 1 μl minta-oldatot, 98 μl 0,66 mmólos, a puffer-oldattal készült p-nitro-fenil-Ó-D-glükopiranozid-oldatot és 1 μl 0,4 mg/ml koncentrációjú, a puffer-oldattal készült enzim-oldatot. A minta össztérfogata: 100 μl . A lemezt 30 percig 37°C hőmérsékleten inkubáljuk, majd a reakciót 100 μl 1 mólos, vizes nátrium-karbonát-oldat segítségével leállítjuk. Ezután mérjük az ezen enzimreakció által felszabadított p-nitro-fenil abszorbanciáját (A_{405}). A vakpróba abszorbanciájának (A_{vak}) meghatározására 1 μl

minta-oldatot és 99 μl szubsztrát-oldatot ugyanilyen módon inkubálunk, majd hozzáadunk 100 μl vizes nátrium-karbonát-oldatot, és mérjük az abszorbanáciát. Másrészt, a kontroll abszorbancia (A_{kontroll}) meghatározása céljából 1 μl vizet, 98 μl szubsztrátoldatot és 1 μl enzim-oldatot ugyanilyen módon inkubálunk, majd hozzáadunk 100 μl vizes nátrium-karbonát-oldatot, és mérjük az abszorbanáciát. A különböző koncentrációjú mintákat, a vakpróbát és a kontroll mintát egyaránt párhuzamosan két-két mélyedésben vizsgáljuk. Puffer-oldatként 0,1 mólos foszfát puffer-oldatot ($\text{pH} = 6,8$) használunk, amelyet kálium-dihidrogén-foszfátból és dikálium-hidrogén-foszfátból készítünk.

Az enzim-aktivitást 50 %-ban gátló koncentrációt [IC_{50} (mól)] a sorozathígítással készült minták [vagyis a 100, 50, 25, 12,5, 6,25, ... ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) koncentrációjú minták] abszorbanáciája alapján határozzuk meg.

2) β -glükozidáz (mandula, EC 3.2.1.21) [leírta: A. Kobayashi, Agr. Biol. Chem., 26, 203 - 207. (1962)]

A mikrotitráló lemez minden mélyedésébe bemérünk 1 μl minta-oldatot, 98 μl 0,33 mmólos, a puffer-oldattal készült p-nitro-fenil- β -D-glükopiranozid-oldatot és 1 μl 0,4 mg/ml koncentrációjú, a puffer-oldattal készült enzim-oldatot. A minta össztérfogata: 100 μl . A lemezt 45 percig 37°C hőmérsékleten inkubáljuk, majd a reakciót 100 μl 1 mólos, vizes nátrium-karbonát-oldat segítségével leállítjuk. Ezután mérjük az ezen enzimreakció által felszabadított p-nitro-fenil abszorbanáciáját (A_{405}). A vakpróba abszorbanáciájának (A_{vak}) meghatározására 1 μl

minta-oldatot és 99 μ l szubsztrát-oldatot ugyanilyen módon inkubálunk, majd hozzáadunk 100 μ l vizes nátrium-karbonát-oldatot, és mérjük az abszorbanciát. Másrészt, a kontroll abszorbancia (A_{kontroll}) meghatározása céljából 1 μ l vizet, 98 μ l szubsztrát-oldatot és 1 μ l enzim-oldatot ugyanilyen módon inkubálunk, majd hozzáadunk 100 μ l vizes nátrium-karbonát-oldatot, és mérjük az abszorbanciát. Puffer-oldatként 0,1 mólos acetát puffer-oldatot ($\text{pH} = 5,0$) használunk, amelyet nátrium-acetátból és ecetsavból készítünk. Az IC_{50} -értéket ugyanúgy határozzuk meg, mint az α -glükózidáz esetében.

3) α -galaktozidáz (E. coli, EC. 3.2.1.22) [leírta: H. Suzuki, S-C. Li és Y-T. Li, J. Biol. Chem., 245, 781 - 786. (1970)].

A mikrotitráló lemez minden mélyedésébe bemérünk 1 μ l minta-oldatot, 74 μ l puffer-oldatot, 20 μ l 9,9 mmólos, a puffer-oldattal készült p-nitro-fenil-Ó-D-galaktopiranozid-oldatot és 5 μ l 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, a puffer-oldattal készült enzim-oldatot. A kapott elegyet 15 percig 20 - 30°C hőmérsékleten inkubáljuk, majd a reakciót 100 μ l 0,2 mólos borát puffer-oldattal ($\text{pH} = 9,8$, nátrium-hidroxidból és bórsavból előállítva) leállítjuk. Ezután mérjük az ezen enzimreakció által felszabadított p-nitro-fenol abszorbanciáját (A_{405}). A vakpróba abszorbanciájának (A_{vak}) meghatározására 1 μ l minta-oldatot, 20 μ l szubsztrátot és 79 μ l puffer-oldatot ugyanilyen módon inkubálunk, majd hozzáadunk 100 μ l 0,2 mólos borát puffer-oldatot, és mérjük az abszorbanciát. Másrészt, a kontroll abszorbancia (A_{kontroll}) meghatározása céljából 1 μ l vizet, 20 μ l szubsztrátot,

74 μl puffer-oldatot és 5 μl enzim-oldatot ugyanilyen módon inkubálunk, majd hozzáadunk 100 μl borát puffer-oldatot, és mérjük az abszorbanciát. Ebben az enzimreakcióban puffer-oldatként 0,1 mólus foszfát puffer-oldatot ($\text{pH} = 6,5$) használunk, amelyet kálium-dihidrogén-foszfátból és dikálium-hidrogén-foszfátból állítunk elő. Az IC_{50} -értéket ugyanúgy határozzuk meg, mint az α -glükozidáz esetében.

4) β -galaktozidáz (E. coli, EC. 3.2.1.23) [G. R. Craven, E. Steers, Jr. és C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem., 240, 2468 - 2477. (1965)].

A mikrotitráló lemez minden mélyedésébe bemérünk 2 μl minta-oldatot, 153 μl puffer-oldatot, 25 μl 20 mmólos, a puffer-oldattal készült o-nitro-fenil- β -D-galaktopiranozid-oldatot, 10 μl 100 mmólos 2-merkaptó-etanol-oldatot és 10 μl 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, a puffer-oldattal készült enzim-oldatot. A minta össztérfogata: 200 μl . A lemezt 30 percig szobahőmérsékleten ($20 - 30^{\circ}\text{C}$) inkubáljuk, majd mérjük az ezen enzimreakció által felszabadított o-nitro-fenol abszorbanciáját (A_{405}). A vakpróba abszorbanciájának (A_{vak}) meghatározására 2 μl minta-oldatot, 25 μl szubsztrátot, 163 μl puffer-oldatot és 10 μl 2-merkaptóetanolt ugyanilyen módon inkubálunk, majd mérjük az abszorbanciát. Másrészt, a kontroll abszorbancia (A_{kontroll}) meghatározása céljából 2 μl vizet, 25 μl szubsztrátot, 153 μl puffer-oldatot, 10 μl 2-merkaptó-etanolt és 10 μl enzim-oldatot ugyanilyen módon inkubálunk, majd mérjük az abszorbanciát. Ehhez az enzimreakcióhoz puffer-oldatként 50 mmólos foszfát puffer-oldatot ($\text{pH} = 7,3$)

használunk, amelyet kálium-dihidrogén-foszfátból és dikálium-hidrogén-foszfátból állítunk elő, és amely 1,3 mmól magnézium-kloridot is tartalmaz. Az IC_{50} -értéket ugyanolyan módon határozzuk meg, mint az α -glükoszidáz esetében.

5) β -galaktozidáz (szarvasmarha máj, EC 3.2.1.23) [leírta: T. Aoyagi, T. Hazato, M. Kumagai, M. Hamada, T. Takeuchi és H. Umezawa, J. Antibiot., 28, 1006 - 1008. (1975)].

A mikrotitráló lemez minden mélyedésébe bemérünk 2 α l minta-oldatot, 158 α l puffer-oldatot, 25 μ l 20 mmólos, a puffer-oldattal készült o-nitro-fenil- β -D-galaktopiranozid-oldatot, 10 μ l 100 mmólos 2-merkapto-etanol-oldatot és 5 μ l 5 mg/ml koncentrációjú, a puffer-oldattal készült enzim-oldatot. A minta össztérfogata: 200 μ l. A lemezt 30 percig szobahőmérsékleten (20 - 30°C) inkubáljuk, majd mérjük az ezen enzimreakció által felszabadított o-nitro-fenol abszorbanciáját (A_{405}). A vakpróba abszorbanciájának (A_{vak}) meghatározására 2 μ l minta-oldatot, 25 μ l szubsztrátot, 163 μ l puffer-oldatot és 10 μ l 2-merkapto-etanol-t ugyanilyen módon inkubálunk, majd mérjük az abszorbanciát. Másrészt, a kontroll abszorbancia ($A_{kontroll}$) meghatározása céljából 2 μ l vizet, 25 μ l szubsztrátot, 158 μ l puffer-oldatot, 10 μ l 2-merkapto-etanol-t és 5 μ l enzim-oldatot ugyanilyen módon inkubálunk, majd mérjük az abszorbanciát. Ehhez az enzimreakcióhoz puffer-oldatként 50 mmólos foszfát puffer-oldatot (pH = 7,3) használunk, amelyet kálium-dihidrogén-foszfátból és dikálium-hidrogén-foszfátból állítunk elő, és amely 1,3 mmól magnézium-kloridot is tartalmaz. Az IC_{50} -értéket ugyanolyan módon határozzuk meg, mint az α -glükoszidáz esetében.

rozzuk meg, mint az α -glükózidáz esetében. Az eredményeket az 1. táblázatban tüntetjük fel.

1. táblázat

IC₅₀ (mól)

Vegyület	α-glükózidáz (sütőélesztő)	β-glükózidáz (mandula)	Ó-galak- tozidáz (E. coli)	β-galak- tozidáz (E. coli)	β-galak- tozidáz (szarvas- marha máj)
----------	-------------------------------	---------------------------	----------------------------------	----------------------------------	--

(1-1D)	2,32 x 10 ⁻⁶	-	-	-	3,00 x 10 ⁻⁶
(1-1L)	2,93 x 10 ⁻⁸	-	-	-	1,53 x 10 ⁻⁴
(1-2D)	9,99 x 10 ⁻⁷	-	-	-	1,89 x 10 ⁻⁶
(1-2L)	5,0 x 10 ⁻¹²	-	-	-	5,17 x 10 ⁻⁵
(2-2L)	7,0 x 10 ⁻¹⁴	-	---	---	---
DNJ	9,19 x 10 ⁻⁵	1,47 x 10 ⁻⁴	---	---	---
N-B-DNJ	8,0 x 10 ⁻⁵	5,0 x 10 ⁻⁴	---	---	---
trehazol- amin	5,0 x 10 ⁻⁴	9,9 x 10 ⁻⁶	---	---	---

- : > 3,0 x 10⁻⁴ mól

--- : nincs adat

Amint ezt a fenti táblázat szemlélteti, a jelen tanulmány szerinti vegyületek, beleértve az (öt izokarbamid-származékot [vagyis az (1-1L), (1-1D), (1-2L), (1-2D) és a (2-2L) képletű vegyületek] 10² - 2 x 10⁹-szer erősebb gátló hatást fejtenek ki az α-glükózidáz enzimre, mint a

dezoxi-nodzsimicin. Az is kitűnik, hogy e vegyületek nagymértékben specifikusak az α -glükózidáz enzimre nézve. Továbbá, a fentiekben említett öt izokarbamid-származék mindegyike egyrészt erősebb inhibitor hatást, másrészt nagyobb α,β -szelektivitást mutat, mint az epitrehazolamin, amely e vegyületek igen hasznos voltára utal. Ha az inhibitor hatás tekintetében összehasonlítjuk az (1-1L) képletű vegyületet, amelyben a szekunder hidroxilcsoport vesz részt az izokarbamid-kötésben, az (1-2L) képletű vegyülettel, amelyben a tercier hidroxilcsoport vesz részt az izokarbamid-kötésben, azt találjuk, hogy ez utóbbi vegyületnek valamivel erősebb hatása van. Ez a tény azt sugallja, hogy a glükóz 2-es helyzetének megfelelő helyen levő hidroxilcsoport protondonorként részt vehet a jelen vizsgálatban alkalmazott enzimmel kialakított hidrogénkötés létrejöttében. Továbbá, a (d) képletű vegyület α,β -szelektivitását lényegesen meg lehet növelni egy fenilcsoport bevezetésével. E tény alapján feltételezzük, hogy egy hidrofób csoport nagymértékben befolyásolja a szelektivitást.

2. vizsgálati példa

Vizsgáljuk a fenti példákban leírt módon előállított (1-2L) és (2-2L) képletű vegyületeknek, valamint az összehasonlító anyagként használt trehazolaminnak és az N-butil-dezoxi-nodzsimicinnek az α -glükózidáz I-re kifejtett gátló hatását.

Az α -glükózidáz I-et (sütőélesztő) és ennek itt alkalmazott szubsztrátját [α -D-Glc1 $\rightarrow$ 2 α -D-Glc1 $\rightarrow$ 3 α -D-Glc-O(CH₂)₆COOCH₃]

I. Neverova és munkatársai módszerével [Anal. Biochem., 222, 190 - 196. (1994)] állítjuk elő.

Az alábbi méréseket az irodalomban leírt módszerekkel végezzük.

A fentiekben említett mintát és a szubsztrátot [α -D-Glc1 $\rightarrow$ 2 α -D-Glc1 $\rightarrow$ 3 α -D-Glc-O(CH₂)₆COOCH₃] tartalmazó mikrokémcsőbe bemérünk 25 μ l, puffer-oldattal készült α -glükozidáz I-oldatot. Az elegyet 1 órán át 37°C hőmérsékleten inkubáljuk, majd a reakciót 25 μ l 1,25 mólos trisz(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid puffer-oldattal (pH = 7,6) leállítjuk. Ezután a reakcióelegyet felvisszük egy mikrotitráló lemezre, és hozzáadunk 250 μ l reakció puffer-oldatot [a futtató oldat: 1 mólos trisz(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid puffer-oldat (pH = 7,2), amely 5 egység/ml glükóz-oxidázt (forgalmazza: Sigma), 1 purpurgallin egység torma peroxidázt (forgalmazza: Sigma) és 40 μ g/ml o-dianizidin-dihidrokloridot tartalmaz]. Az elegyet 37°C hőmérsékleten 30 percig, vagy addig inkubáljuk, míg az abszorbancia növekedése meg nem áll. Ezt követően mérjük az ezen enzimreakcióban képződött és oxidálódott o-dianizidin abszorbanciáját (A_{450}). Vakpróbaként úgy ismétljük meg a fenti reakciót, hogy sem a fent említett mintát, sem szubsztrátot nem adunk hozzá, és így mérjük az abszorbanciát. Továbbá, a fentiekben említett reakció puffer-oldatot ismert koncentrációjú D-glükóz-oldathoz adjuk, a kapott elegyet inkubáljuk, majd mérjük az abszorbanciát, így vizsgáljuk a D-glükóz koncentráció és az abszorbancia összefüggését. Minden vizsgálatot párhuzamosan két-két mélyedésben végzünk.

A fenti mérést minden egyes minta esetében olyan szubsztrát koncentráció-tartományban (0,25 - 4,0 mmól) és olyan minta koncentráció-tartományban végezzük el, amely az IC_{50} körüli értéket adja. A D-glükóz koncentrációja és az abszorbancia fent említett összefüggése alapján határozzuk meg a szubsztrátból az adott minta jelenlétében az α -glükozidáz I enzim hatására felszabaduló glükóz mennyiségét. Az így kapott eredményből kiszámítjuk a K_m értéket, majd a minta mennyiségéből és a K_m -értékből számítjuk ki a K_i értéket.

Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be. Amint ezt a 2. táblázat szemlélteti, a jelen találmány szerinti vegyületek gátolják az α -glükozidáz I enzim aktivitását. E vegyületek közül a (2-2L) képletű vegyület hatása összehasonlítható az N-butil-dezoxi-nodzsirimicin hatásával, amely vegyületet HIV-ellenes szerként vizsgáltak és fejlesztettek ki. Így várható, hogy a (2-2L) képletű vegyületet szintén lehet majd használni HIV-ellenes szerként.

2. t á b l á z a t

V e g y ü l e t	K_i (μ mól)
(1-2L)	51
(2-2L)	4,2
N-butil-dezoxi-nodzsirimicin	3,6
trehazolamin	1500

3. vizsgálati példa

Az amino-ciklopentán-származékok gátló hatása a HIV termelésre
(HIV semlegesítési vizsgálat)

A jelen találmány szerinti vegyületeknek a HIV semlegesítési hatását a vírus semlegesítési vizsgálattal határozzuk meg, amelyhez humán normál perifériás vérből származó mononukleáris (egymagvú) sejteket használunk.

Vizsgálati mintaként a fenti példákban leírt módon előállított (d), (1-1L), (1-2L) és a (2-2L) képletű vegyületeket, valamint összehasonlító anyagként az N-metil-dezoxi-nodzsirimicint (rövidítése: N-mDNJ), N-butil-dezoxi-nodzsirimicint (rövidítése: N-B-DNJ), trehazolamint és az azido-timidint (AZT) használjuk, mindegyiket 0,1 μ mólos és 1 μ mólos mennyiségben, e mintákat a HIV_{MN} szövettenyésztetre nézve 50 %-ban fertőző átlagos dózis 100-szorosával keverjük össze, majd a mintákat 60 percig 37°C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután a mintákat olyan Eppendorf-csövekbe visszük át, amelyek 24 órán át 5 μ g fitohemagglutininnel aktivált 1×10^6 perifériás vérből származó mononukleáris sejtet tartalmaznak. A csöveket 60 percig egy 37°C hőmérsékletű vízfürdőben rázatjuk. A fitohemagglutininnel való aktiválást úgy végezzük, hogy a perifériás vérből származó mononukleáris sejteket 24 órán át egy stimuláló (serkentő) közegben inkubáljuk. Ezt a stimuláló közeget úgy állítjuk elő, hogy RPMI 1640 jelzésű közeghez 2 mmól glutamint, 10 % hőkezeléssel inaktivált borjúmagzat-szérumot, 0,01 % fitohemagglutininint (gyártja: Difco), 50 egység/ml anti-INF α antitestet (forgalmazza: Cosmobio), 50 egység/ml penicillint és 50 μ g/ml

sztreptomicint adunk. A sejteket foszfáttal pufferolt só-oldattal háromszor kimossuk, majd 1 ml tenyésztő közegben szuszpendáljuk. A szuszpenziót átvisszük inkubációs csövekbe (A-S, Nunc, Roskilde, Dánia), és a mintákat 7 napig inkubáljuk. A tenyésztő közegét úgy állítjuk elő, hogy az RPMI 1640 közeghez 2 μ mol glutamint, 10 % hőkezeléssel inaktivált borjúmagzat-szérumot, 40 egység/ml T-sejt növekedési faktort (IL-2), (gyártja: Shionogi & Co., Ltd.), 50 egység/ml anti- $\text{INF}\alpha$ antitestet (forgalmazza: Cosmobio), 50 egység/ml penicillint, és 50 μ g/ml sztreptomicint adunk. Ezután a felülúszóban meghatározzuk a HIV termelést, ehhez HIV-1 p24 antigén ELISA készletet (gyártja: Dinabot) használunk [J. Immunol., 142, 4248 - 4255. (1989); J. Immunol., 148, 2175 - 2180. (1992)]. A mintának a HIV termelésre gyakorolt gátló hatását gátlási % formájában fejezzük ki.

A semlegesítési vizsgálathoz használt HIV_{MN} tenyészetet úgy állítjuk elő, hogy az 5 μ g/ml fitohemagglutininnal 7 napig aktivált, perifériás vérből származó mononukleáris sejteket a HIV_{MN} -nek [H9/HTLV-III $_{\text{MN}}$, AIDS Research and Reference Reagent Program (AIDS kutatási és összehasonlító minta előállítására szolgáló program), NIH, Rockvill, MD] a szövettenyészetre nézve 50 %-ban fertőző átlagos dózisa 100-szorosával 7 napig inkubáljuk, ezután a tenyészet felülúszójából eltávolítjuk a sejteket, majd a mintákat felhasználásig -130°C hőmérsékleten tároljuk. A HIV_{MN} tenyészetet fitohemagglutininnal aktivált, perifériás vérből származó mononukleáris sejtekkel titráljuk, így határozzuk meg a ml-enkénti, a szövettenyészetre nézve 50 %-ban fertőző átlagos dózist.

Az eredményeket az 1. ábrán mutatjuk be. Az ordináta az egyes vizsgált minták által kiváltott gátlást jelzi, amelyet a %-os gátlás arányaként fejezünk ki, és úgy számítunk ki, hogy az 1 μmol azido-timidin által kiváltott gátlást 70 %-nak tekintjük. Amint ezt az 1. ábra szemlélteti, a jelen találmány szerinti vegyületeknek HIV-ellenes hatásuk van.

4. vizsgálati példa

Az amino-ciklopentán-származékok gátló hatása a HIV által kiváltott sejt-összeolvadásra (óriássejtek képződésére)

A 10^6 Molt4 sejtet, illetve 10^6 Molt4/HIV-III B sejteket tartalmazó közeghez hozzáadjuk a vizsgálati mintaként használt, a fenti példákban leírt módon előállított (1-2L) és (2-2L) (képletű vegyületeket vagy az összehasonlító anyagként használt N-metil-dezoxi-nodzsirimicint (rövidítése: N-mDNJ), N-butyl-dezoxi-nodzsirimicint (rövidítése: N-B-DNJ) vagy az azido-timidint (rövidítése: AZT), mégpedig bármelyiket 0,1 μmol és 1 μmol mennyiségben, majd a mintákat 3 napig inkubáljuk. Valamennyi itt alkalmazott közeget úgy állítjuk elő, hogy RPMI 1640 közeghez hozzáadunk 2 mmól glutamint, 10 % hőkezeléssel inaktivált borjúmagzat-szérumot, 50 egység/ml penicillint és 50 mg/ml sztreptomicint. Az inkubálás befejezése után a Molt4 sejteket összekeverjük ugyanolyan mennyiségű Molt4/HIV-III B sejtekkel, és a kapott mintákat 24 órán át 37°C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután egy sejtszámlálóval (gyártja: Coulter) lemérjük a sejtek méretét, és meghatározzuk a sejtszámot. A 20 μm -nél nagyobb átmérőjű sejteket sejt-összeolvadás révén keletkezett

óriássejteknek tekintjük. E méréssel határozzuk meg minden egyes mintában a sejt-összeolvadás (az óriássejtek képződésének) %-os gátlását.

Az eredményeket a 2. ábrán mutatjuk be. Az ordinátán a %-os gátlást tüntetjük fel. Amint ezt a 2. ábra szemlélteti, a jelen találmány szerinti vegyületeknek HIV-ellenes hatásuk van.

5. vizsgálati példa

Amint ezt az 1. és 2. táblázat szemlélteti, bizonyíték van arra, hogy a jelen találmány szerinti (1-1L), (1-2L) és (2-2L) képletű vegyületek figyelemreméltóan erősen gátolják az α -glükózidázt, az ismert, gátló hatású dezoxi-nodzsimicinnel összehasonlítva. Másrészt, különösen az (1-1L), (1-2L) és a (2-2L) képletű vegyületek csak gyenge gátló hatást fejtenek ki a β -glükózidázzal szemben, ami azt jelzi, hogy e vegyületek igen specifikus α -glükózidáz inhibitorok. Továbbá, megvizsgáljuk e vegyületek citotoxicitását (a sejtekre gyakorolt toxikus hatását). Az alábbi vizsgálati mintákat alkalmazzuk: a (d) képletű vegyület 20 mmólos, vizes oldata, az (1-1L) képletű vegyület 10 mmólos, 50 %-os dimetil-szulfoxiddal készült oldata, és az (1-2L) képletű vegyület 10 mmólos, 50 %-os dimetil-szulfoxiddal készült oldata.

Egy 12 mélyedést tartalmazó mikrotitráló lemezen (3,8 cm²/mélyedés, gyártja: Corning) B16 melanóma sejteket 10 % borjúmagzat-szérumot tartalmazó, Dulbecco-féle módosított Eagle-közegben (gyártja: Gibco Laboratories) 37°C hőmérsékleten, 5 % szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában inkubálunk, a minták

sűrűsége: 2×10^5 sejt/ml/mélyedés. 24 óra múlva a közeget lecseréljük a mintákat tartalmazó, Dulbecco-féle módosított Eagle-közegre. Ezután az inkubálást további 24 órán át ugyanolyan körülmények között folytatjuk. Ezt követően a mintákhoz etilén-diamin-tetraecetsavat adunk, a sejteket elkülönítjük, foszfáttal pufferolt só-oldattal mossuk, és 0,3 %-os tripánké-oldattal festjük. E módszerrel a sejtek túlélési arányát határozzuk meg.

Amint ezt a 3. táblázat szemlélteti, a vizsgált koncentráció-tartományban e vegyületeket nem találtuk citotoxikusnak. Az (1-2L) képletű vegyület még az O-glükozidázra vonatkozó 50 %-os gátló koncentráció 10.000-szeresében sem citotoxikus, ami arra utal, hogy e vegyület igen biztonságosan használható hatóanyag.

3. t á b l á z a t

V e g y ü l e t	Vegyület koncentrációja (Šmól)			
	100	50	10	5
(1-1L)	-	-	-	-
(1-2L)	-	-	-	-

Túlélési arány, 0,3 %-os tripánké-oldattal való festés útján meghatározva (kontroll: 100 %).

+ : 25 %;

" : 50 %;

- : > 95 %.

Habár a jelen találmányt részleteiben annak különös megjelenési formáira írjuk le, a szakemberek előtt nyilvánvaló, hogy különféle változtatásokat és módosításokat vezethetünk be anélkül, hogy eltérnénk a találmány szellemétől és oltalmi körétől.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (1) általános képletű, ahol

R₁ jelentése hidrogénatom, és ugyanakkor

R₂ jelentése hidroximetil-csoport, vagy pedig

R₁ jelentése hidroximetil-csoport, és ugyanakkor

R₂ jelentése hidrogénatom; és

R₃ jelentése helyettesített vagy helyettesítetlen aril-
csoport, vagy 1-10 szénatomos alkilcsoport, alkenil-
csoport, alkinilcsoport vagy hidroxialkil-csoport,
amino-ciklopentán-származékok.

2. Az 1. igénypont szerinti amino-ciklopentán-származékok, ahol a fenti (1) általános képletű amino-ciklopentán-származékokban

R₃ jelentése helyettesített vagy helyettesítetlen aril-
csoport.

3. A 2. igénypont szerinti amino-ciklopentán-származékok, ahol a fenti (1) általános képletű amino-ciklopentán-származék az (1-1L) képletű (1S,5R,6S,7S,8R)-6-hidroximetil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabicyclo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, az (1-1D) képletű (1R,5S,6R,7R,8S)-6-hidroximetil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabicyclo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, az (1-2L) képletű (1S,5R,6S,7R,8S)-1-hidroximetil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabicyclo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, vagy az (1-2D) képletű

(1R,5S,6R,7S,8R)-1-hidroxi-metil-3-fenil-amino-2-oxa-4-azabicyclo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol.

4. Az 1. igénypont szerinti amino-ciklopentán-származékok, ahol a fenti (1) általános képletű amino-ciklopentán-származékokban

R_3 jelentése 1-10 szénatomos alkilcsoport.

5. A 4. igénypont szerinti amino-ciklopentán-származékok, ahol a fenti (1) általános képletű amino-ciklopentán-származék a (2-1L) képletű (1S,5R,6S,7S,8R)-6-hidroxi-metil-3-butyl-amino-2-oxa-4-azabicyclo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, a (2-1D) képletű (1R,5S,6R,7R,8S)-6-hidroxi-metil-3-butyl-amino-2-oxa-4-azabicyclo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, a (2-2L) képletű (1S,5R,6S,7R,8S)-1-hidroxi-metil-3-butyl-amino-2-oxa-4-azabicyclo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol, vagy a (2-2D) képletű (1R,5S,6R,7S,8R)-1-hidroxi-metil-3-butyl-amino-2-oxa-4-azabicyclo[3.3.0]okt-3-én-6,7,8-triol.

6. Glikozidáz inhibitor készítmény, mely hatóanyagként valamely, az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti amino-ciklopentán-származékot tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti glikozidáz inhibitor készítmény, mely O-glükozidáz inhibitor.

8. A 6. igénypont szerinti glikozidáz inhibitor

készítmény, ahol az (1) általános képletű hatóanyagban R_3 szubsztituálatlan vagy szubsztituált arilcsoport vagy 1-10 szénatomos alkilcsoport.

9. A 6-8. igénypontok bármelyike szerinti glikozidáz inhibitor készítmény, ahol az (1) általános képletű hatóanyagban R_3 szubsztituálatlan arilcsoport vagy 3-8 szénatomos alkilcsoport.

10. A 6-9. igénypontok bármelyike szerinti glikozidáz inhibitor készítmény, ahol az (1) általános képletű hatóanyagban R_3 fenil- vagy butilcsoport.

11. A 6-9. igénypontok bármelyike szerinti glikozidáz inhibitor készítmény, ahol a hatóanyag a 3.vagy 5. igénypontban megadott vegyületek valamelyike.

12. Eljárás az (1) általános képletű amino-ciklopentán-származékok előállítására, ahol R_1 , R_2 és R_3 az 1. igénypontban megadott, azzal jellemezve, hogy valamely (3) általános képletű, ahol R_1 , R_2 és R_3 jelentése az (1) általános képletre az 1. igénypontban megadott, tiokarbamid-származékot gyűrűs izokarbamid-származékká alakítunk.

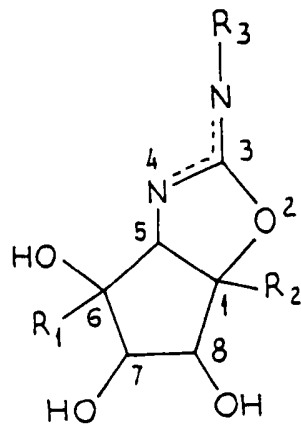
A meghatalmazott

9. leg. nyi

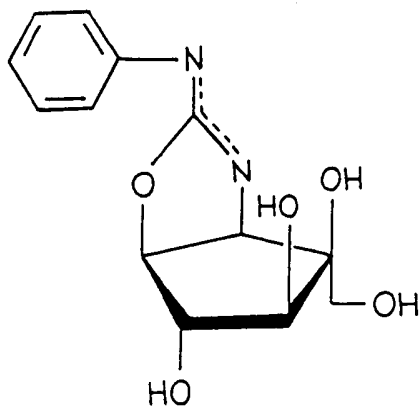
Flora János

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

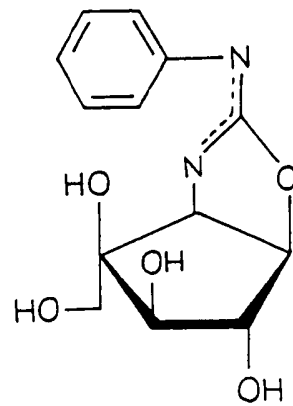
9/1



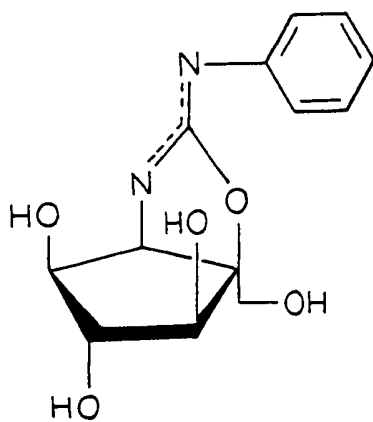
(1)



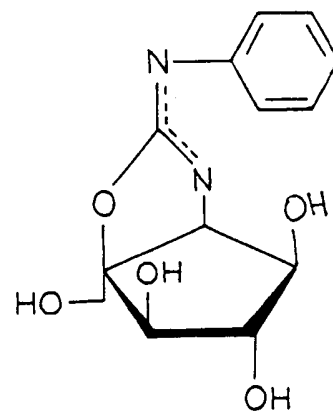
(1-1L)



(1-1D)



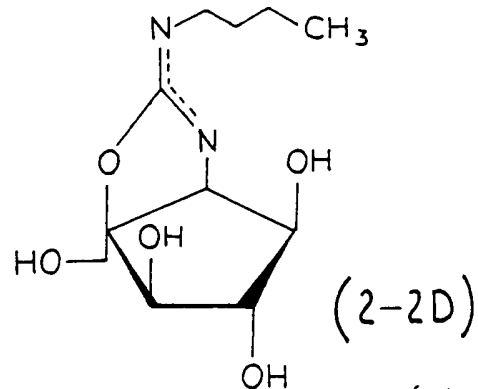
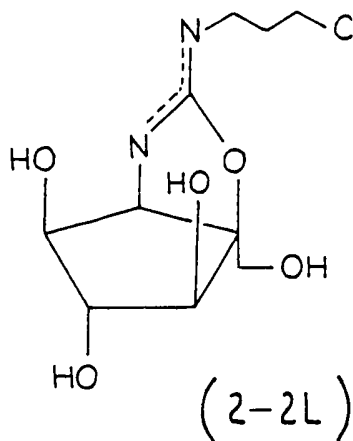
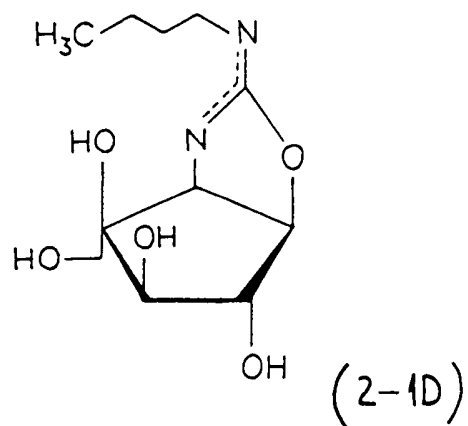
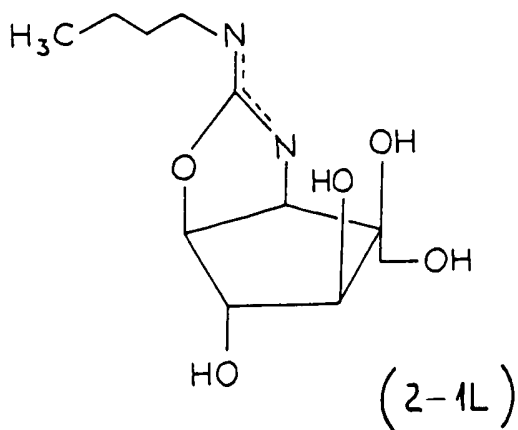
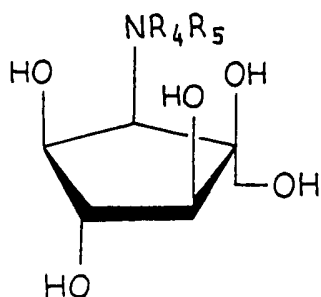
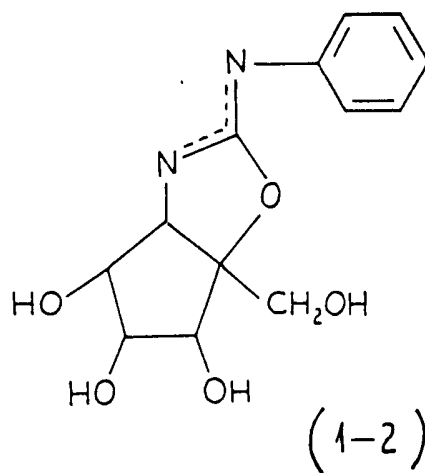
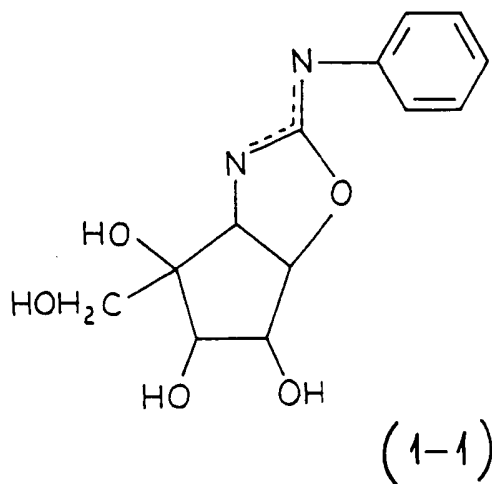
(1-2L)

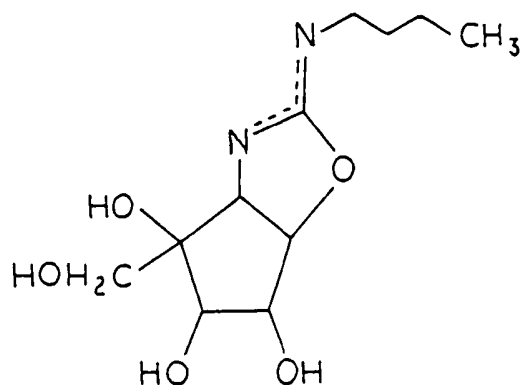


(1-2D)

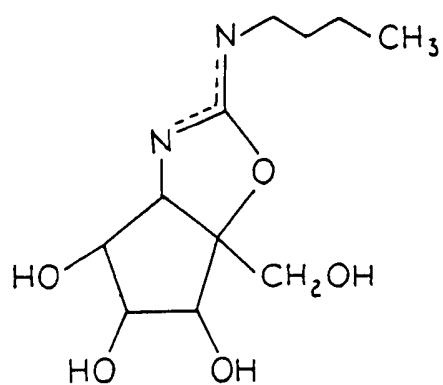
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

9/2

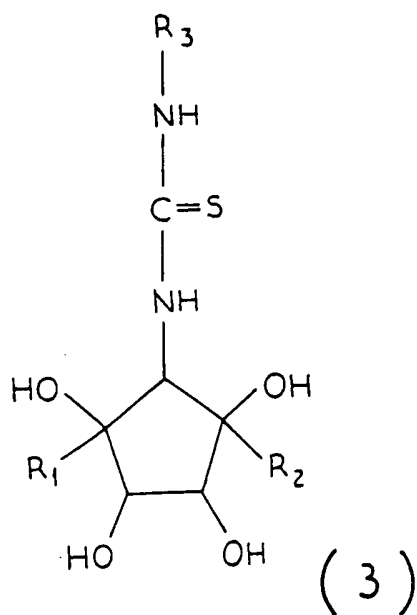




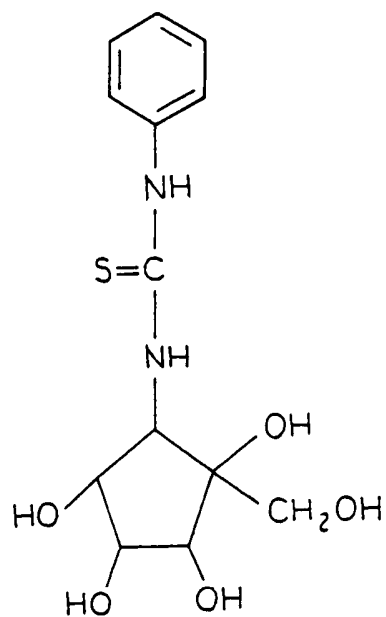
(2-1)



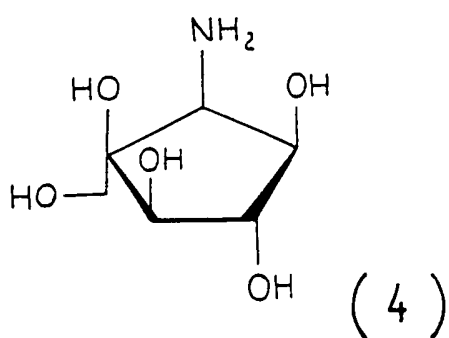
(2-2)



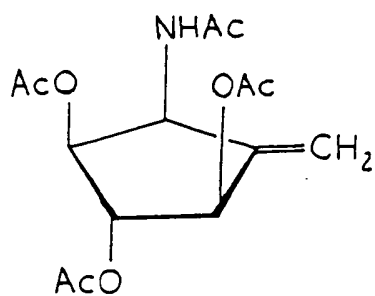
(3)



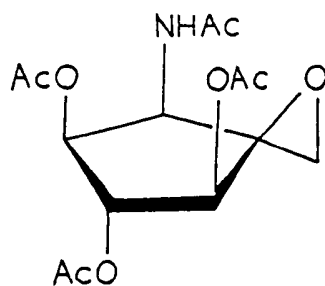
(5)



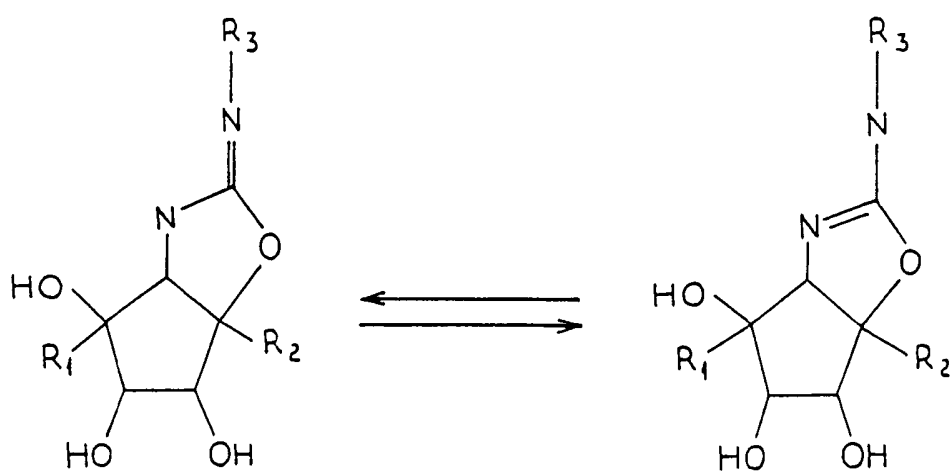
(4)



(a)



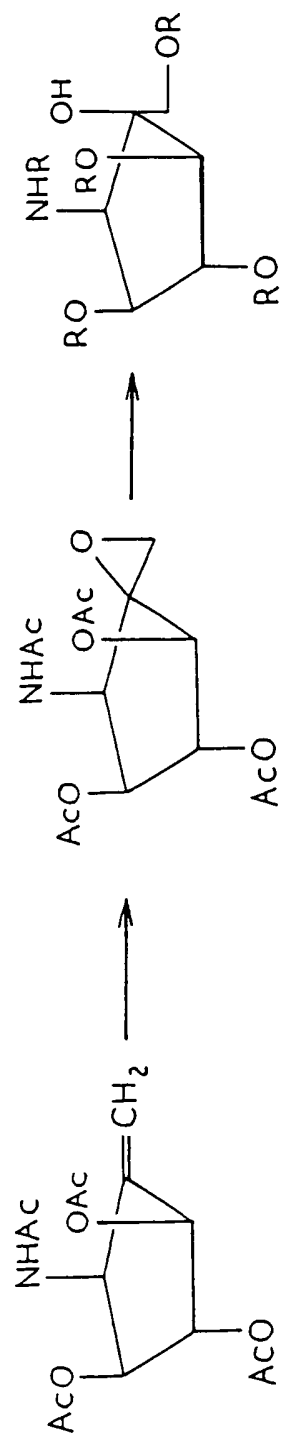
(b)

A-reakcióvázlat

3369/95

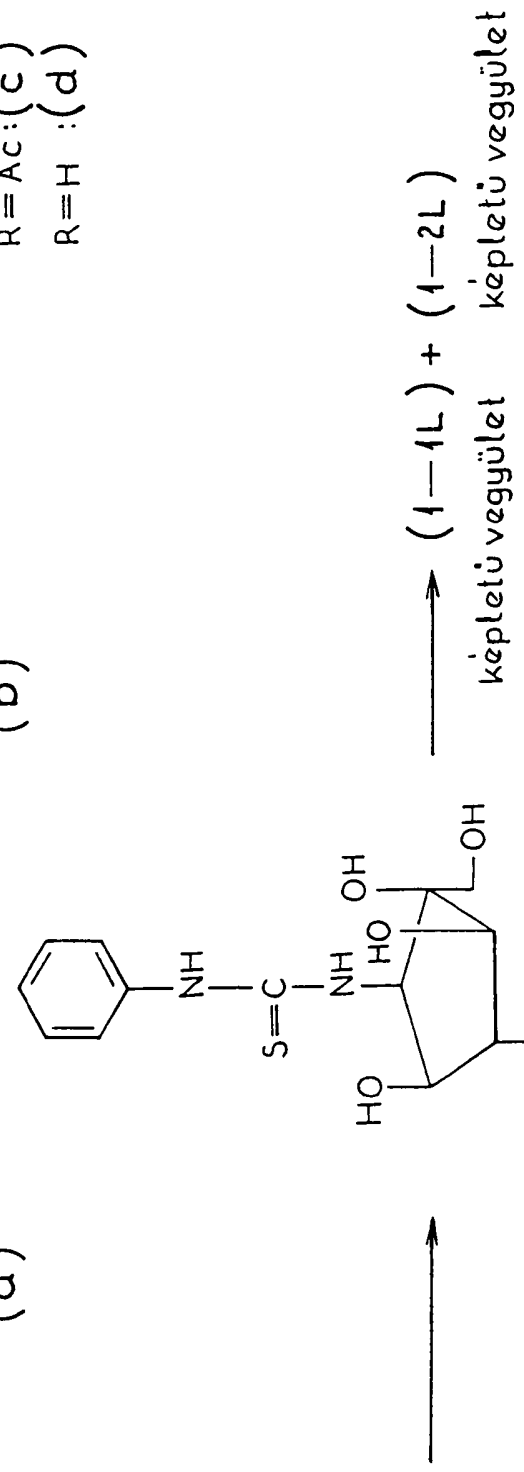
378941

B-reakcióvázlát



R = Ac : (c)
R = H : (d)

(b)



(a)

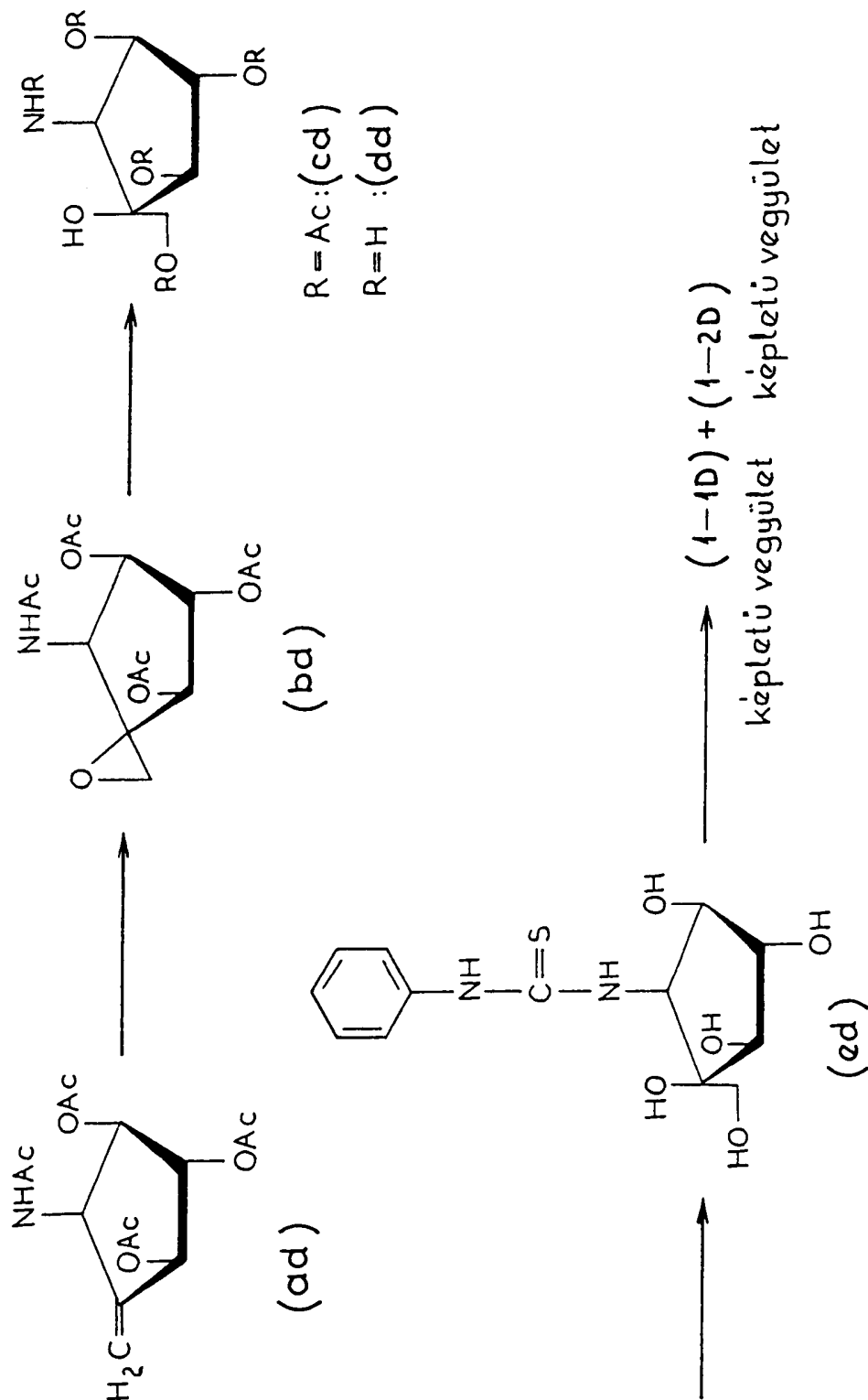
(a)

3339/91

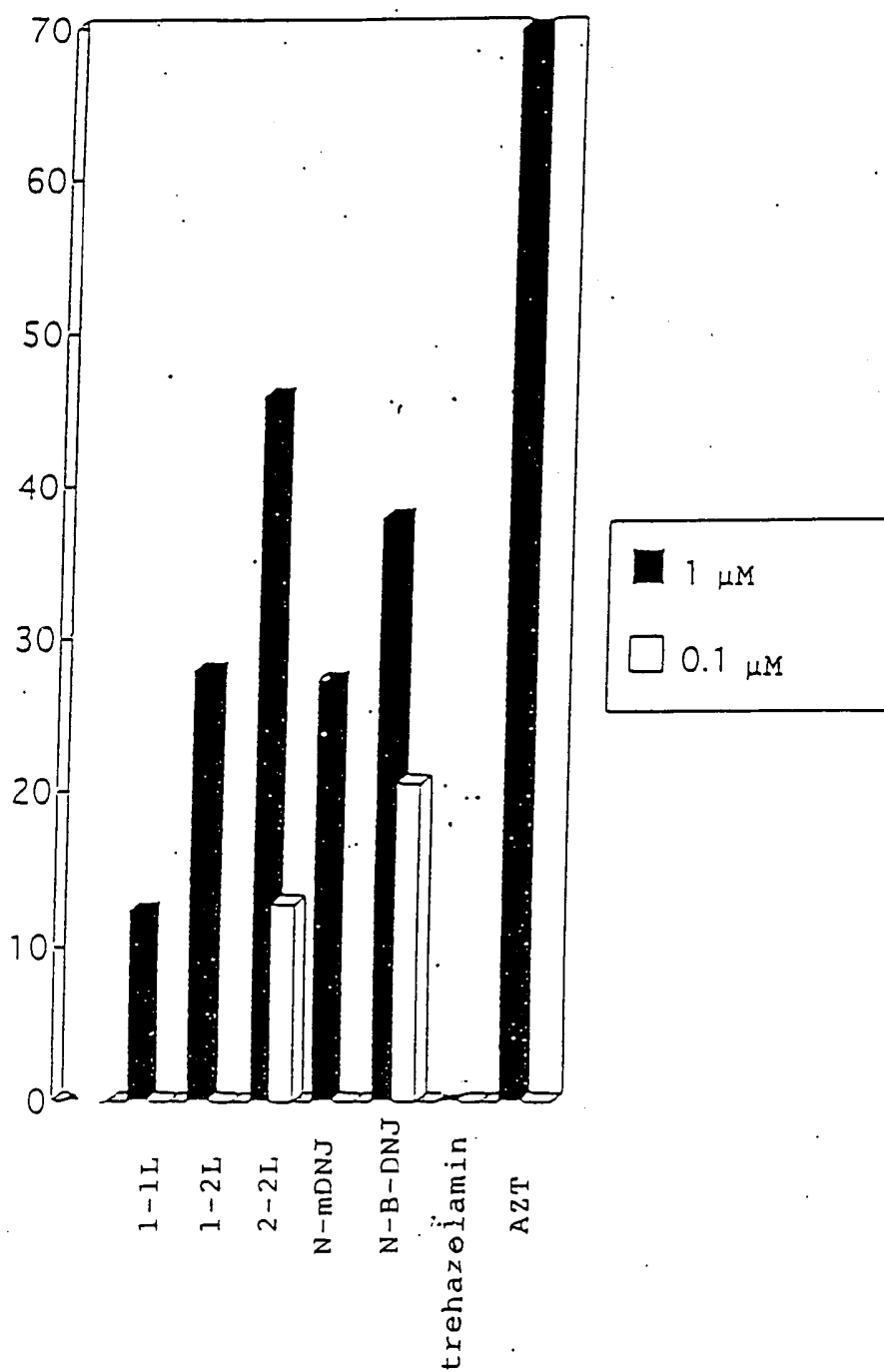
370931

9/7

C-reakcióvázlat



1. ábra



2. ábra

