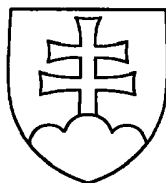


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA  
VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 18.08.1998  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/056 820, 9720331.9  
(32) Dátum priority: 22.08.1997, 24.09.1997  
(33) Krajina priority: US, GB  
(40) Dátum zverejnenia: 12.02.2001  
(86) Číslo PCT: PCT/US98/17093, 18.08.1998

(21) Číslo dokumentu:

**208-2000**

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

**A 61K 31/34**  
**A 61K 31/35**  
**C 07D 307/06**  
**C 07D 309/04**

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

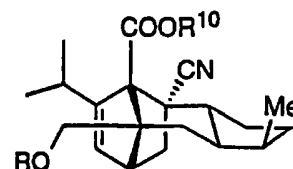
(72) Pôvodca vynálezu: Tse Bruno, Rahway, NJ, US;

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

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

(57) Anotácia:

Opisujú sa 4-kyano-4-deformylsordaricinové deriváty všeobecného vzorca (I), sú antifungálnymi činidlami užitočnými na liečbu a/alebo prevenciu humánnych a živočíšnych hubových infekcií, ako aj na kontrolu fytopatogénnych húb na plodinách.



(I)

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

#### Oblasť techniky

Vynález sa týka derivátov 4-kyano-4-deformylsordaricínu, ktoré sú účinnými antifungálnymi činidlami so širokým spektrom účinku, spôsobu ich prípravy, farmaceutických a poľnohospodárskych prostriedkov obsahujúcich tieto zlúčeniny a spôsobov kontroly hubových infekcií u ľudí, zvierat a rastlinných materiálov použitým takýchto zlúčenín.

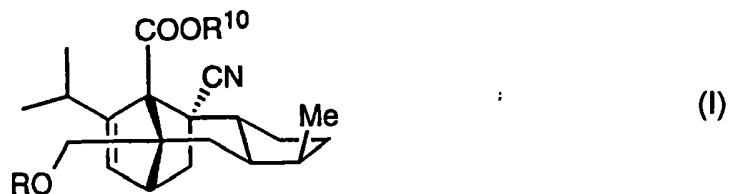
#### Doterajší stav techniky

Sordarín je antifungálne antibiotikum izolované z plesne *Sordaria araneosa* (pozri GB 1162027 a Helvetica Chimica Acta, 1971, 51:119-20). Ako antifungálne činidlá boli publikované aj iné zlúčeniny, ktoré majú sordarínovú kostru. Japonský Kokai J62040292 opisuje zlúčeninu zofimarín izolovanú zo *Zořiela marina sp.*; japonský Kokai J06157582 opisuje zlúčeninu BE-31405 izolovanú z *Penicillium sp.*; a SCH57404 je publikovaná v J. Antibiotics, 1995, 48:1171-1172. Semi-syntetické sordarínové deriváty sú publikované v PCT prihláškach WO96/14326 a WO96/14327.

Sordaricín, aglykón, je možné pripraviť zo sordarínu kyslou hydrolyzou (Hauser a Sigg, Helvetica Chimica Acta, 1971, 51:119-20); podobne sa získal metylester sordaricínu z metylesteru sordarínu. Celková syntéza metylesteru sordaricínu je publikovaná v Kato a ďalší, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1993, 1002-1004, kde je tiež opísaný metylester O-metoxymetylsordaricínu. Diacetát 4-desformyl-4-hydroxymetylsordaricínu je opísaný v Mander a Robinson, J. Org. Chem., 1991, 56(11):3395-3601. Nepotvrdil sa biologický účinok ani sordaricínu, ani jeho publikovaných derivátov. Doteraz neboli opísané kyanoderiváty formylovej skupiny.

Podstata vynálezu

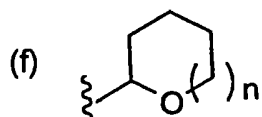
Podstatou vynálezu sú 4-kyano-4-deformylsordaricínové deriváty všeobecného vzorca I



kde

R znamená

- (a) C(=O)OR<sup>1</sup>,
- (b) C(=O)NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>,
- (c) C(=O)R<sup>4</sup>,
- (d) CH(R<sup>2</sup>)OR<sup>5</sup>,
- (e) C(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>)(R<sup>8</sup>)



alebo

(g) H;

R<sup>1</sup> je

- (a) C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub>alkyl,
  - (b) C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>alkenyl,
  - (c) C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>alkinyl,
  - (d) C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>cykloalkyl,
  - (e) aryl alebo
  - (f) aryl C<sub>1-6</sub>alkyl;
- R<sup>2</sup> a R<sup>3</sup> sú nezávisle

(a) H alebo

(b) R<sup>1</sup>;

R<sup>4</sup> je

(a) H,

(b) R<sup>1</sup> alebo

(c)  $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2\text{R}^3$ ;

R<sup>5</sup> je

(a) R<sup>1</sup> alebo

(b)  $-(\text{CH}_2)_x\text{O}(\text{CH}_2)_y\text{H}$ ;

R<sup>6</sup> je

(a) H,

(b) C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub>alkyl,

(c) aryl,

(d) arylC<sub>1-6</sub>alkyl,

(e)  $-(\text{CH}_2)_y\text{CHR}^9(\text{CH}_2)_z\text{H}$ ,

(f)  $-(\text{CH}_2)_y\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_z\text{H}$ ,

(g)  $-(\text{CH}_2)_y\text{C}(\text{R}^7)=\text{CH}(\text{CH}_2)_z\text{H}$ ,

(h)  $-(\text{CH}_2)_y\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_m\text{R}^9$ ,

(i)  $-(\text{CH}_2)_y\text{C}(\text{R}^7)=\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{R}^9$ ,

R<sup>7</sup> a R<sup>8</sup> sú nezávisle

(a) H alebo

(b) C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub>alkyl;

R<sup>9</sup> je

(a) OH alebo

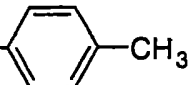
(b)  $\text{NR}^2\text{R}^3$ ;

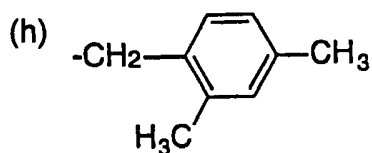
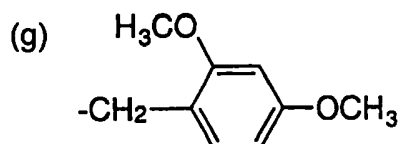
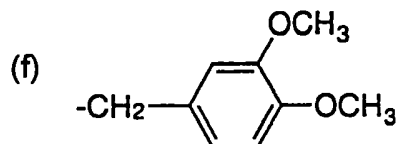
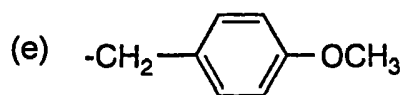
R<sup>10</sup> je

(a) H

(b)  $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,

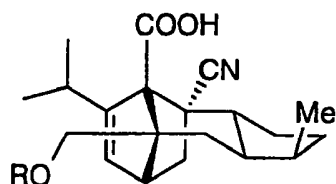
(c)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ,

(d) 



n je 0 alebo 1; m je 1 až 6; x je 2 až 6; y je 0 až 6; z je 0 až 6;  
alebo ich farmaceuticky alebo poľnohospodársky prijateľné soli.

Jedno uskutočnenie vynálezu poskytuje zlúčeniny vzorca Ia



(Ia)

kde

R je

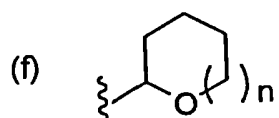
(a)  $C(=O)OR^1$ ,

(b)  $C(=O)NR^2R^3$ ,

(c)  $C(=O)R^4$ ,

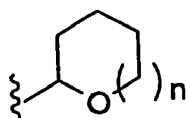
(d)  $CH^2OR^5$ ,

(e)  $C(R^6)(R^7)(R^8)$



alebo ich farmaceuticky prijateľné soli.

V jednej podtriede zlúčenín vzorca Ia znamená R C(=O)OR<sup>1</sup>. V ďalšej podtriede znamená R C(=O)NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>. V ďalšej podtriede znamená R C(=O)R<sup>4</sup>. V ďalšej podtriede znamená R CH<sup>2</sup>OR<sup>5</sup>. V ďalšej podtriede znamená R C(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>)(R<sup>8</sup>). V ešte ďalšej podtriede znamená R



Výhodné uskutočnenie vynálezu poskytuje zlúčeniny vzorca Ia, kde R je CH(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>),

R<sup>6</sup> je

(a) H,

(b) C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub>alkyl,

(c) aryl,

(d) arylC<sub>1-6</sub>alkyl,

(e) -(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>H,

(f) -(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>C(R<sup>7</sup>)=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>H,

R<sup>7</sup> je H alebo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>alkyl.

Ďalšie výhodné uskutočnenie vynálezu poskytuje zlúčeniny vzorca Ia, kde

R je

(a) -CH<sub>3</sub>,

(b) -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

(c) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

(d) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

(e) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

(f) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

(g) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

(h) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

(i) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

j) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

(k) -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>,

(l) -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

- (m)  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ .
- (n)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ,
- (o)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$ ,
- (p)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ,
- (q)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,

Výhodnejšie uskutočnenie vynálezu poskytuje zlúčeniny vzorca Ia, kde

R je

- (a)  $-\text{CH}_3$ ,
- (b)  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (c)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (d)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (e)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (f)  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
- (g)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
- (h)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$ ,
- (i)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ,
- (j)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

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

Ďalej vynález poskytuje poľnohospodársky prostriedok, ktorý obsahuje antifungálne účinné množstvo zlúčeniny vzorca I a poľnohospodársky prijateľný nosič. Poskytuje aj poľnohospodársky prostriedok, ktorý je vyrobený kombináciou zlúčeniny vzorca I a poľnohospodársky prijateľného nosiča.

Ďalej vynález poskytuje spôsob liečby hubovej infekcie u zvierat (vrátane ľudí), ktorý zahŕňa podávanie antifungálne účinného množstva zlúčeniny vzorca I.

Ďalej vynález poskytuje spôsob kontroly fytopatogénnych húb na rastlinách, ktorý zahŕňa aplikovanie antifungálne účinného množstva zlúčeniny vzorca I na rastliny.

Tu použité výrazy, ak nie je uvedené inak, majú nasledujúce významy.

Výraz "alkyl", samostatne alebo ako časť skupiny (napr. aralkyl), znamená nerozvetvený alebo rozvetvený alkylový reťazec, ktorý má uvedený počet atómov uhlíka, ako metyl, etyl, *n*-propyl, *n*-butyl, izopropyl, izobutyl, izopentyl, *sek*-butyl, *terc*-butyl, *n*-hexyl, *n*-oktyl, decyl, undecyl, cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, cyklobutylmetyl, cyklopentyletyl, cyklohexylmetyl a podobne.

Výraz „cykloalkyl“ znamená uhľovodík, ktorý obsahuje jeden alebo viacero kruhov 3 až 12 atómov uhlíka, pričom uhľovodík má najviac 20 atómov uhlíka. Príkladmi cykloalkylových skupín sú cyklopropyl, cyklopropylmetyl, cyklobutyl, 2-cyklopentyletyl, cyklopentyl, cykloheptyl, adamantyl, cyklododecylmetyl, 2-etyl-1-bicyclo[4.4.0]decyl a podobne.

Výraz "aryl", samostatne alebo ako časť skupiny (napr. aralkyl), znamená fenylyl, bifenylyl, terfenylyl, naftyl alebo heteroaryl, z ktorých každý môže byť voliteľne substituovaný jednou až troma skupinami nezávisle vybranými so skupiny, ktorá zahŕňa halogén, hydroxyl, C<sub>1-6</sub>alkyl, C<sub>1-6</sub>alkoxy alebo C<sub>1-4</sub>alkoxykarbonyl. Heteroarylovou skupinou môže byť 5- alebo 6-členný heteroaromatický kruh, ktorý obsahuje jeden alebo viacero heteroatómov vybraných z dusíka, kyslíka a síry. Vhodné príklady heteroarylových skupín zahŕňajú pyridyl, furyl, tienyl a pyrolyl.

Výraz "alkenyl" znamená nerozvetvený alebo rozvetvený uhlíkový reťazec, ktorý má najmenej jednu dvojitú väzbu medzi dvoma uhlíkmi. Príklady zahŕňajú vinyl, alyl, butenyl, izobutenyl, butadienyl a podobne.

Výraz "alkinyl" znamená nerozvetvený alebo rozvetvený uhlíkový reťazec, ktorý má najmenej jednu dvojitú väzbu medzi dvoma uhlíkmi. Príklady zahŕňajú acetylenyl, propargyl, butinyl, 1,3-pentadiynyl a podobne.

Výraz „kontrola“, používaný v spojitosti s fytopatogénnymi hubami, zahŕňa profylaktické použitie (tzn. na ochranu proti infekcii) a liečebné použitie (tzn. na zničenie infekcie).

Výraz „rastliny“ zahŕňa rastliny, listy, kvety, osivo, plody a iné materiály odvodené od rastlín. Výraz zahŕňa aj korene rastlín, prostredníctvom aplikácie účinnej zložky do pôdy.

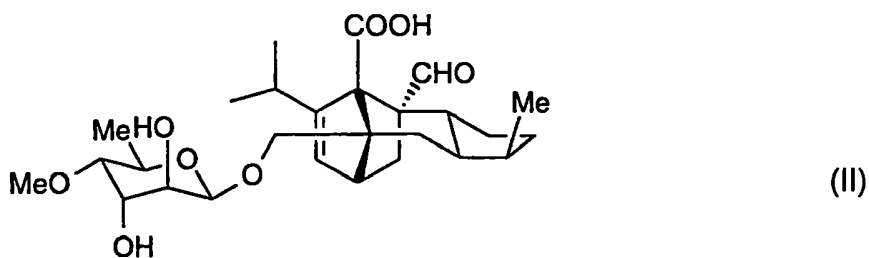
Výraz "prostriedok", ako je použitý vo farmaceutickom alebo poľnohospodárskom prostriedku, je zamýšľaný ako taký, ktorý zahŕňa účinnú zložku (zložky) a inertnú zložku (zložky), ktorá vytvára nosič, ako aj akýkoľvek produkt, ktorý je



priamym alebo nepriamym výsledkom kombinácie, vytvorenia komplexu, agregácie alebo iných interakcií akýchkoľvek dvoch alebo viacerých zložiek alebo disociácie jednej alebo viacerých zložiek alebo z iných typov reakcií jednej alebo viacerých zložiek.

Vhodné soli zlúčeniny vzorca I zahŕňajú anorganické soli, ako soľ alkalických kovov (napr. sodné a draselné soli), amónne soli a organické soli. Vhodné organické soli zahŕňajú amínové soli, ako tetraalkylamóniové (napr. tetrabutylamóniové alebo trimetylacetylámóniové), trialkylamínové (napr. trietylámínové), dialkylamínové soli (napr. dicyklohexylamínové), voliteľne substituované benzylamínové (napr. fenylobenzylamínové alebo *p*-brómbenzylamínové), etanolamínové, dietanolamínové, *N*-metylglukóزامínové, *N*-metyl Piperidínové, pyridínové a substituované pyridínové (napr. colidínové, lutidínové, 4-dimetylaminopyridínové) a tri(hydroxymetyl)metylámínové soli a aminokyselinové soli (napr. lyzínové alebo arginínové soli).

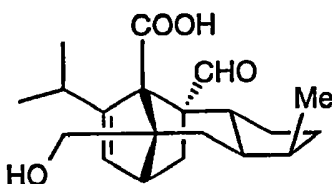
Zlúčeniny vzorca I sa pripravujú zo sordarínu (II) alebo z jeho aglykónu, sodaricínu (III). Sordarín je kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ )8 $\alpha$ -[(6-deoxy-4-*O*-metyl- $\beta$ -D-altropyranosyloxy)metyl]-4-formyl-4,4 $\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ -oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 $\alpha$ (1*H*)-karboxylová vzorca II



Sordarín je možné získať kultiváciou *Sordaria araneosa* NRRL 3196 (tiež uložená v ATCC pod číslom ATCC 36386) v súlade s postupom opísaným v GB1162027 alebo vo WO96/14326. Sordarín je možné izolovať aj z fermentačnej zmesi *Rosellinia subiculata* a neidentifikovanej huby ATCC 74387 ako je opísané nižšie. Obe kultúry boli uložené 27. augusta 1996 v trvalej zbierke American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA v súlade

s Budapeštianskou dohodou o medzinárodnej identifikácii a uložení mikroorganizmov za účelom patentového konania.

Sordaricín (III) je kyselina [1R-(1 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha$  $\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha$  $\beta$ )]4-formyl-8a-(hydroxymetyl)-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-s-indacén-3a(1H)-karboxylová vzorca III



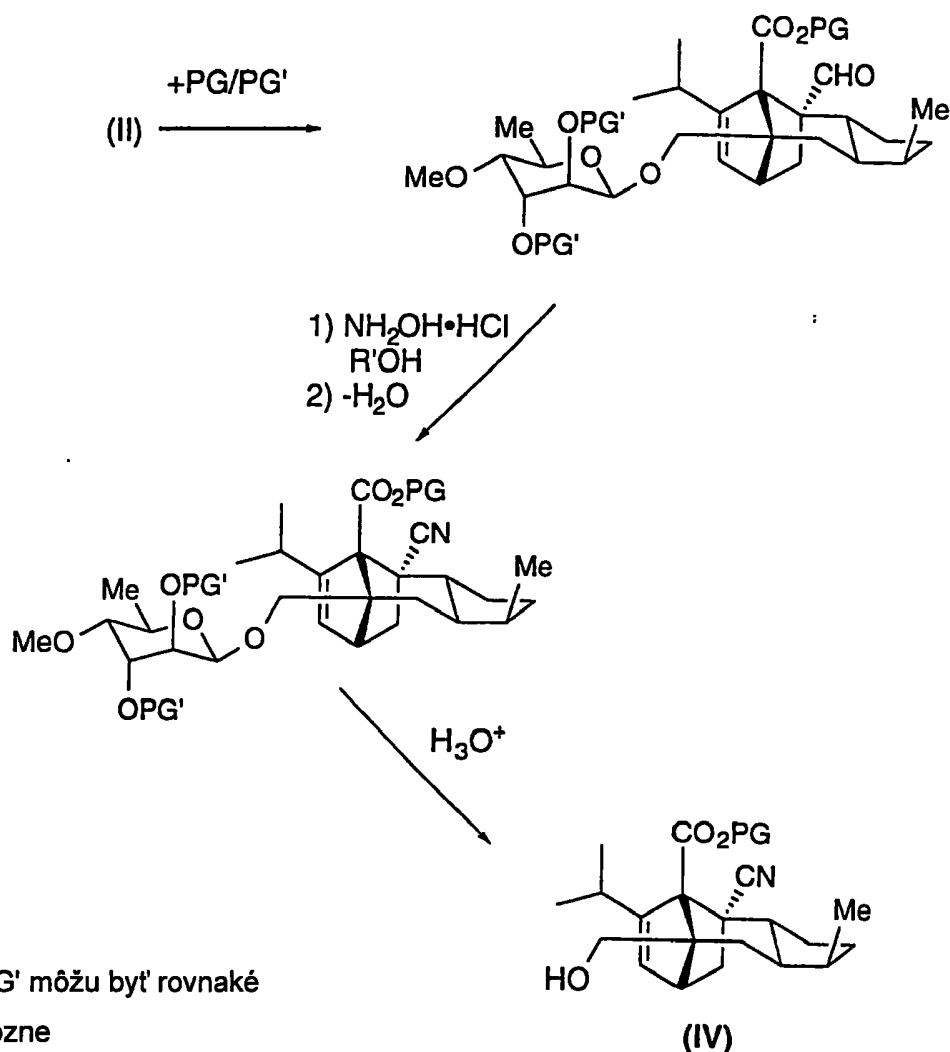
(III)

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

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

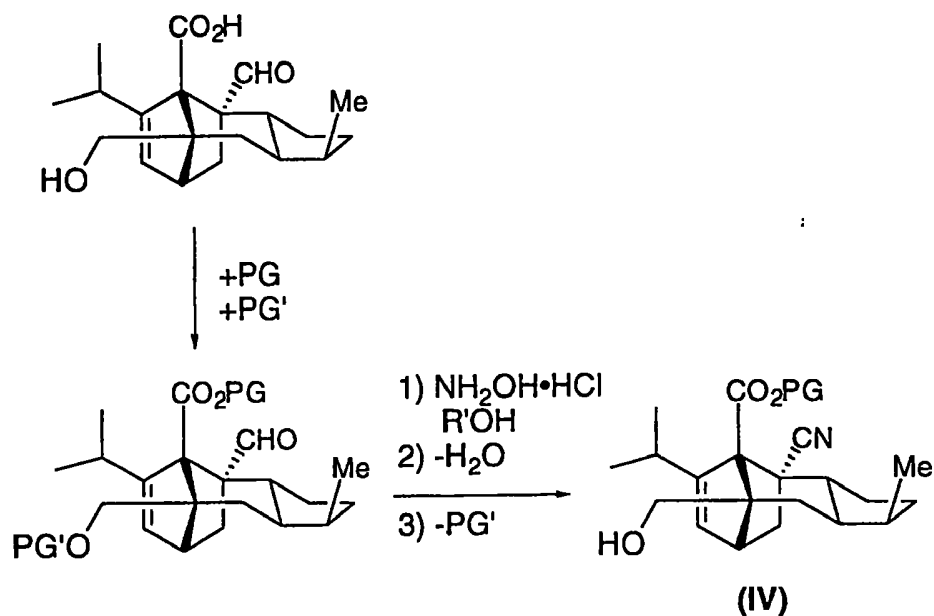
Schéma 1 znázorňuje syntézu karboxy-chráneného 4-kyano-4-deformyl-sordaricínu (IV) zo sordarínu. Tento derivát sordaricínu môže byť použitý ako východiskový materiál na syntézu zlúčenín vzorca I. Sú vytvorené deriváty hydroxylových skupín sordarínu s vhodnou ochrannou skupinou a potom je chránená karboxylová skupina s rovnakou alebo alternatívnou vhodnou skupinou. Formylová skupina sa transformuje na aldoxím a aldoxím sa dehydratuje na nitril (kyano skupinu) s vhodným činidlom akým je vnútorná soľ hydroxidu (metoxy-karbonylsulfamoyl)-trietylamónneho (Burgessovo činidlo). Ochranný sacharid sa odstraňuje kyslou hydrolyzou, čím vzniká zlúčenina vzorca IV.

Schéma 1



Sordaricín sa môže konvertovať na zlúčeninu vzorca IV, ako je znázornené v schéme 2. Karboxylová kyselina a hydroxylové skupiny sordaricínu sú chránené a pripravuje sa aldoxím. Nasleduje dehydratácia s vhodným činidlom, akým je vnútorná soľ hydroxidu (metoxykarbonylsulfamoyl)trietylamónneho (Burgessovo činidlo) a následne odstránenie hydroxylovej ochranej skupiny, čoho výsledkom je zlúčenina vzorca IV.

Schéma 2

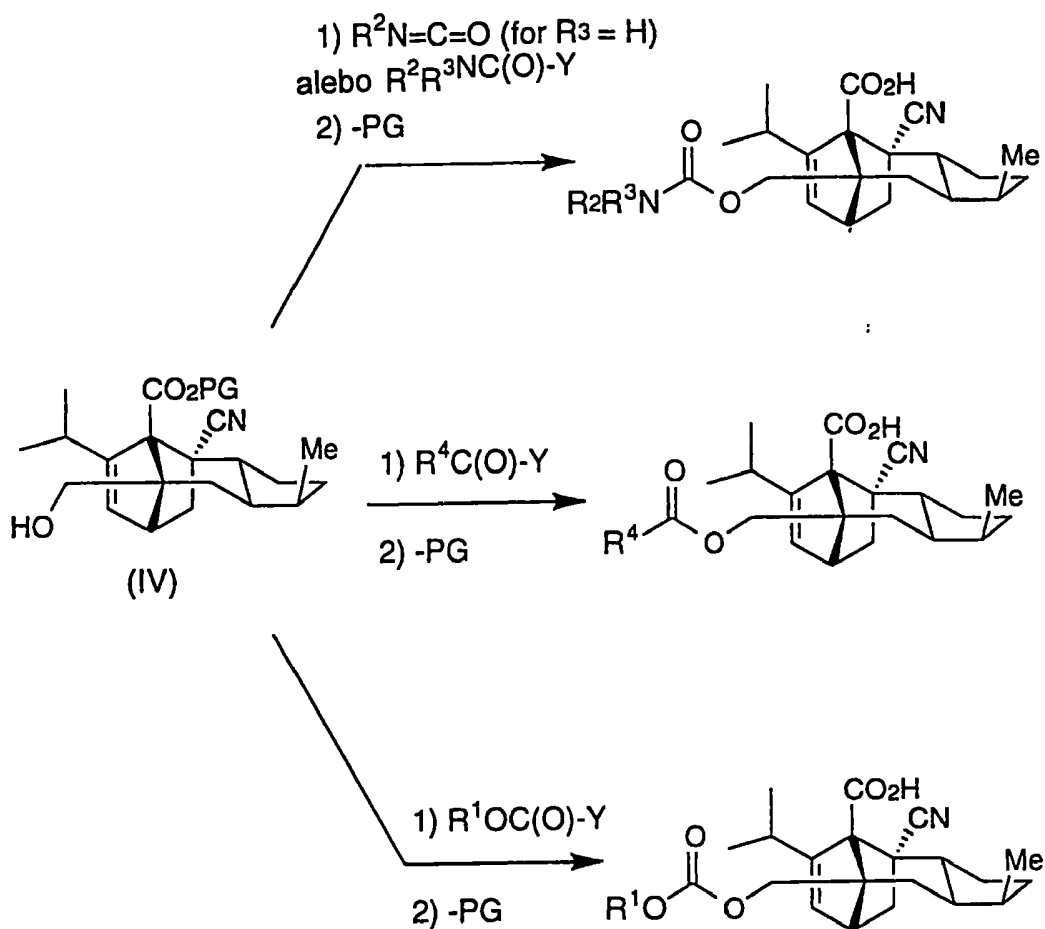


Karbamátové, esterové a karbonátové deriváty 4-kyano-4-deformylsordaricínu je možné pripraviť ako je znázornené v schéme 3. Priprava karbamátov sa môže uskutočňovať ošetrovaním zlúčeniny vzorca IV s izokyanátom (v príkladoch, kde  $\text{R}^3$  je H) alebo s karbamoylovým halogenidom alebo iným účinným karbamoylovým činidlom v inertnom rozpúšťadle.

Esterové deriváty sa môžu pripraviť podobným spôsobom, ošetrovaním zlúčeniny vzorca IV s aktivovanou karbonylovou zlúčeninou, ako chloridom kyseliny alebo zmiešaným anhydridom, výhodne v prítomnosti katalyzátora acylácie, akým je *N,N*-dimetylamino-pyridín a zásady, ako napríklad pyridín.

Karbonátové deriváty sa môžu pripraviť ošetrovaním zlúčeniny vzorca IV s aktivovaným karbonátom, ako chloroformátom alebo pyrokarbonátom. V reakčnej zmesi sa výhodne používa katalyzátor acylácie ako *N,N*-dimetylamino-pyridín a zásada, ako napríklad pyridín.

Schéma 3

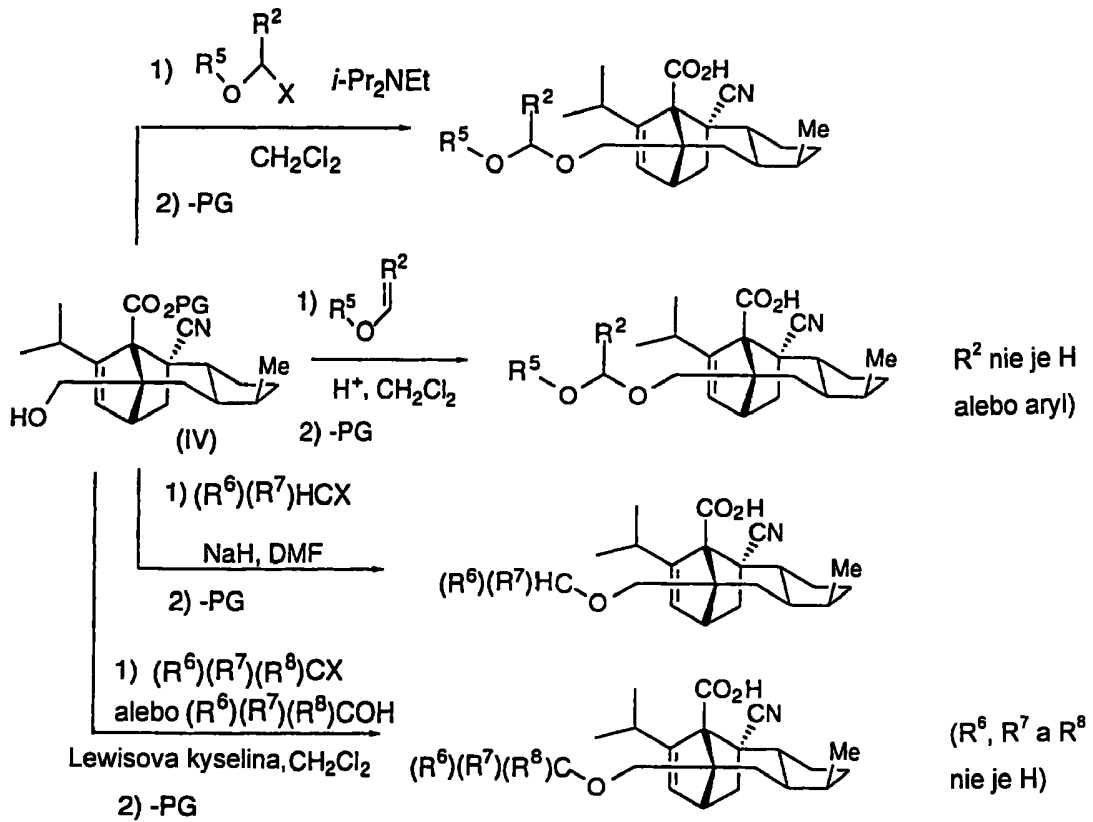


PG je ochranná skupina karboxylovej kyseliny;

$C(O)Y$  je aktivovaný karbonyl, napríklad halogenid kyseliny alebo anhydrid;

Schéma 4 znázorňuje syntézu éterových derivátov 4-kyano-4-deformylsordaricínu. Výsledkom ošetrenia zlúčeniny vzorca IV s  $\alpha$ -halogénéterom v zásaditých podmienkach alebo s vinyléterom v kyslých podmienkach, sú substituované  $\alpha$ -alkoxyéterové deriváty. Výsledkom ošetrenia zlúčeniny vzorca IV s primárnym alebo sekundárnym halogenidom alebo síranom a vhodnou zásadou, ako hydridu sodného, vo výhodných  $SN_2$  podmienkach, sú zodpovedajúce primárne alebo sekundárne éterové deriváty, zatiaľ čo výsledkom ošetrenia zlúčeniny vzorca IV s terciárnym alkoholom, terciárnym halogenidom alebo terciárnym síranom a Lewisovou kyselinou (vrátane protických kyselín) vo výhodných  $SN_1$  podmienkach, je zodpovedajúci terciárny éterový derivát.

Schéma 4

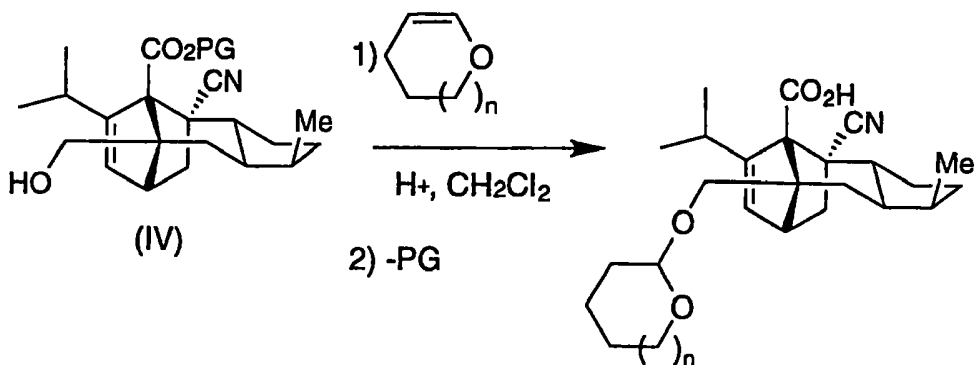


PG je ochranná skupina karboxylovej kyseliny;

X je bežná odštiepiteľná skupina ako je halogenid alebo sulfonát.

Príprava cyklických acetálov zo zlúčeniny vzorca IV je znázornená v schéme 5. Výsledkom ošetrenia zlúčeniny vzorca IV s cyklickým vinyléterom v prítomnosti kyselinového katalyzátora je cyklický acetálový derivát zlúčeniny vzorca IV.

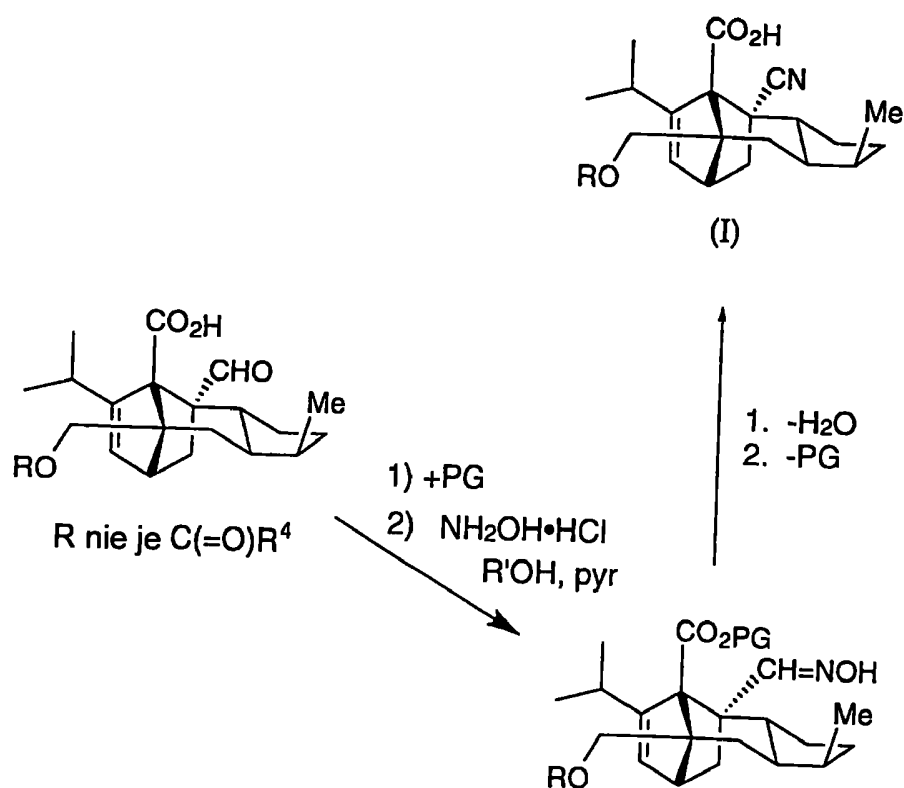
Schéma 5



PG ochranná skupina karboxylovej kyseliny

Zlúčenina vzorca I sa môže pripraviť aj potom ako bola primárna hydroxylová skupina sordaricínu najprv modifikovaná, s výnimkou toho, keď je to esterová skupina, ako je uvedené v Schéme 6. Karbamátové, karbonátové, acetálové, éterové a cyklické acetálové východiskové materiály sa môžu pripraviť podľa všeobecných postupov uvedených v schémach 3 až 5 s tou výnimkou, že namiesto 4-kyano-4-deformylsordaricínu je použitá karboxylová ochranná skupina. Aldoxím derivátu sordaricínu je možné pripraviť ošetrením aldehydovej zlúčeniny s hydrochloridovým hydroxylamínom v alkohol-pyridínovom rozpúšťadlovom systéme. Aldoxím sa môže konvertovať na kyano skupinu reakciou aldoxímu s vhodným dehydratačným činidlom, akým je vnútorná soľ (metoxykarbonylsulfamoyl)-trietylamónneho (Burgessovo činidlo) alebo môže byť použité iné vhodné činidlo na dehydratáciu. Výsledkom odstránenia ochrannej skupiny je zlúčenina vzorca I.

Schéma 6



$\text{R}'\text{OH}$  je nižšie alkylalkoholové rozpúšťadlo;  
PG je ochranná skupina karboxylovej kyseliny.

## Použitie

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

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

Zlúčeniny vzorca I sa môžu použiť aj na liečbu iných infekcií, ktoré sú spôsobené druhmi vláknitých húb, ako *Geotrichum* (napr. *Geotrichum clavatum*), *Trichosporon* (napr. *Trichosporon beigeli*), *Blastoschizomyces* (napr. *Blastoschizomyces capitatus*), *Sporothrix* (napr. *Sporothrix schenckii*), *Scedosporium* (napr. *Scedosporium apiosperum*), *Cladosporium* (napr. *Cladosporium carrionii*) a *Pityrosporum ovale*.

Zlúčeniny vzorca I sa môžu použiť aj na liečbu infekcií, ktoré sú spôsobené prvokmi, ako *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Leishmania*, *Tripanosoma*, *Giardia* a *Trichomonas*.

*In vitro* zhodnotenie anti-fungálneho účinku zlúčenín podľa vynálezu sa uskutočňovalo v kvapalnom alebo pevnom médiu technikou antifungálneho dvojnásobného sériového riedenia, ktorou sa stanovuje minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) antifungálneho činidla, ktorá inhibuje vývoj rasu po 24 až 48 hodinách pri 35 °C. V praxi sa inokulovali série agarových platní alebo médiové mikroriediace panely, ktoré obsahovali dvojnásobné riedenia testovaného antifungálneho činidla, so štandardnou kultúrou klinicky relevantného patogénu, napríklad s *Candida albicans*. Agarové platne alebo médiové mikroriediace panely



sa potom skúmali z hľadiska prítomnosti alebo absencie rastu huby a zaznamenávali sa príslušné MIC hodnoty. Vizualizácia výsledkov sa uskutočnila za pomoci vitálneho kmeňa Alamar Blue.

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

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

Zlúčeniny vzorca I môžu byť použité aj ako širokospektrálne antifungálne činidlá a sú účinné voči širokému spektru fytopatogénnych húb, najmä húb z tried, ktoré zahŕňajú: *Deuteromycetes* (napr. *Botrytis spp.*, *Septoria spp.*, *Pyricularia spp.*, *Stagnospora spp.*, *Helminthosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Cercospora spp.*, *Rhynchosporium spp.*, *Pseudocercospora spp.* a *Alternaria spp.*); *Basidiomycetes* (napr. *Puccinia spp.*, *Rhizoctonia spp.* a *Hemileia*); *Ascomycetes* (napr. *Venturia spp.*, *Podosphaera spp.*, *Erysiphe spp.*, *Monilinia spp.* a *Uncinula spp.*); a

*Oomycetes* (napr. *Phytophthora spp.*, *Pemospora spp.*, *Bremia spp.*, *Pythium spp.*, a *Plasmopara spp.*). Vo vyššie uvedenom zozname sú uvedené príklady fytopatogénnych húb, voči ktorým, ako sa ukázalo, sú účinné menované zlúčeniny, ale žiadnym spôsobom nie sú obmedzené. Tieto zlúčeniny majú veľmi výhodné liečebné a preventívne fungicídne vlastnosti na ochranu rastlín, a môžu byť použité na inhibíciu alebo zničenie organizmov vyskytujúcich sa na rastlinách alebo na častiach rastlín (plod, kvet, listy, stonky, hľuzy alebo korene) rôznych úžitkových plodín, pričom časti rastlín, ktorá narastú neskôr sú tiež chránené voči takýmto mikroorganizmom. Môžu byť použité aj ako moridlá na ošetrovanie rastlinného rozmnožovacieho materiálu, najmä semien (plod, hľuza, zrno) a rastlinných rezov (napríklad ryža), na poskytnutie ochrany voči hubovým infekciám a fytopatogénnym hubám, ktoré sa nachádzajú v pôde. Zlúčeniny vzorca I podľa vynálezu sa vyznačujú tým, že sú veľmi dobre tolerované rastlinami a sú šetrné voči životnému prostrediu.

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

#### 1. Pôsobenie proti *Erysiphe graminis* na pšenici

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

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

c) Po týždňovej kultivácii sa pšeničné rastliny infikovali s askospórami vytrasenými z inokulačných rastlín. Po 24 hodinách sa pôda, v ktorej sa pestovali pšeničné rastliny, premočila so zmáčacou zmesou (200ppm účinná zložka/ 20%

acetón/ 0,25% Triton X155). Hubový útok sa zhodnotil po 8 dňovej inkubácii pri 22 °C, pri 50% relatívnej vlhkosti, aby sa stanovila ochrana poskytovaná zlúčeninou.

## 2. Pôsobenie proti *Puccinia recondita* na pšenici

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

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

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

Na základe spektra účinku je možné zlúčeniny podľa vynálezu použiť na ochranu alebo zbavenie rastlín fytopatogénnych húb, ktoré ovplyvňujú rôzne užitočné plodiny. Nasledujúce druhy rastlín sú vhodné ako materiál pre použitie uvedených zlúčenín podľa vynálezu: obilniny (napr. pšenica, raž, ovos, jačmeň, ryža, čirok a príbuzné plodiny); repa (cukrová repa a kýmna repa); jadroviny, kôstkoviny a mäkké ovocie (napr. jablká, hrušky, slivky, broskyne, mandle, čerešne, jahody, maliny a černice); strukoviny (napr. fazuľa, hrach a sója); olejové rastliny (repka olejná, horčica, mak, olivy, slnečnice, kokosové rastliny, ricínové rastliny, kakaové bôby a podzemnica olejná); Cucurbitaceae (napr. uhorka, akákoľvek dyňová zelenina a melón); vláknité rastliny (napr. bavlna, ľan, konope a juta);

citrusové plody (napr. pomaranče, citróny, mandarínky a grapefruity); zelenina (napr. šalát, kapusta, kel, špenát, mrkva, asparágus, paprika, cibuľa, rajčiny a zemiaky); Lauraceae (avokádo, škorica a gáfor); alebo rastliny ako kukurica, tabak, lieskovce, káva, cukrová trstina, čajovník, vínna réva, chmeľ, banánovník a kaučukovník, ako aj okrasné rastliny (kvety, kroviny, listnaté stromy a vždyzelené rastliny, ako ihličnany). Avšak vyššie uvedené rastlinné druhy nepredstavujú obmedzujúci zoznam rastlín vo vzťahu k spektru uvedených zlúčenín.

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

*Erysiphe graminis* na obilninách, *Erysiphe cichoracearum* a *Sphaerotheca fuliginea* na Cucurbitaceae, *Podosphaera leucotricha* na jablkách, *Uncinula necator* na vínnej réve, *Puccinia species* na obilninách, *Rhizoctonia solani* na bavľne, *Ustilago species* na obilninách a cukrovej trstine, *Venturia inaequalis* (chrastavitosť) na jablkách, *Helminthosporium species* na obilninách, *Septoria nodorum* na pšenici, *Botrytis cinerea* (sivá pleseň) na jahodách a hrozne, *Cercospora arachidicola* na podzemnici olejnej, *Pseudocercospora herpotrichoides* na pšenici a jačmeni, *Pyricularia oryzae* na ryži, *Phytophthora infestans* na zemiakoch a rajčinách, *Fusarium* a *Verticillium species* na rôznych rastlinách, *Plasmopara viticola* na hrozne, *Alternaria species* na ovoci a zelenine. Zlúčeniny vzorca I je možné použiť aj ako ochranné materiály (napr. na ochranu dreva voči *Paecilomyces variotii*).

#### Farmaceutické prostriedky

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

Zlúčeniny podľa vynálezu zahŕňajú zlúčeniny, ktoré sú špeciálne formulované na orálne, bukálne, parenterálne, implantátové, rektálne, topické, oftalmické alebo

genito-urinárne podanie alebo sú vo forme vhodnej na podanie inhaláciou alebo insufláciou.

Tablety a kapsuly na orálne podanie môžu obsahovať bežné vehikulá ako väzobné činidlá, napríklad sirup, akáciovú želatínu, želatínu, sorbitol, tragant, škrobové lepidlo alebo polyvinylpyrolidón; náplne, napríklad laktózu, sacharid, mikrokryštalickú celulózu, kukuričný škrob, fosforečnan vápenatý alebo sorbitol; lubrikanty, napríklad stearát horečnatý, kyselinu steárovú, mastenec, polyetylénglykol alebo kremičitan; dezintegranty, napríklad zemiakový škrob alebo sodný škrobový glykolát alebo kroskarmelózu sodnú; alebo zmáčacie činidlá ako laurylsulfát sodný. Tablety, ktoré zahŕňajú žuvateľné, disperzibilné a šumivé tablety, je možné obaliť spôsobmi, ktoré sú v oblasti dobre známe. Orálne kvapalné prípravky môžu byť napríklad vo forme vodných alebo olejových suspenzií, roztokov, emulzií, sirupov alebo elixírov alebo môžu byť vo forme suchého produktu na konštitúciu s vodou alebo iným vhodným vehikulom pred použitím. Takéto kvapalné prípravky môžu obsahovať bežné aditíva ako suspendačné činidlá, napríklad sorbitolový sirup, metylcelulózu, glukózový/sacharidový sirup, želatínu, hydroxyetylcelulózu, karboxymetylcelulózu, gél zo stearátu hlinitého alebo hydrogenované jedlé tuky; emulzifikačné činidlá, napríklad lecitín, sorbitan, monooleát alebo akáciovú želatínu; nevodné vehikulá (ktoré môžu zahŕňať jedlé oleje), napríklad mandľový olej, frakcionovaný kokosový olej, olejové estery, propylénglykol alebo etylalkohol; a konzervačné látky, napríklad metyl alebo propyl *p*-hydroxybenzoáty alebo kyselinu sorbovú.

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

Prostriedok podľa vynálezu môže byť formulovaný na parenterálne podanie injekciou alebo kontinuálnou infúziou. Injekčné prostriedky môžu byť vo forme dávkovacích jednotiek v ampulách alebo v multidávkových kontajneroch s pridanými konzervačnými látkami. Prostriedky môžu byť vo forme suspenzií, roztokov alebo emulzií v olejových alebo vodných vehikulách a môžu obsahovať formulačné činidlá, ako suspendačné, stabilizačné a/alebo dispergačné činidlá. Alternatívne môže byť účinná zložka vo forme prášku na konštitúciu s vhodným vehikulom pred použitím, napr. sterilnou vodou bez pyrogénu.

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

Alternatívne môžu byť na podanie inhaláciou prostriedky podľa vynálezu vo forme suchej práškovej kompozície, napríklad ako prášková zmes zlúčeniny a vhodnej práškovej bázy, ako laktózy alebo škrobu alebo môže byť v modifikovanej fyzikálnej forme len samotná liečivá látka. Práškový prostriedok môže byť v jednotkovej dávkovej forme, napríklad v kapsulách alebo náplniach, napr. želatíne alebo v blistrových baleniach, z ktorých sa prášok môže podávať za pomoci inhalátora alebo insuflátora.

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

Prostriedky môžu byť formulované aj na topické podanie vo forme masťi, krémov, gélov, pleťových vôd, šampónov, práškov (vrátane sprejových práškov), pesarov, tampónov, sprejov, mastičiek, aerosolov, kvapiek (napr. očných ušných alebo nosných) alebo náterov. Masti a krémy môžu byť napríklad formulované s vodným alebo olejovým základom s pridaním vhodného hustiaceho a/alebo gélovacieho činidla. Masti na podanie do oka môžu byť vyrábané sterilným spôsobom použitím sterilných zložiek. Nátery môžu byť formulované napríklad na veterinárne použitie v olejoch s obsahom organických rozpúšťadiel, voliteľne s formulačnými činidlami, napríklad stabilizačným a solubilizačnými činidlami. Pesary a tampóny na zasunutie do vagíny môžu byť formulované použitím bežných techník, a ak je to vhodné, môžu obsahovať šumivé vehikulum. Takéto prostriedky môžu obsahovať aj iné účinné zložky ako kortikosteroidy, antibiotiká alebo antiparazitiká, ak je to vhodné.

Kvapalné prostriedky na intranazálne podanie môžu byť vo forme roztokov alebo suspenzií a môžu obsahovať bežné vehikulá, ako činidlá upravujúce tonicitu, chlorid sodný, dextrózu alebo manitol; konzervačné látky, napríklad benzalkónium

chlorid, tiomerzal, fenyletyalkohol; a iné formulačné činidlá, ako suspenzačné, tlmiace, stabilizačné, disperzačné a/alebo chuťové činidlá.

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

Prostriedok podľa vynálezu môže byť vo forme prípravku s predĺženým účinkom. Takéto prostriedky s dlhotrvajúcim účinkom je možné podávať implantáciou (napríklad subkutánnou alebo intramuskulárnou) alebo intramuskulárnou injekciou. Takže zlúčenina podľa vynálezu môže byť formulovaná napríklad s vhodnými polymérnymi alebo hydrofóbnymi materiálmi (napríklad ako emulzia v prijateľnom oleji) alebo s iónovými výmennými živcami, alebo ako stredne rozpustný derivát, napríklad ako stredne rozpustná soľ.

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

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

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

Takže zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť použité napríklad v kombinácii s jedným alebo viacerými antifungálnymi činidlami, ako polyénovými derivátmi napr. (Amfotericín B, Nystatín, lipidová formulácia Amfotericínu B), azolovým derivátom napr. (Flukonazol, Intrakonazol, Ketokonazol, Mikonazol, Klotrimazol, ZD-08070,

UK-109496, SCH 56592), 5-Fluórcytozínovými, Pneumokandínovými alebo Echinokandínovými derivátmi, ako Cilofungín, LY-303366, L-733560, L-743872 alebo s inými zlúčeninami pôsobiacimi na bunkovú stenu, ako Nikkomycín Z a/alebo s jedným alebo viacerými imunomodulačnými činidlami, ako interferón, napr. (IFN-), interleukín napr. (IL-1, IL-2, IL-3 a IL-8) a faktory stimulujúce kolónie, [(G)-CSF, (M)-CSF a (GM)-CSF] a defenzíny. Výhodnými zlúčeninami na použitie so zlúčeninami podľa vynálezu sú najmä Intrakonazol, Flucytozín, Flukonazol alebo Amfotericín B.

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

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

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

#### Agrochemické prostriedky

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



môžu pripraviť zmiešaním alebo zomletím účinných zložiek s pevným nosičom. Granuly, napr. potiahnuté, impregnované alebo homogénne granuly, je možné pripraviť naviazaním účinných zložiek na pevné nosiče.

Vhodnými rozpúšťadlami sú: aromatické uhľovodíky, výhodne frakcie s obsahom 8 až 12 atómov uhlíka, ako xylénové zmesi alebo substituované naftalény, chlórované aromatické zlúčeniny, ako chlórbenzény, ftaláty, ako dibutyl- alebo dioktylftalát, alifatické uhľovodíky, ako cyklohexán alebo parafíny, alkoholy a glykoly a ich étery a estery, ako etanol, etylénglykol, etylénglykolmonometyl- alebo monoetyléter, ketóny ako cyklohexanón, amíny, ako etanolamín, silné polárne rozpúšťadlá, ako *N*-metyl-2-pyrolidón, dimetylsulfoxid alebo dimetylformamid, a rastlinné oleje, ako epoxidovaný kokosový olej alebo sójový olej; a voda.

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

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

Zlúčeniny vzorca I sa môžu zmiešať a aplikovať spolu s inými účinnými zložkami, napríklad herbicídmi, insekticídmi, baktericídmi, nematocídmi, molusko-cídmi, rastovými regulátormi, mikronutričnými látkami a hnojivami. Ďalšími zložkami môže byť aj jeden alebo viacero fungicídov patriacich, ale neobmedzených, na nasledujúce triedy fungicídov: karboxamidy, benzimidazoly, triazoly, hydroxy-pyridíny, dikarboxamidy, fenylamidy, tiadiazoly, karbamáty, kyano-oxímy, deriváty kyseliny kinamovej, morfolíny, imidazoly, B-metoxiakryláty a pyridíny/pyrimidíny. Navyše tieto ďalšie účinné zložky môžu byť použité ako zmesi niekoľkých prípravkov, ak je to želateľné, spolu s inými aplikačnými podpornými adjuvans, ktoré sa zvyčajne používajú v oblasti takýchto formulácií. Vhodné nosiče a adjuvans môžu byť tuhé alebo kvapalné a zodpovedajú látkam, ktoré sa typicky používajú vo formulačnej technológii (napr. prirodzené alebo regenerované minerálne látky, rozpúšťadlá, disperganty a zmáčacie činidlá).

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

1,4-dichlór-2,5-dimetoxybenzén, 4-(2-chlórphenylhydrazón)-3-metyl-5-izoxazolón, 2-tiopyridín-1-oxid, 8-hydroxychinolín a jeho meďnatá soľ, 2,3-dihydro-5-karboxanilido-6-metyl-1,4-oxatín, 2,3-dihydro-5-karboxanilido-6-metyl-1,4-oxatín-4,4-dioxid, 2-metyl-5,6-dihydro-4*H*-pyrán-3-karboxanilid, 2-metylfurán-3-karboxanilid, 2,5-dimetylfurán-3-karboxanilid, 2,4,5-trimetylfurán-3-karboxanilid, 2,5-dimetyl-*N*-cyklohexylfurán-3-karboxamid, *N*-cyklohexyl-*N*-metoxy-2,5-dietylfurán-3-karboxamid, 2-metylbenzanilid, 2-jódbenzanilid, *N*-formyl-*N*-morfolín-2,2,2-trichlóretylacetál, piperazín-1,4-diylbis-(1-(2,2,2-trichlóretyl)-formamid), 1-(3,4-dichlóranilino)-1-formylamino-2,2,2-trichlórétán, 2,6-dimetyl-*N*-tridecylmorfolín a jeho soli, 2,6-dimetyl-*N*-cyklododecylmorfolín a jeho soli, *N*-[3-(*p*-*terc*-butylfenyl)-2-metylpropyl]-*cis*-2,6-dimetylmorfolín, *N*-3-(*p*-*terc*-butylfenyl)-2-metylpropyl]-piperidín, 1-2-(2,4-dichlórfenyl)-4-etyl-1,3-dioxolán-2-yletyl]-1*H*-1,2,4-triazol, 1-[2-(2,4-dichlórfenyl)-4-*n*-propyl-1,3,3-dioxolán-2-yl-etyl]-1*H*-1,2,4-triazole, *N*-(*n*-propyl)-*N*-(2,4,6-trichlórfenoxyetyl)-*N*-imidazolylmočovina, 1-(4-chlórfenoxy)-3,3-dimetyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-bután-2-ón, 1-(4-chlórfenoxy)-3,3-dimetyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-bután-2-ol,  $\alpha$ -(2-chlórfenyl)- $\alpha$ -(4-chlórfenyl)-5-pyrimidínmetanol, 5-butyl-(2-dimetylamino-4-hydroxy-6-metylpyrimidín, bis-(*p*-chlórfenyl)-3-pyridínmetanol, 1,2-bis-(3-etoxykarbonyl-2-tioureido)benzén, 1,2-bis-(3-metoxycarbonyl-2-tioureido)benzén, a rôzne fungicidy, ako dodecylguanidínacetát, 3-[3-(3,5-dimetyl-2-oxycyklohexyl)-2-hydroxyetyl]-glutaramid, hexachlórbenzén, DL-metyl-*N*-(2,6-dimetylfenyl)-*N*-fur-2-ylalanát, metyl-DL-*N*-(2,6-dimetylfenyl)-*N*-(2-metoxiacetyl)alanát, *N*-(2,6-dimetylfenyl)-*N*-chlór-acetyl-DL-2-aminobutyrolaktón, metyl-DL-*N*-(2,6-dimetylfenyl)-*N*-(fenylacetyl)alanát, 5-metyl-5-vinyl-3-(3,5-dichlórfenyl)-2,4-dioxo-1,3-oxazolidín, 3-[3,5-dichlórfenyl]-5-metyl-5-metoxymetyl-1,3-oxazolidín-2,4-dión, 3-(3,5-dichlórfenyl)-1-izo-propylkarbamylhydantoín, *N*-(3,5-dichlórfenyl)-1,2-dimetylcyklopropán-1,2-dikarboximid, 2-kyano-[*N*-(etylaminokarbonyl)-2-metoximino]acetamid, 1-[2-(2,4-dichlórfenyl)pentyl]-1*H*-1,2,4-triazol, 2,4-difluór-*a*-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmetyl)benzhydrylalkohol, *N*-(3-chlór-2,6-dinitro-4-trifluórmetylfenyl)-5-trifluórmetyl-3-chlór-2-aminopyridín a 1-((bis-(4-fluórfenyl)metylsilyl)metyl)-1*H*-1,2,4-triazol.

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

spôsobom aplikácie účinnej zložky alebo agrochemického prostriedku, ktorý obsahuje najmenej jednu zo zlúčenín uvedených v prihláške, je aplikácia na rastliny (tzn. listová aplikácia). Avšak účinná zložka môže do rastliny penetrovať aj cez korene z pôdy (tzn. pôdna aplikácia). To sa môže uskutočniť aplikáciou kvapaliny do pôdy (zmáčaním) alebo aplikáciou granúl. Účinná zložka sa môže aplikovať aj na rastlinný propagačný materiál, ako semená (plody, hľuzy alebo zrná) alebo rastlinné odrezky, buď v kvapalnej forme (natieranie), alebo v tuhej forme (morenie).

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

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

#### Príklady uskutočnenia vynálezu

#### Príprava východiskových zlúčenín

#### Výroba sordarínu fermentáciou

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

#### Násadové médium

<u>Zložka</u>	<u>g/l</u>
Kvasinkový extrakt	4,0

Sladový extrakt	8,0
Glukóza	4,0
Junlon	1,5

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

#### Násadové médium 2

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

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

#### Tuhé produkčné médium 1

##### 1. Tuhá časť

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

## 2. Kvapalná časť

Do 500ml banky pridať 220 ml nasledujúcich zložiek:

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

### K-elementy

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

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

### Kvapalné produkčné médium 1

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

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

### Tuhé produkčné médium 2

#### 1. Tuhá časť

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

#### 2. Kvapalná časť

Do 500ml banky pridať 220 ml nasledujúcich zložiek:

Zložka	g/l
Sacharóza	60,0
Glukóza	80,0
Glycerol	60,0

Kyselina citrónová	15,0
NZ amín Typ A	5,0
NaNO <sub>3</sub>	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCO <sub>3</sub>	0,5
K-elementy	1 ml/l

#### K-elementy

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

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

#### Kvapalné produkčné médium 2

Zloženie je podobné ako zloženie kvapalnej časti pevného produkčného média 1. Médium sa pripravilo s destilovanou vodou, pH sa pred sterilizáciou nastavilo na 7,0. Glukóza sa autoklávovala oddelene. Médium sa naplnilo po 50 ml do 250 ml Erlenmeyerových baniek. Banky sa uzavreli bavlneným uzáverom a autoklávovali sa pri 121 °C 15 minút.



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

### 1. Kultúra

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

### 2. Násada

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

### 3. Produkcia

Na tuhom produkčnom médiu

Alikvot (10 až 12 ml) násady sa umiestnil do 220 ml kvapalnej časti tuhého produkčného média 1. Táto fľaša sa silne zvirila, aby sa dispergovala biomasa. Obsahy sa vliali do 2-litrovej okrúhlej kultivačnej nádoby, ktorá obsahovala 0,675 l vermikulitu s veľkými časticami. Obsahy okrúhlej fľaše sa pretrepali/zmiešali, aby sa zaistila homogénna inokulácia a pokrytie. Kruhové fľaše sa inkubovali horizontálne, pričom sa otáčali rýchlosťou približne 4 otáčky za minútu na Wheaton otáčacom zariadení, pri 22 °C, 70% rh, 17 dní, na získanie sekundárneho metabolitu vo fermentačnom médiu.

V kvapalnom produkčnom médiu

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

Produkcia Sordarínu fermentáciou MF6232 (ATCC 74387)

### 1. Kultúra

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

### 2. Násada

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

### 3. Produkcia

Na tuhom produkčnom médiu

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

homogénna inokulácia a pokrytie. Kruhové fľaše sa inkubovali horizontálne, pričom sa otáčali rýchlosťou približne 4 otáčky za minútu na Wheaton otáčacom zariadení, pri 22 °C, 70% rh, 21 dní, na získanie sekundárneho metabolitu vo fermentačnom médiu.

V kvapalnom produkčnom médiu

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

Produkcja Sordarínu vo veľkom meradle prostredníctvom MF6232 (ATCC 74387)

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

Rast v produkčnom fermentore dosiahol 8 až 10 mmol/l/h po 50 hodinách a poklesol medzi 5 a 7 mmol/l/h ku koncu kultivácie. Rozpustený kyslík sa kontroloval zvýšením premiešavania. pH média sa kontrolovalo a vo všeobecnosti pokleslo na 5,3 po 200 hodinách. Teplota bola 25 °C.

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

## Izolácia Sordarínu

### Izolácia I

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

*In vacuo* sa koncentrovala zásoba surovej frakcie do sucha (103,1 mg). 34,4mg podiel tejto vzorky sa ďalej purifikoval prostredníctvom HPLC separácie (Zorbax Rx-C8, 5  $\mu$ m, 9,4 mm x 250 mm, eluovaný mobilnou fázou pozostávajúcou zo zmesi 20% acetonitrilu a 80% vodného 0,01M  $K_2HPO_4$ , pH nastavené na pH 6,9 s koncentrovanou  $H_3PO_4$ , rýchlosť prietoku 4 ml/min., pri 40 °C, detekcia diódovým radom). Izolovali sa mililitrové frakcie. Zhromaždili sa frakcie bohaté na produkt 16 až 20 a koncentrovali sa *in vacuo* na približne dvadsaťpäť percent pôvodného objemu. Koncentrát sa dvojnásobne extrahoval s rovnakým objemom etylacetátu a etylacetátové vrstvy sa premývali s rovnakým objemom soľného roztoku, vysušili sa na bezvodnom  $Na_2SO_4$  a koncentrovali sa *in vacuo*, čím vzniklo 3,7 mg sordarínu.

### Izolácia II

Metyletylketónový extrakt dávky -004Y fermentačnej kultúry MF6232 (ATCC74387) zodpovedajúci 980 ml celkového média sa *in vacuo* zakoncentroval do sucha (4,9 g). Tento materiál sa rozpustil v 1 dieli metanolu a v 9 dieloch metylénchloridu do konečného objemu 21,5 ml. 21 ml podiel (4,8 g) sa aplikoval na 500ml silikagélovú 60 (0,040 až 0,0630 mm, 230 až 400 mesh, E. Merck) chromatografickú kolónu ekvilibrovanú 2% metanolom v metylénchloride. Kolóna sa eluovala s rýchlosťou prietoku 25 ml/min krokovým gradientom, ktorý začínal litrovými

dávkami 2 a 5 percentného metanolu v metylénchloride a nasledovali dva litre 15 percentného metanolu. Kolóna sa doplnila jedným litrom 30% a jedným litrom 10% metanolu. Izolovali sa dvadsaťpäťlitrové frakcie. Frakcie bohaté na produkt 75 až 85 a 111 až 121 sa stanovili biologickým testom a frakcie obsahujúce zlúčeninu vzorca I sa stanovili RP HPLC analýzou v kyslých podmienkach.

Zásoby surových frakcií 75 až 85 a 111 až 121 sa oddelene zakoncentrovali *in vacuo* do sucha (69,3 mg, respektíve 95,3 mg). Dva 34mg diely zásoby 75 až 85 sa ďalej purifikovali dvoma identickými HPLC separáciami (Zorbax Rx-C8, 7  $\mu$ m, 21,2 mm x 250 mm, eluovanie prebiehalo s mobilnou fázou pozostávajúcou zo zmesi 40 % acetonitrilu a 60 % H<sub>2</sub>O s celkovým 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, rýchlosť prietoku 20 ml/min, pri 25 °C, 220 nm). Izolovali sa desaťmililitrové frakcie. Spojili sa na produkt bohaté frakcie 27 až 31 z oboch kôl a *in vacuo* sa zakoncentrovali na približne štyridsať percent pôvodného objemu. Koncentrát sa extrahoval s rovnakým objemom etylacetátu a premýval sa rovnakým objemom soľného roztoku, vysušil sa na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a koncentroval sa *in vacuo*, čím vzniklo 27 mg sordarínu. Dva 46mg podiely zásoby 111 až 121 sa tiež ďalej purifikovali HPLC za rovnakých podmienok, ako bolo uvedené vyššie. Skombinovali sa frakcie 25 až 28 z oboch kôl a pripravili sa ako bolo opísané vyššie, čím vzniklo ďalších 17 mg sordarínu.

#### Príprava sordaricínového benzylesteru

Sordarín (2 mg) sa rozpustil v 1 ml acetónu. Pridala sa koncentrovaná HCl (0,2 ml). Zmes sa jeden deň miešala pri laboratórnej teplote. Po rozriedení s vodou a vodnom spracovaní (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) sa organická frakcia vysušila na Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrovala sa a *in vacuo* sa zakoncentrovala. Zmes sa rozpustila v 2 ml DMF, do ktorej sa pridalo 0,1 ml benzylobromidu, a následne nadbytok tuhého NaHCO<sub>3</sub>. Zmes sa cez noc miešala pri laboratórnej teplote a zakoncentrovala sa *in vacuo*. Do zmesi sa pridala chloroform a táto sa potom filtrovala, aby sa odstránil NaHCO<sub>3</sub>. Filtrát sa koncentroval *in vacuo* a purifikoval sa preparatívnou chromatografiou na tenkej vrstve (PTLC), čím vzniklo 1,0 mg sordaricínového benzylesteru.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,51 (3H, d, J = 6,9), 0,82 (3H, d, J = 6,6), 0,91 (1H, m), 1,0 (3H, d, J = 6,6), 1,18 (1H, d, J = 12,6), 1,50-2,00 (9H, m), 2,24 (1H, m), 2,51 (1H, m),

3,48 (1H, d, J = 11,0), 3,87 (1H, d, J = 11,0), 5,11 (1H, d, J = 11,7), 5,31 (1H, d, J = 11,7), 6,04 (1H, d, J = 2,1), 7,31-7,40 (5H, m), 9,62 (1H, s).

#### Príprava sordaricínového *p*-metoxybenzylesteru

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

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,51 (3H, d, J = 6,9), 0,82 (3H, d, J = 6,9), 1,00 (3H, d, J = 6,9), 0,90-2,00 (11H, m), 2,23 (1H, m), 2,49 (1H, t, J = 3,8), 3,79 (3H, s), 4,61 (2H, s), 5,05 (1H, d, J = 11,7), 5,26 (1H, d, J = 11,7), 6,03 (1H, d, J = 3,2), 6,88 (2H, d, J = 8,7), 7,28 (2H, d, J = 8,7), 9,60 (1H, s).

#### Príprava sordaricínového alylesteru

Použil sa rovnaký postup ako pri príprave sordaricínového benzylesteru, pričom namiesto benzylbromidu bol použitý alkylbromid. Týmto spôsobom sa získala zlúčenina uvedená v názve.

#### Príprava Sordaricínu

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

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,82 (3H, d, J = 6,8), 0,98 (3H, d, J = 6,6), 1,01 (3H, d, J = 6,9), 1,23 (1H, m), 1,25 (1H, d, J = 12,6), 1,582,10 (9H, m), 2,34 (1H, m), 2,41 (1H, t, J = 3,6), 3,45 (1H, d, J = 11,0), 4,14 (1H, d, J = 11,0), 6,05 (1H, d, J = 3,0), 9,75 (1H, s).

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

#### Príklad 1

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

### Spôsob A

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

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

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

Roztok benzylesteru 2',3'-di-*O*-benzyl-4-kyano-4-deformylsordarínu sa pripravil v acetóne. Pridala sa koncentrovaná kyselina chlorovodíková (20% objemu acetónu) a zmes sa miešala pri laboratórnej teplote približne jeden deň, alebo pokiaľ nebola dostatočne ukončená reakcia, čo sa posudzovalo analytickou chromatografiou. Po nariedení s vodou a vodnom spracovaní (dichlórmetán) sa organická frakcia vysušila na Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrovala sa a zakoncentrovala sa *in vacuo*. Výsledkom purifikácie prostredníctvom PTLC bola zlúčenina.

### Spôsob B

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

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

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

Nitril získaný vyššie (67,5 mg) sa rozpustil v 5 ml dichlórmetánu, do ktorého sa pridali DDQ (43 mg) a 0,5 ml vody. Zmes sa miešala 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Po vodnom spracovaní a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získalo 47,6 mg (91%) zlúčeniny uvedenej v názve príkladu.

## Príklad 2

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

Benzylester 4-kyano-4-deformylsordaricínu (1,0 mg) sa rozpustil v 1 ml pyridínu a 1 ml anhydridu kyseliny octovej. Pridalo sa katalytické množstvo 4-(*N,N*)-dimetylaminopyridínu (DMAP) a zmes sa miešala približne 60 minút pri laboratórnej teplote. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester zlúčeniny uvedenej v názve príkladu.

Benzylester zlúčeniny sa rozpustil v 1 ml MeOH, do ktorého sa pridali Pearlmanov katalyzátor. Zmes sa miešala pod vodíkom (balónový tlak) 15 minút. Po filtrácii cez bavlnu a zakoncentrovaní *in vacuo* sa získala zlúčenina uvedená v názve príkladu.



### Príklad 3

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

Do roztoku tetrahydrofuránu (THF) sa pridala kyselina undekánová (30 mg), trietylamín (34  $\mu$ L) a následne 2,4,6-trichlórbenzoyl chlorid (25  $\mu$ L). Zmes sa miešala 15 minút pri laboratórnej teplote. Do tejto zmesi sa potom pridala 4-kyano-4-deformylsordaricínbenzylester (1,0 mg) v 1 ml THF a následne *N,N*-dimetylamino-pyridín (DMAP) (20 mg). Táto zmes sa miešala 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester zlúčeniny uvedenej v názve príkladu. Tento undekanoát sa rozpustil v 1 ml MeOH, do ktorého sa pridala Pearlmanov katalyzátor. Zmes sa miešala 15 minút pod vodíkom (balónový tlak). Po filtrácii cez bavlnu a zakoncentrovaní *in vacuo* sa získala zlúčenina uvedená v názve príkladu.

### Príklad 4

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

Do dichlórmetánového roztoku 4-kyano-4-deformylsordaricínbenzylesteru (0,5 mg) sa pridala trietylamín (0,2 ml) a následne propionylchlorid (0,1 ml). Pridalo sa katalytické množstvo DMAP. Zmes sa miešala približne 18 hodín pri laboratórnej teplote, alebo pokiaľ sa neukončila reakcia, čo bolo posudzované analytickou chromatografiou. Po purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester zlúčeniny uvedenej v názve príkladu. Benzylester sa rozpustil v 1 ml MeOH a pridala sa Pearlmanov katalyzátor. Zmes sa miešala 15 minút pod vodíkom (balónový tlak). Po filtrácii cez bavlnu a zakoncentrovaní *in vacuo* sa získala zlúčenina uvedená v názve príkladu.

#### Príklad 5

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

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu sa použil postup podľa príkladu 4, pričom namiesto metylchlórformátu sa použil propionylchlorid.

#### Príklad 6

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

Do roztoku 4-kyano-4-deformylsordaricínbenzylesteru (0,5 mg) v CHCl<sub>3</sub> sa pridal *n*-propylizokyanát (0,1 ml) a katalytické množstvo DMAP. Zmes sa 4 hodiny refluxovala. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester zlúčeniny uvedenej v názve príkladu. Tento derivát sa rozpustil v 1 ml metanolu a pridal sa Pearlmanov katalyzátor. Táto zmes sa miešala pod vodíkom (balónový tlak) približne 15 minút. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získala zlúčenina uvedená v názve vynálezu.

#### Príklad 7

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

Do roztoku 4-kyano-4-deformylsordaricínbenzylesteru v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,5 mg) sa pridal diizopropyletylamín (0,2 ml) a následne metoxymetylchlorid (MOMCl) (0,1 ml) pri 0 °C. Zmes sa miešala približne 18 hodín pri laboratórnej teplote. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester zlúčeniny uvedenej v názve príkladu. Benzylester sa rozpustil v MeOH a pridal sa Pearlmanov katalyzátor. Táto zmes sa miešala pod vodíkom (balónový tlak) pokiaľ

sa úplne neodstránila benzylová skupina, čo bolo stanovené prostredníctvom TLC. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získala zlúčenina uvedená v názve vynálezu.

#### Príklad 8

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-(((metoxyetoxy)metyloxy)metyl)-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyloxy)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu sa použil postup podľa príkladu 7 s výnimkou toho, že namiesto MOMCl sa použil metoxyetoxymetylchlorid.

#### Príklad 9

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[(oktyloxymetoxymetyl)-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyloxy)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu sa použil postup podľa príkladu 7 s výnimkou toho, že namiesto MOMCl sa použil chlórmetyl-oktyléter.

#### Príklad 10

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[(metoxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyloxy)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Do roztoku benzylesteru sordaricínu (30 mg) v *N,N*-dimetylformamide (3 ml) sa pridal metyljodid (0,5 ml) a následne sa pridal hydrid sodný (100 mg, 60% disperzia v minerálnom oleji). Zmes sa miešala cez noc pri laboratórnej teplote. Po vodnom spracovaní (dietyléter) a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal éterový derivát.

Do roztoku vyššie uvedeného éterového derivátu (20 mg) v etanole (3 ml) a pyridíne (1,5 ml) sa pridal hydrochlorid hydroxylamínu (100 mg). Zmes sa miešala a zahrievala na 80 °C 2 hodiny. Po zakoncentrovaní *in vacuo*, vodnom spracovaní (dichlórmetán) a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal aldoximový derivát.

Do roztoku vyššie uvedeného aldoxímu (15 mg) v toluéne (3 ml) sa pridala vnútorná soľ hydroxidu (metoxykarbonylsulfamoyl)trietylamónneho (200 mg). Zmes sa miešala 2 hodiny pri 70 °C. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester zlúčeniny uvedenej v názve príkladu.

Do roztoku vyššie uvedeného benzylesteru (12 mg) v metanole (2 ml) sa pridal Pearlmanov katalyzátor (20 mg). Zmes sa 15 minút miešala vo vodíkovej atmosfére (balónový tlak). Po prefiltrovaní cez bavlnu a zakoncentrovaní *in vacuo* sa získala zlúčenina uvedená v názve príkladu. MS (CI):  $m/z = 361 (M+NH_4)$

#### Príklad 11

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

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý etyljodid. MS (CI):  $m/z = 375 (M+NH_4)$

#### Príklad 12

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

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý alylbromid. MS (CI):  $m/z = 389 (M+NH_4)$

#### Príklad 13

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8 $\alpha$ -[(2-metylpropyloxy)metyl]-4-kyano-4,4 $\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ -oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 $\alpha$ (1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý 2-bróm-metyl-1-propén. MS (CI):  $m/z = 403$  (M+NH<sub>4</sub>)

#### Príklad 14

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8 $\alpha$ -[(butyloxy)metyl]-4-kyano-4,4 $\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ -oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 $\alpha$ (1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý 1-jódbután. MS (CI):  $m/z = 403$  (M+NH<sub>4</sub>)

#### Príklad 15

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8 $\alpha$ -[(pentyloxy)metyl]-4-kyano-4,4 $\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ -oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 $\alpha$ (1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý 1-jódpentán.

MS (CI):  $m/z = 417$  (M+NH<sub>4</sub>)

#### Príklad 16

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8 $\alpha$ -[(hexyloxy)metyl]-4-kyano-4,4 $\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ -octahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 $\alpha$ (1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý 1-hexán.

MS (CI):  $m/z = 431$  ( $M+NH_4$ )

#### Príklad 17

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8 $\alpha$ -[(*S*-2-hydroxypropyloxy)metyl]-4-kyano-4,4 $\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ -oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 $\alpha$ (1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý benzén-sulfonát (*R*)-glycidolu.

#### Príklad 18

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8 $\alpha$ -[(*R*-2-hydroxypropyloxy)metyl]-4-kyano-4, 4 $\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ -oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 $\alpha$ (1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý benzén-sulfonát (*S*)-glycidolu.

#### Príklad 19

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8 $\alpha$ -[*n*-heptyloxymetyl]-4-kyano-4,4 $\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha$ ,8,8 $\alpha$ -octahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3 $\alpha$ (1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý hept-2-ín-1-ol benzénesulfonát.

**Príklad 20**

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[*n*-oktyloxymetyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý okt-2-ín-1-ol-benzénsulfonát.

**Príklad 21**

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[*n*-nonyloxymetyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý non-2-ín-1-ol-benzénsulfonát.

**Príklad 22**

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[*n*-decyloxymetyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý dek-2-ín-1-ol-benzénsulfonát.

**Príklad 23**

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[3-metylbut-1-oxymetyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý 1-jód-3-metylbután. MS (CI):  $m/z = 417$  ( $M+NH_4$ )

#### Príklad 24

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[2-propoxymetyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 10, s tým rozdielom, že namiesto metyljodidu bol použitý 2-jódpropán.

#### Príklad 25

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[2-(tetrahydropyranyloxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Do roztoku 4-kyano-4-deformylsordaricínbenzylesteru (10 mg) v 3 ml dichlórmetánu sa pridal 3,4-dihydro-2*H*-pyrán (50  $\mu$ L) a katalytické množstvo PPTS. Zmes sa miešala cez noc pri laboratórnej teplote. Pridal sa trietylamín (1 ml) a zmes sa zakoncentrovala *in vacuo*. Po purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal benzylester zlúčeniny uvedenej v názve príkladu. Do metanolového roztoku tohto benzylesteru sa pridal Pearlmanov katalyzátor. Zmes sa miešala pod vodíkom (balónový tlak) približne 15 minút. Zmes sa filtrovala cez bavlnu a filtrát sa zakoncentroval *in vacuo*, čím vznikla zlúčenina uvedená v názve príkladu.

#### Príklad 26

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



Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 25, s tým rozdielom, že namiesto 3,4-dihydro-2*H*-pyránu bol použitý vinyléter.

#### Príklad 27

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

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 1, s tým rozdielom, že namiesto benzylbromidu bol použitý *p*-metoxybenzylchlorid.

#### Príklad 28

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

Do *N,N*-dimetylformamidového roztoku *p*-metoxy-benzylesteru 4-kyano-4-deformylsordaricínu sa pridal nadbytok benzylbromidu a hydrid sodný. Zmes sa miešala cez noc pri laboratórnej teplote. Po vodnom spracovaní (éter) a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal 4-metoxybenzylester zlúčeniny uvedenej v názve príkladu. Ester sa potom rozpustil v nadbytku kyseliny mravčej. Zmes sa približne 3 hodiny miešala pri laboratórnej teplote. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získala zlúčenina uvedená v názve príkladu.

#### Príklad 29

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

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 28, s tým rozdielom, že namiesto benzylbromidu bol použitý 4-bróm-benzylbromid.

#### Príklad 30

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[(1-but-2-enyloxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 28, s tým rozdielom, že namiesto benzylbromidu bol použitý krotylchlorid.

#### Príklad 31

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[(1-pent-2-enyloxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 28, s tým rozdielom, že namiesto benzylbromidu bol použitý *trans*-1-bróm-2-pentén.

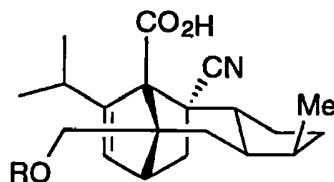
#### Príklad 32

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

Na získanie zlúčeniny uvedenej v názve príkladu bol použitý ten istý postup ako v príklade 28, s tým rozdielom, že namiesto benzylbromidu bol použitý 2-brómmetylpropén.

Príklady 33 až 51

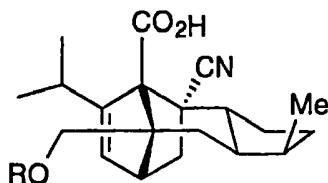
Nasledujúce estery je možné pripraviť postupom podľa príkladu 4



Acylačné činidlo	Produkt (R)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO-
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COCl	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO-
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COCl	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO-
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> COCl	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COCl	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CO-
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COCl	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COCl	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CO-
(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COCl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CCO-
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCOCl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCO-
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COCl	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO-
<i>m</i> -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COCl	<i>m</i> -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO-
<i>o</i> -FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COCl	<i>o</i> -FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO-
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> COCl	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> CO-
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COCl	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO-
1-Naftoylchlorid	1-Naftoyl
2-Naftoylchlorid	2-Naftoyl
Nikotinoylchlorid	Nikotinoyl
2-Pyrazínkarbonylchloride	2-Pyrazínkarbonyl
2-Furoylchlorid	2-Furoyl

### Príklady 52 až 55

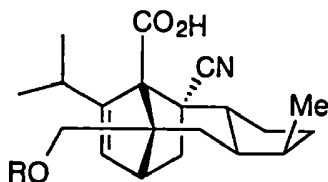
Do dichlórmetánového roztoku *p*-metoxybenzylesteru 4-kyano-4-deformylsordarinu (0,5 mg) sa pridal  $\text{NEt}_3$  (0,2 ml) a následne príslušný chlorid kyseliny (10 až 100 mg). Pridalo sa katalytické množstvo DMAP. Zmes sa cez noc miešala pri laboratórnej teplote. Po purifikácii prostredníctvom PTLC sa získali *p*-metoxybenzylestery nasledujúcich produktov. Ester sa potom rozpustil v nadbytku kyseliny mravčej. Zmes sa miešala pri laboratórnej teplote 3 hodiny alebo počas doby dostatočnej na odstránenie ochrannej skupiny. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácie prostredníctvom PTLC sa získali nasledujúce produkty.



Acylačné činidlo	Produkt (R)
$\text{CH}_2=\text{CHCOCl}$	$\text{CH}_2=\text{CHCO}-$
$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COCl}$	$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCOCl}$	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCO}-$
<i>p</i> - $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{COCl}$	<i>p</i> - $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CO}-$

### Príklady 56 až 58

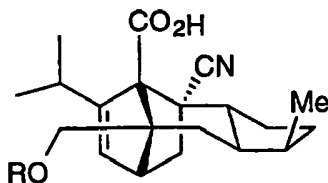
Nasledujúce estery je možné pripraviť postupom podľa príkladu 3.



Acylačné činidlo	Produkt (R)
kyselina cyklohexánkarboxylová	cyklohexánkarbonyl
kyselina cyklopentánkarboxylová	cyklopentánkarbonyl
kyselina cyclobutánkarboxylová	cyclobutánkarbonyl
$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$	$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CO-}$
$m\text{-FC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$	$m\text{-FC}_6\text{H}_4\text{CO-}$
kyselina 4-bifenyľkarboxylová	4-bifenyľkarbonyl
kyselina 3-bifenyľkarboxylová	3-bifenyľkarbonyl
kyselina 4,4'-terfenyľkarboxylová	4,4'-terfenyľkarbonyl
kyselina 9-antracénkarboxylová	9-antracénkarbonyl
kyselina 2-pyrolkarboxylová	2-pyrolkarbonyl
$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CO-}$
$\text{HCO}_2\text{H}$	HCO
kyselina 2-tiofénkarboxylová	2-tiofénkarbonyl

#### Príklady 69 až 71

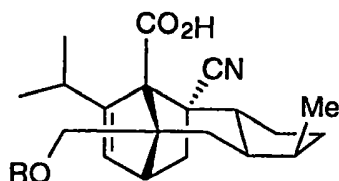
Do roztoku kyselín uvedených nižšie (0,16 mmol) sa pridal trietylamín (34  $\mu\text{L}$ ) a následne 2,4,6-trichlórbenzoylchlorid (25  $\mu\text{l}$ ). Zmes sa miešala pri laboratórnej teplote 15 minút. Do tejto zmesi sa potom pridal 4-kyano-4-deformylsordarin- $p$ -metoxybenzylester (1,0 mg) v 1 ml THF a následne DMAP (20 mg). Táto zmes sa miešala pri laboratórnej teplote približne 1 hodinu. Po purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal  $p$ -metoxybenzylester nasledujúcich produktov. Ester sa potom rozpustil v nadbytku kyseliny mravčej. Zmes sa miešala pri laboratórnej teplote 3 hodiny alebo počas doby, ktorá bola dostatočná na odstránenie ochrannej skupiny. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získali nasledujúce produkty.



Acylačné činidlo	Produkt (R)
$o\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$	$o\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{CO-}$
kyselina 3,5-dibrómbenzoová	3,5-dibrómbenzoyl
kyselina cyklopropánkarboxylová	cyklopropylkarbonyl

#### Príklady 72 až 82

Nasledujúce karbonáty je možné pripraviť spôsobom analogickým s postupom podľa príkladu 5.

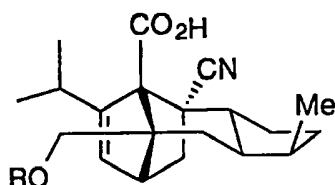


Acylačné činidlo	Produkt (R)
etylchloroformát	etoxykarbonyl
fenylchloroformát	fenoxykarbonyl
<i>tert</i> -butylchlórformát	<i>tert</i> -butoxykarbonyl
cyklopropylchlórformát	cyklopropoxykarbonyl
<i>n</i> -butylchlórformát	<i>n</i> -butoxykarbonyl
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{OCOCI}$	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{OCO-}$
<i>sek</i> -butylchlórformát	<i>sek</i> -butoxykarbonyl
izopropylchlórformát	izopropoxykarbonyl
$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{OCOCI}$	$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{OCO-}$
<i>n</i> -propylchlórformát	<i>n</i> -propoxykarbonyl
cyklohexylchlórformát	cyklohexoxykarbonyl

#### Príklady 83 až 89

Do dichlórmetánového roztoku 4-kyano-4-deformylsordarín-*p*-metoxybenzyl-esteru (0,5 mg) sa pridal  $\text{NEt}_3$  (0,2 ml) a následne príslušný chlorid kyseliny (10-100 mg). Pridalo sa katalytické množstvo *N,N*-dimetylaminopyridínu. Zmes sa miešala pri teplote okolia približne 18 hodín. Po purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal *p*-

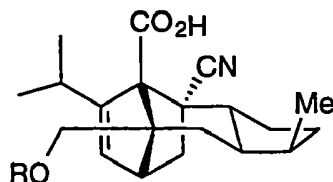
metoxybenzylester nasledujúcich produktov. Ester sa potom rozpustil v nadbytku kyseliny mravčej. Zmes sa miešala pri laboratórnej teplote 3 hodiny, alebo počas doby dostatočnej na odstránenie ochrannej skupiny. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získali nasledujúce produkty.



Acylačné činidlo	Produkt (R)
benzylchlórformát	benzyloxykarbonyl
<i>p</i> -metylbenzylchlórformát	<i>p</i> -metylbenzyloxykarbonyl
1-naftylchlórformát	1-naftyloxykarbonyl
2-naftalénchlórformát	2-naftoxykarbonyl
alychlórformát	alyloxykarbonyl
krotylchlórformát	krotyloxykarbonyl
CH <sub>2</sub> =CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCOCl	CH <sub>2</sub> =CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCO-

#### Príklady 90 až 104

Nasledujúce karbamáty je možné pripraviť analogickým spôsobom ako v príklade 6.

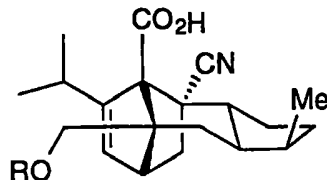


Acylačné činidlo	Produkt (R)
metylizokyanát	metylaminokarbonyl
fenyilizokyanát	anilinokarbonyl
<i>terc</i> -butylizokyanát	<i>terc</i> -butylaminokarbonyl

cyklobutylizokyanát	cyklobutylaminokarbonyl
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{NCO}$	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{NHCO-}$
<i>p</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NCO}$	<i>p</i> - $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NHCO}$
izopropylizokyanát	izopropylaminokarbonyl
cyklopentylizokyanát	cyklopentylaminokarbonyl
naftalén-1-izokyanát	1-naftylaminokarbonyl
dimethylaminokarbonylchlorid	dimethylaminokarbonyl
<i>N</i> -metyl- <i>N</i> -butylaminokarbonylchlorid	<i>N</i> -metyl- <i>N</i> -butylaminokarbonyl
<i>N</i> -etyl- <i>N</i> -benzylaminokarbonylchlorid	etylaminokarbonyl
<i>N</i> -fenyl- <i>N</i> -2-naftylaminokarbonylchlorid	<i>N</i> -fenyl- <i>N</i> -2-naftylaminokarbonyl
<i>N</i> -metyl- <i>N</i> -fenylaminokarbonylchlorid	<i>N</i> -metyl- <i>N</i> -fenylaminokarbonyl
<i>N</i> -metyl- <i>N</i> -cyklopropylkarbonylchlorid	<i>N</i> -metyl- <i>N</i> -cyklopropylkarbonyl

#### Príklady 105 až 108

Do  $\text{CHCl}_3$  roztoku *p*-metoxybenzylesteru 4-kyano-4-deformylsordarínu (0,5 mg) sa pridal príslušný izokyanát (10-100 mg) a katalytické množstvo DMAP. Zmes sa refluxovala 4 hodín alebo až dotedy, kým už neprebíhala reakcia. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získal *p*-metoxybenzylester zlúčenín. Ester sa potom rozpustil v nadbytku kyseliny mravčej. Zmes sa miešala pri laboratórnej teplote 3 hodiny alebo počas doby, ktorá je dostatočná na odstránenie ochrannej skupiny. Po zakoncentrovaní *in vacuo* a purifikácii prostredníctvom PTLC sa získali nižšie uvedené zlúčeniny.

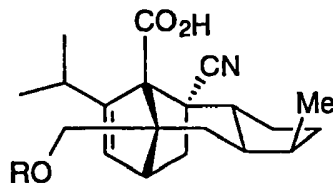


Acylačné činidlo	Produkt (R)
benzylizokyanát	benzylaminokarbonyl
allylizokyanát	allylaminokarbonyl
<i>o</i> -jódfenylizokyanát	<i>o</i> -jódanalinokarbonyl
dibenzylaminokarbonylchlorid	dibenzylaminokarbonyl



Príklady 109 až 114

Nasledujúce zlúčeniny môžu byť pripravené postupom podľa príkladu 28.



Acylačné činidlo	Produkt (R-)
1-bróm-2-propín	$\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{-}$
1-jód-5-hexín	$\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
allylbromid	$\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{-}$
<i>cis</i> -1-bróm-2-butén	<i>cis</i> - $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{-}$
<i>cis</i> -1-bróm-2-pentén	<i>cis</i> - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{-}$
<i>cis</i> -1-trimetylsilyloxy-4-bróm-2-butén	<i>cis</i> -4-hydroxy-2-butenyl

Príklad 115

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[(*n*-heptyloxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Postupom podľa príkladu 10 použitím 1-benzénsulfonyloxy-2-heptínu namiesto metyljodidu je možné získať zlúčeninu uvedenú v názve príkladu.

MS (CI):  $m/z$  445 ( $M+\text{NH}_4$ )

Príklad 116

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[(*n*-oktyloxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Postupom podľa príkladu 10 použitím 1-benzénsulfonyloxy-2-oktínu namiesto metyljodidu je možné získať zlúčeninu uvedenú v názve príkladu.

MS (CI):  $m/z$  459 ( $M+\text{NH}_4$ )

Príklad 117

Kyselina [1*R*-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\beta$ ,4 $\beta$ ,4 $\alpha\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]-8a-[(*n*-nonyloxy)metyl]-4-kyano-4,4a,5,6,7,7a,8,8a-oktahydro-7-metyl-3-(1-metyletyl)-1,4-metano-*s*-indacén-3a(1*H*)-karboxylová

Postupom podľa príkladu 10 použitím 1-benzénsulfonyloxy-2-nonínu namiesto metyljodidu je možné získať zlúčeninu uvedenú v názve príkladu.

MS (CI):  $m/z$  473 (M+NH<sub>4</sub>)

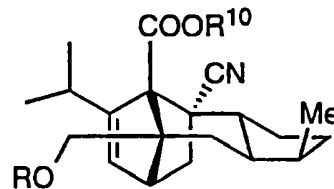
Príklad 118

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

Benzylester 4-kyano-4-deformylsordaricínu z príkladu 1 (spôsob B) sa rozpustil v 2 ml metanolu a pridalo sa približne 20 mg hydroxidu paládnateho na uhlíku (Pearlamov katalyzátor). Zmes sa silno premiešavala vo vodíkovej atmosfére 15 minút. Reakčná zmes sa prefiltravala cez bavlnu a filtrát sa zakoncentroval *in vacuo*, čím vzniklo 5,0 mg (94%) zlúčeniny uvedenej v názve príkladu. MS (ESI):  $m/z$  = 347 (M+NH<sub>4</sub>)

PATENTOVÉ NÁROKY

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

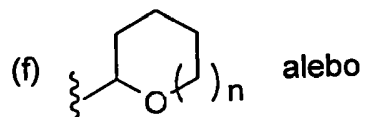


(I)

kde

R je

- (a) C(=O)OR<sup>1</sup>,
- (b) C(=O)NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>,
- (c) C(=O)R<sup>4</sup>,
- (d) CH(R<sup>2</sup>)OR<sup>5</sup>,
- (e) C(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>)(R<sup>8</sup>),



(g) H;

R<sup>1</sup> je

- (a) C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub>alkyl,
- (b) C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>alkenyl,
- (c) C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>alkinyl,
- (d) C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>cykloalkyl,
- (e) aryl alebo

(f) aryl C<sub>1-6</sub>alkyl;

R<sup>2</sup> a R<sup>3</sup> sú nezávisle

(a) H alebo

(b) R<sup>1</sup>;

R<sup>4</sup> je

(a) H,

(b) R<sup>1</sup> alebo

(c)  $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2\text{R}^3$ ;

R<sup>5</sup> je

(a) R<sup>1</sup> alebo

(b)  $-(\text{CH}_2)_x\text{O}(\text{CH}_2)_y\text{H}$ ;

R<sup>6</sup> je

(a) H,

(b) C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub>alkyl,

(c) aryl,

(d) arylC<sub>1-6</sub>alkyl,

(e)  $-(\text{CH}_2)_y\text{CHR}^9(\text{CH}_2)_z\text{H}$ ,

(f)  $-(\text{CH}_2)_y\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_z\text{H}$ ,

(g)  $-(\text{CH}_2)_y\text{C}(\text{R}^7)=\text{CH}(\text{CH}_2)_z\text{H}$ ,

(h)  $-(\text{CH}_2)_y\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_m\text{R}^9$ ,

(i)  $-(\text{CH}_2)_y\text{C}(\text{R}^7)=\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{R}^9$ ,

R<sup>7</sup> a R<sup>8</sup> sú nezávisle

(a) H alebo

(b) C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub>alkyl;

R<sup>9</sup> je

(a) OH alebo

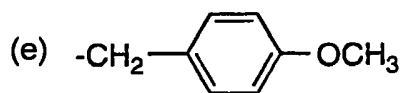
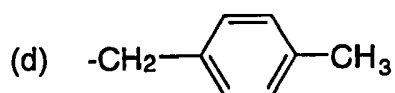
(b)  $\text{NR}^2\text{R}^3$ ;

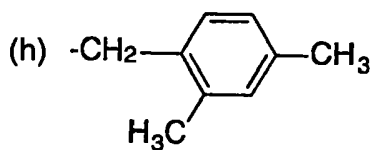
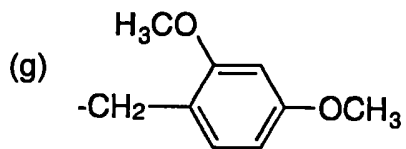
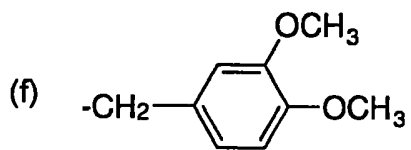
R<sup>10</sup> je

(a) H,

(b)  $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,

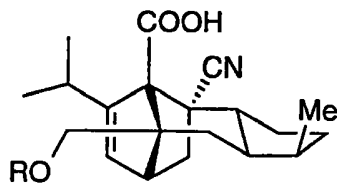
(c)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ,





n je 0 alebo 1; m je 1 až 6; x je 2 až 6; y je 0 až 6; z je 0 až 6;  
alebo ich farmaceuticky alebo poľnohospodársky prijateľné soli.

2. 4-Kyano-4-deformylsordaricínové deriváty podľa nároku 1 všeobecného vzorca Ia



(Ia)

kde

R je

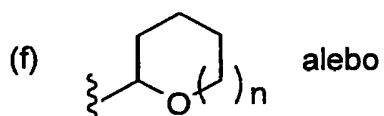
(a) C(=O)OR<sup>1</sup>,

(b) C(=O)NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>,

(c) C(=O)R<sup>4</sup>,

(d) CH<sup>2</sup>OR<sup>5</sup>,

(e) C(R<sup>6</sup>)(R<sup>7</sup>)(R<sup>8</sup>),



alebo ich farmaceuticky prijateľné soli.

3. 4-Kyano-4-deformylsordaricinový derivát podľa nároku 2, kde R je  $C(=O)OR^1$ .

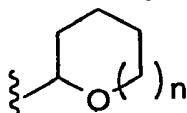
4. 4-Kyano-4-deformylsordaricinový derivát podľa nároku 2, kde R je  $C(=O)NR^2R^3$  alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

5. 4-Kyano-4-deformylsordaricinový derivát podľa nároku 2, kde R je  $C(=O)R^4$  alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

6. 4-Kyano-4-deformylsordaricinový derivát podľa nároku 2, kde R je  $CH(R^2)OR^5$  alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

7. 4-Kyano-4-deformylsordaricinový derivát podľa nároku 2, kde R je  $C(R^6)(R^7)(R^8)$  alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

8. 4-Kyano-4-deformylsordaricinový derivát podľa nároku 2, kde R je



alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

9. 4-Kyano-4-deformylsordaricinové deriváty podľa nároku 2, kde R je  $CH(R^6)(R^7)$ ,

$R^6$  je

(a) H,

(b)  $C_1$ - $C_{14}$ alkyl,

(c) aryl,

(d) aryl $C_{1-6}$ alkyl,

(e)  $-(CH_2)_yCHR^9(CH_2)_zH$ ,

(f)  $-(CH_2)_yC(R^7)=CH(CH_2)_zH$ ,

$R^7$  je H alebo  $C_1$ - $C_6$ alkyl,

$R^9$  je OH;

alebo jej farmaceuticky prijateľná soľ.

10. 4-Kyano-4-deformylsordaricinový derivát podľa nároku 2, kde

R je

- (a)  $-\text{CH}_3$ ,
- (b)  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (c)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (d)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (e)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (f)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (g)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (h)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (i)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (j)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
- (k)  $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,
- (l)  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
- (m)  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
- (n)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ,
- (o)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$ ,
- (p)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ,
- (q)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  
alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

11. 4-Kyano-4-deformylsordaricinový derivát podľa nároku 2, kde

R je

- (a)  $-\text{CH}_3$ ,
- (b)  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (c)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (d)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,
- (e)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
- (f)  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
- (g)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
- (h)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$ ,
- (i)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ,

(j)  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;

alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

12. 4-Kyano-4-deformylsordaricínový derivát podľa nároku 1, kde R je H alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

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

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

15. Použitie 4-kyano-4-deformylsordaricínového derivátu podľa nároku 1 na výrobu farmaceutického prostriedku na liečenie alebo prevenciu hubovej infekcie u živočíchov.

16. Spôsob kontroly fytopatogénnych húb, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa podanie antifungálne účinného množstva zlúčeniny vzorca 1 rastline, ktorá vyžaduje takúto kontrolu.