

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 886

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. : ⁷

C 07 H 11/04

C 07 H 3/06

C 07 H 3/04

A 61 K 31/716

A 61 P 3/10

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997-3775**
(22) Přihlášeno: **27.11.1997**
(30) Právo přednosti: **28.11.1996 DE 1996/19649350**
(40) Zveřejněno: **17.06.1998**
(Věstník č. 06/1998)
(47) Uděleno: **07.02.05**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **13.04.2005**
(Věstník č. 4/2005)

(73) Majitel patentu:

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, Frankfurt am
Main, DE

(72) Původce:

Frick Wendelin, Hünstetten-Beuerbach, DE
Müller Günter, Sulzbach, DE

(74) Zástupce:

JUDr. Miloš Všecký, Hájkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

**Inositolglykany s inzulinu podobným účinkem,
způsob jejich výroby, jejich použití a
farmaceutický prostředek tyto látky obsahující**

(57) Anotace:

Inositolglykany s inzulinu podobným účinkem obecného
vzorce A - Z - R, v němž A značí skupiny HP(O)(OH)-,
S(O)₂(OR¹)-, NH₂C(O)-, Z značí 2 až 6 cukerných zbytků a R
představuje inositol a jeho fosfáty. Tyto inositolglykany jsou
vhodné pro ošetření diabetes mellitus nebo na inzulinu
nezávislé diabetes. Je popsán způsob jejich výroby, jejich
použití a farmaceutické prostředky, tyto látky obsahující.

CZ 294886 B6

Inositolglykany s inzulinu podobným účinkem, způsob jejich výroby, jejich použití a farmaceutický prostředek tyto látky obsahující

5 Oblast techniky

Vynález se týká inositolglykanů s inzulinu podobným účinkem, které jsou vhodné pro ošetření diabetes mellitus, způsobu jejich výroby, jejich použití a farmaceutických prostředků, tyto látky obsahujících.

10

Dosavadní stav techniky

Je známo, že metabolický účinek inzulinu je způsoben také tvorbou nízkomolekulárních sloučenin, které mají také inzulinu podobný účinek (US 4 446 064). Byla již navržena řada inositolglykanových sloučenin, které vykazují inzulinu podobný účinek (WO 96/14075, JP 6/293790, JP 4/120089). Ve srovnání s JP 6/293790 bylo zjištěno, že lze bez ztráty aktivity nahradit fosfátovou skupinu H-fosfátovou skupinou, karbamátovou skupinou a sulfonátovou skupinou, přičemž dané struktury jsou synteticky jednoduše vyrobitelné.

20

Diabetes typ II, ne na inzulinu závislé diabetes, se vyskytuje s inzulinovou rezistencí periferních tkání, jako je svalová tkáň nebo tuková tkáň. Tím redukované zhodnocení glukózy je způsobeno chybějící inzulinou stimulací transportu glukózy a následujících metabolických procesů.

25

Podstata vynálezu

Při snaze nalézt další účinné sloučeniny s inzulinu podobným účinkem bylo nyní zjištěno, že sloučeniny s inzulinu podobným účinkem bylo nyní zjištěno, že sloučeniny podle předloženého vynálezu vykazují in vitro inzulinu podobný účinek, mají dobrou sérovou stabilitu a vykazují také na inzulinu rezistentní tkáň inzulinu podobný účinek a jsou tedy vhodné pro ošetření diabetes mellitus.

35

Předmětem předloženého vynálezu tedy jsou inositolglykany s inzulinu podobným účinkem obecného vzorce I



40

a/nebo fyziologicky přijatelné soli sloučeniny obecného vzorce I a/nebo stereoizomerní formy sloučeniny obecného vzorce I, přičemž

A značí

- 1) $H-P(O)(OH)-$,
- 2) $S(O)_2(OR^1)-$, nebo kde R^1 značí vodíkový atom nebo alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy
- 3) $NH_2-C(O)-$,

50

Z značí

- 1) 2 až 6 zbytků cukrů ze skupiny zahrnující
 - 1.1 manózu,
 - 1.2 glukózu,
 - 1.3 kyselinu glukonovou,
 - 1.4 kyselinu galaktonovou,

55

- 1.5 kyselinu mannonovou,
- 1.6 cukry původu z glukózáminu,
- 1.7 fruktózu nebo
- 1.8 galaktózu, nebo

5

- 2) 2 až 6 zbytků cukrů ze skupiny definované pod
Z 1.1 až 1.8, jednou až šestkrát nezávisle na sobě substituovaných
- 2.1 methylovou skupinou,
- 2.2 manózou,
- 2.3 cukry původu z glukózáminu,
- 2.4 dimanózou nebo
- 2.5 manózo-glukózáminem a glukózidická vazba obou cukrů manózy a glukózáminu
leží mezi C-atomy 1–3, 1–2 nebo 1–6 obou cukrů a

10

15 R značí

- 1) inositol,
- 2) inositolfosfát,
- 3) inositolthiofosfát,
- 4) inositolcyklothiofosfát nebo
- 5) inositolcyklofosfát,

20

Výhodné jsou sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém

A značí H-P(O)(OH)- ,

25

Z značí

- 1) 2 až 4 zbytky cukrů ze skupiny zahrnující manózu nebo cukry původem z glukózáminu,
nebo
- 2) 2 až 4 zbytky cukrů ze skupiny zahrnující manózu nebo cukry původem z glukózáminu
jednou substituované manózou a

30

R značí

- 1) inositol,
- 2) inositolfosfát nebo
- 3) inositolcyklofosfát.

35

Pod pojmem zbytky cukrů se rozumí sloučeniny, které jsou odvozené od aldóz a ketóz se 3 až 7 uhlíkovými atomy, které mohou patřit k D- nebo L-řadě. K tomu patří také aminocukry nebo uronové kyseliny.

40

Pod pojmem dicukry se rozumí sacharidy, které sestávají ze dvou cukerných jednotek. Tri-sacharidy, tetrasacharidy, pentasacharidy nebo hexasacharidy vznikají acetalovou vazbou 3 až 6 cukrů. Vazby s mohou při tom vyskytovat v α - nebo β -formě. Vazby mezi cukry jsou výhodně přes uhlíkový atom 1 a uhlíkový atom 6, uhlíkový atom 1 a uhlíkový atom 2 a uhlíkový atom 1 a uhlíkový atom 4 odpovídajícího cukru. Výhodná je α -forma vazby mezi cukry.

45

Vazba A a Z je provedena například přes některý z kyslíkových atomů Z nebo přes některý z uhlíkových atomů Z, výhodně přes uhlíkový atom CH_2 -skupiny Z.

50

Vazba R na Z se provádí analogicky jako u vazeb di-, tri-, tetra-, penta- a hexasacharidů. Dále může být vazba R na Z nahrazena jednou nebo několikrát $-\text{CH}_2-$ nebo $-\text{S}-$.

Když je cukr substituovaný, potom se provádí substituce výhodně na vodíkovém atomu hydroxylové skupiny cukru.

5 Pod pojmem inzulinrezistentní tkáň se rozumí například tukové buňky krys, které již nemají žádný inzulinový receptor.

10 Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou obsahovat jednu nebo několik fosfátových skupin, které také ještě mohou být derivatizovány fosfátovými ochrannými skupinami. Fosfátové ochranné skupiny jsou například fenylová skupina, benzylová skupina nebo hydroxypropyl-nitřilová skupina (Houben Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band 12/1 nebo Band 12/2; teilheimer, Synthetic Methods of Organic Chemistry, Vol 45).

15 Pod pojmem fyziologicky přijatelné soli sloučenin obecného vzorce I se rozumí obzvláště farmaceuticky použitelné nebo netoxické soli. Takovéto soli se například u sloučenin obecného vzorce I, také obsahují kyselé skupiny, například fosfáty nebo sírany, tvoří s alkalickými kovy nebo kovy alkalických zemin, jako je například sodík, draslík, hořčík a vápník, jakož i s fyziologicky přijatelnými organickými aminy, jako je například triethylamin a tris-(2-hydroxy-ethyl)-amin. Sloučeniny obecného vzorce I, které obsahují bazické skupiny, například aminoskupiny, tvoří soli s anorganickými kyselinami, jako je například kyselina chlorovodíková, kyselina sírová nebo 20 kyselina fosforečná, nebo s organickými karboxylovými nebo sulfonovými kyselinami, jako je například kyselina octová, kyselina citronová, kyselina benzoová, kyselina maleinová, kyselina fumarová, kyselina vinná a kyselina p-toluensulfonová. Sloučeniny, ve kterých se ve stejném počtu vyskytují bazické a kyselé skupiny, tvoří vnitřní soli a nejsou odkázány na třetí komponentě soli.

25 Předmětem předloženého vynálezu je dále způsob výroby sloučenin obecného vzorce I, jehož podstata spočívá v tom, že se inositolglykan postupně vystaví z chráněných předstupňů cukru a inositolu, potom se připojí zbytek A a ze získané sloučeniny se odštěpí jedna nebo více temporárních ochranných skupin, zavedených pro ochranu jiných funkcí a takto získaná sloučenina obecného vzorce I se popřípadě převede na svojí fyziologicky přijatelnou sůl.

30 Syntéza disacharidů a vícenásobných sacharidů se provádí pomocí o sobě známých způsobů (H. Paulsen, Angew. Chem. Int. Ed. 21 (1962), str. 155). Výhodně se použije trichloracetamidátová metoda pro syntézu oligosacharidů (R.R. Schmidt, Angew. Chem. Int. Ed. 25 (1986), 212-235; T. Ogawa, Tetrahedron Lett. 31 (1990) 2439-2442).

Syntéza fosfátů se provádí za pomoci H-fosfátu a fosforamiditové metody (W. Bannwath a kol., Helvetica Chemica Acta, 70 (1987), str. 175-186; L. A. Slotin, Synthesis (1977), str. 737-752).

40 Pro hydroxylové skupiny cukrů přicházejí v úvahu v podstatě následující ochranné skupiny: benzylová skupina, acetylová skupina, benzoylelová skupina, pivaloylová skupina, tritylová skupina, *tert*-butyldimethylsilylová skupina, benzylidenová skupina, cyklohexylidenová skupina nebo izopropylidenová skupina.

45 Sloučeniny obecného vzorce I a jejich fyziologicky přijatelné soli slouží v první řadě jako účinné látky pro farmaceutické přípravky pro ošetření diabetes mellitus nebo diabetes, nezávislém na inzulinu.

50 Předmětem předloženého vynálezu jsou tedy také farmaceutické přípravky, které se vyznačují obsahem alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I a/nebo alespoň některé z jejich fyziologicky přijatelných solí v rozpuštěné, amorfní a/nebo krystalické formě, výhodně v amorfní a/nebo krystalické formě.

55 Farmaceutické přípravky jsou výhodně roztoky nebo suspence pro injekční účely s hodnotou pH asi 3,0 až 9,0, výhodně asi 5,0 až 8,5, které obsahují vhodné izotonické činidlo, vhodné

5 konzervační činidlo a popřípadě vhodný pufr, jakož i popřípadě také depotprincip, vše ve sterilním vodném roztoku nebo suspenzi. Doplněk obsahu součástí přípravku tvoří kromě účinné látky ještě nosič. Vhodná izotonická činidla jsou například glycerol, glukóza, manitol, chlorid sodný, sloučeniny vápníku nebo hořčíku, jakož i například chlorid vápenatý nebo chlorid hořečnatý. Vhodná konzervační činidla jsou například fenol, m-kresol, benzylalkohol a/nebo estery kyseliny p-hydroxybenzoové.

10 Jako pufrovací látky, obzvláště pro nastavení hodnoty pH na asi 5,0 až 8,5, je možno použít například octan sodný, citrát sodný nebo fosforečnan sodný. Kromě toho jsou pro nastavení hodnoty pH vhodné také fyziologicky přijatelné zředěné kyseliny (typicky kyselina chlorovodíková), popřípadě louhy (typicky hydroxid sodný).

15 Za účelem variace profilu účinku přípravků podle předloženého vynálezu je možno také přidat modifikované (viz EP-B 132 769 a EP-B 132 770) a/nebo nemodifikované inzulinu, výhodně hovězí, vepřový nebo lidský inzulin, obzvláště lidský inzulin.

20 Farmaceutické přípravky se vyrobí tak, že se alespoň jedna sloučenina obecného vzorce I a/nebo její fyziologicky přijatelná sůl, popřípadě společně s modifikovaným a/nebo nemodifikovaným inzulinem nebo jeho derivátem, s fyziologicky neškodným nosičem a popřípadě s vhodnými přídatnými a pomocnými látkami, převede na vhodnou aplikační formu.

Příklady provedení vynálezu

25 Vynález je blíže objasněn pomocí následujících příkladů provedení.

Příklad 1

30 Výroba sloučeniny B

Průběh syntézy je znázorněn pomocí schéma na konci příkladu 1

Syntéza sloučeniny 3

35 60 g (94 mmol) sloučeniny 1 (T. G. Mayer, B. Kratzer, R. R. Schmidt, Angew. Chem. 106 (1994), 2289–2283) a 21,2 g (42,4 mmol) sloučeniny 2 (A. Termin, R. R. Schmidt, Liebigs Ann. Chem. (1989), 789–795) se rozpustí ve 200 ml vysušeného methylechloridu a 400 ml vysušeného n-heptanu. Po přidavku 70 g vysušeného molekulárního síta (0,4 nm) se reakční směs míchá po 40 dobu 15 minut při teplotě místnosti. Potom se přidá 5 ml 0,05 M kyseliny trimethylsilyl-trifluormethansulfonové v methylenchloridu (v následujících předpisech označováno jako roztok katalyzátoru). Po 15 minutách se přidá 300 ml směsi n-heptan/ethylester kyseliny octové (1 : 1) a přefiltruje se přes silikagel. Zbytek na filtru se promyje směsí n-heptan/ethylester kyseliny octové (1 : 1) a potom se zahustí. Po čištění pomocí mžikové chromatografie se získá 41,0 g 45 (99 %) sloučeniny 3 ve formě bezbarvé olejovité kapaliny [DC: n-heptan/ethylester kyseliny octové (1 : 1), $R_f = 0,6$, MS: $(M + Li)^+ = 981,1$, vypočteno $C_{55}H_{57}N_3O_{11}Si$, $M = 974,21$].

Syntéza imidátu 4

50 41 g (42,0 mmol) sloučeniny 3 se rozpustí ve 400 ml tetrahydrofuranu a 9 ml kyseliny octové. Po přidavku 70 ml 1 M roztoku TBAF/THF se nechá reakční směs stát po dobu 8 hodin při teplotě místnosti. Kyselina octová se potom vymražením (16 hodin při teplotě $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) odstraní a získaný filtrát se potom po zahuštění čistí pomocí mžikové chromatografie. Výtěžek činí 34,1 g (94 %) chráněné sloučeniny. Tato se rozpustí ve 300 ml vysušeného methylenchloridu a po přidavku 50 l 55 trichloracetonnitrilu a 20 g uhličitane draselného se nechá reakční směs míchat po dobu 4 hodin

při teplotě místnosti. Potom se filtruje přes silikagel, promyje se směsí n-heptan/ethylester kyseliny octové (1 : 1) a zahustí se. Surový výtěžek činí 42,1 g [DC: n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1), $R_f = 0,5$, $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): charakteristické signály pro imidát; $\sigma = 8,78$, pro NH a 5,653 pro anomery (β -imidát)].

5

Syntéza trisacharidu 6

33,2 g (33,0 mmol) sloučeniny 4 a 13,3 g (25,0 mmol) sloučeniny 5 (R. Aneja, S.G. Aneja, A. Parra, Tetrahedron, Asymetry 6 (1995), 17–18; C. J. J. Elie, R. Verduyn, C. E. Dreef, D. M. Braunts, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, Tetrahedron, 46 (1990) 8243–8254) se rozpustí ve 120 ml vysušeného methylenchloridu a 360 ml vysušeného n-heptanu a po přidavku 100 g molekulárního síta se reakční směs míchá po dobu 15 minut při teplotě místnosti. Potom se pod argonovou atmosférou ochladí na teplotu -20°C a smísí se se 20 ml roztoku katalyzátoru. Po 30 minutách se nechá přejít na teplotu místnosti. Pro zpracování se reakční směs přefiltruje, zbytek na filtru se promyje směsí n-heptanu a ethylesteru kyseliny octové (1 : 1), filtrát se zahustí a surový produkt (46,2 g) se rozpustí ve 150 ml methylechloridu. Po přidavku 400 ml methylalkoholu a 15 ml 1 M roztoku methylátu sodného v methylalkoholu se reakční směs nechá stát po dobu 16 hodin při teplotě místnosti. Roztok se potom smísí s 1 ml vody a rozpustí se. Získaná olejovitá kapalina se rozpustí v 50 ml ethylesteru kyseliny octové, zředí se 200 ml směsí n-heptan/ethylester kyseliny octové (1 : 1) a přefiltruje se přes silikagel. Po zahuštění se získaný zbytek čistí pomocí mžikové chromatografie. Výtěžek činí 32,5 g (97 %) bílé pěnovité látky jako směs anomerů [DC: n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1), $R_f = 0,5$, MS: $(\text{M} + \text{Li})^+ = 1336,7$, vypočteno $\text{C}_{80}\text{H}_{87}\text{N}_3\text{O}_{15}$, $\text{M} = 1330,59$].

25 Syntéza trisacharidu 7

Ze směso anomerů 6 se může lehce chromatograficky oddělit pouze derivát vzorce 7. 32,4 g (24,4 mmol) sloučeniny 6 se rozpustí ve 200 ml methylenchloridu a po přidavku 500 ml 0,5 M HCl/MeOH (ze 17,5 ml AcCL v 500 ml MeOH) a 20 ml ethylenglykolu se reakční směs nechá stát po dobu 17 hodin při teplotě místnosti, načež se po zahuštění získaný zbytek čistí pomocí mžikové chromatografie. Získaný produkt (26,9 g, 88 %) se rozpustí ve 300 ml methylenchloridu, přidá se 3,0 g imidazolu a 4,6 g TBDMSCI a po 16 hodinách při teplotě místnosti se reakční směs zředí 500 ml směsí n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1) a přefiltruje se přes silikagel. Zbytek na filtru se promyje směsí n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1) a filtrát se zahustí. Získaný surový produkt se čistí pomocí mžikové chromatografie. Výtěžek činí 21,1 g (72 %) sloučeniny 7 a 6,3 g (22 %) α -produktu [DC: n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1), $R_f = 0,5$ pro sloučeninu 7 a $R_f = 0,3$ pro α -produkt, MS: $(\text{M} + \text{Li})^+ = 1370,6$, vypočteno $\text{C}_{80}\text{H}_{93}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{Si}$, $\text{M} = 1364,71$].

40 Syntéza trisacharidu 8

21,2 g (15,5 mmol) sloučeniny 7 se rozpustí v 60 ml methylenchloridu a 180 ml dimethoxypropanu, načež se přidá 250 mg TsOH a reakční směs se nechá stát po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Po přidavku 2 ml triethylaminu se zahustí a získá se 23,1 g surového produktu. Tento se rozpustí ve 150 ml tetrahydrofuranu a smísí se se 30 ml 1 M roztoku TABF/THF. Po 16 hodinách se směs zahustí a čistí se pomocí mžikové chromatografie, přičemž se získá produkt ve výtěžku 20,0 g (99 %) ve formě bílé pěnovité látky [DC: n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1), $R_f = 0,4$, MS: $(\text{M} + \text{Li})^+ = 1296,7$, vypočteno $\text{C}_{77}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{15}$, $\text{M} = 1290,51$].

50 Syntéza tetrasacharidu 10

20,0 g (15,4 mmol) sloučeniny 8 a 15,0 g (23,5 mmol) sloučeniny 9 (T.G. Mayer, B. Kratzer, R. R. Schmidt, Angew. Chem. 106 (1994) 2289–2293) se nechá reagovat analogicky, jako je uvedeno v předpisu pro přípravu sloučeniny 6, přičemž se získá 20,3 g (76 %) tetrasacharidu

10 ve formě bílé pěnovité látky [DC: n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1), $R_f = 0,6$, MS: $(M : Li)^+ = 1770$, vypočteno $C_{107}H_{115}N_3O_{20}$, $M = 1763,09$].

Syntéza pentasacharidu 12

5

20,3 g (11,8 mol) sloučeniny 10 a 12,0 g (20,3 mmol) sloučeniny 11 (T. G. Mayer, B. Kratzer, R. R. Schmidt, Angew. Chem. 106 (1994) 2289–2293) se nechá reagovat analogicky, jako je uvedeno v předpisu pro přípravu sloučeniny 6, přičemž se získá 19,4 g (80 %) deacelovaného produktu. Tento produkt se rozpustí ve 200 ml methylenchloridu a smísí se se 3,4 g (50,0 mmol) imidazolu, načež se přidá 6,0g (40,0 mmol) TBMSMCL a reakční směs se míchá po dobu 15 hodin při teplotě místnosti. Po přidavku 5 ml methylalkoholu se směs nechá stát po dobu 10 minut, potom se zředí 200 ml směsí n-heptan/ethylester kyseliny octové (1 : 1) a přefiltruje se před silikagel. Zbytek na filtru se promyje 200 ml směsí n-heptan/ethylester kyseliny octové (1 : 1), filtrát se zahustí a čistí se pomocí mžikové chromatografie. Výtěžek činí 11,4 g (95 %) sloučeniny 12 ve formě bílé pěnovité látky [DC: n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1), $R_f = 0,7$, MS: $(M + Li)^+ = 2226$, vypočteno $C_{133}H_{151}N_3O_{25}Si$, $M = 2219,75$].

15

Syntéza hexasacharidu 14

20

19,4 g (8,9 mmol) sloučeniny 12 a 14,0g (20,0 mmol) sloučeniny 13 (T.G. Mayer, B. Kratzer, R.R. Schmidt, Angew. Chem. 106 (1994), 2289–2293) se rozpustí ve 100 ml vysušeného methylenchloridu a 300 ml vysušeného n-heptanu a po přidavku 40 g molekulárního síta (0,4 nm) se reakční směs míchá po dobu 15 minut při teplotě místnosti. Potom se přidá 10 ml roztoku katalyzátoru a míchá se dalších 15 minut. Pro zpracování se přefiltruje přes silikagel a zbytek na filtru se promyje směsí n-heptan/ethylester kyseliny octové (1 : 1), načež se filtrát zahustí a získá se 33 g surového produktu. Tento se rozpustí ve 200 ml methylenchloridu a smísí se s 500 ml 0,5 M kyseliny chlorovodíkové v methylalkoholu. Po dvou hodinách při teplotě místnosti se reakční směs zahustí, načež se několikrát zahustí s methylenchloridem. Získaný meziprodukt se rozpustí ve 200 ml methylenchloridu a smísí se se 3,4 g (50 mmol) imidazolu a 6,0 g (40 mmol) TBDMSCl. Po 16 hodinách se produkt zpracuje analogicky, jako je uvedeno u sloučeniny 12. Výtěžek činí 20,2g (85 %) sloučeniny 14 ve formě bílé pěnovité látky [DC: n-heptan/ethylester kyseliny octové (2 : 1), $R_f = 0,3$, MS: $(M + Li)^+ = 2669$, vypočteno $C_{161}H_{177}N_3O_{30}Si$, $M = 2662,26$].

30

Syntéza sloučeniny 15

35

30,0 g triazilu se rozpustí v 800 ml vysušeného tetrahydrofuranu a při teplotě 10 °C se přikape 13,5 ml fosforoxychloridu, načež se přikape 60 ml triethylaminu a reakční směs se míchá po dobu 15 minut při teplotě místnosti. Vytvořená sraženina se odfiltruje, promyje se malým množstvím vysušeného tetrahydrofuranu a filtrát se přidá k 19,1 g (7,2 mmol) sloučeniny 14. Tento roztok se zakoncentruje na objem 100 ml, po 15 minutách se zředí 50 ml ethylesteru kyseliny octové a dvakrát se promyje 100 ml vody. Organická fáze se vysuší pomocí bezvodého síranu hořečnatého, přefiltruje a zahustí. Po čištění pomocí mžikové chromatografie se získá 19,0 g (97 %) cyklického fosfátového derivátu ve formě bílé pěnovité látky [DC: methylenchlorid/methylalkohol/33% NH_3 (100 : 7 : 1), $R_f = 0,3$, MS: $(M + 2Li-H)^+ = 2737$, vypočteno $C_{161}H_{174}N_3O_{32}PSi$, $M = 2724,22$]. Cyklický fosfát se rozpustí ve 350 ml tetrahydrofuranu a přidá se 100 ml TBAF (1M v tetrahydrofuranu). Po 20 hodinách se reakční směs zahustí a získaný zbytek se čistí pomocí mžikové chromatografie. Výtěžek činí 18,1g (99 %) sloučeniny 15 ve formě bílé pěnovité látky [DC: methylenchlorid/methylalkohol/33% NH_3 (100 : 7 : 1), $R_f = 0,3$ (stejně jako edukt), MS: $(M + 2Li-H)^+ = 2622$, vypočteno $C_{155}H_{162}N_3O_{32}P$, $M = 2609,96$].

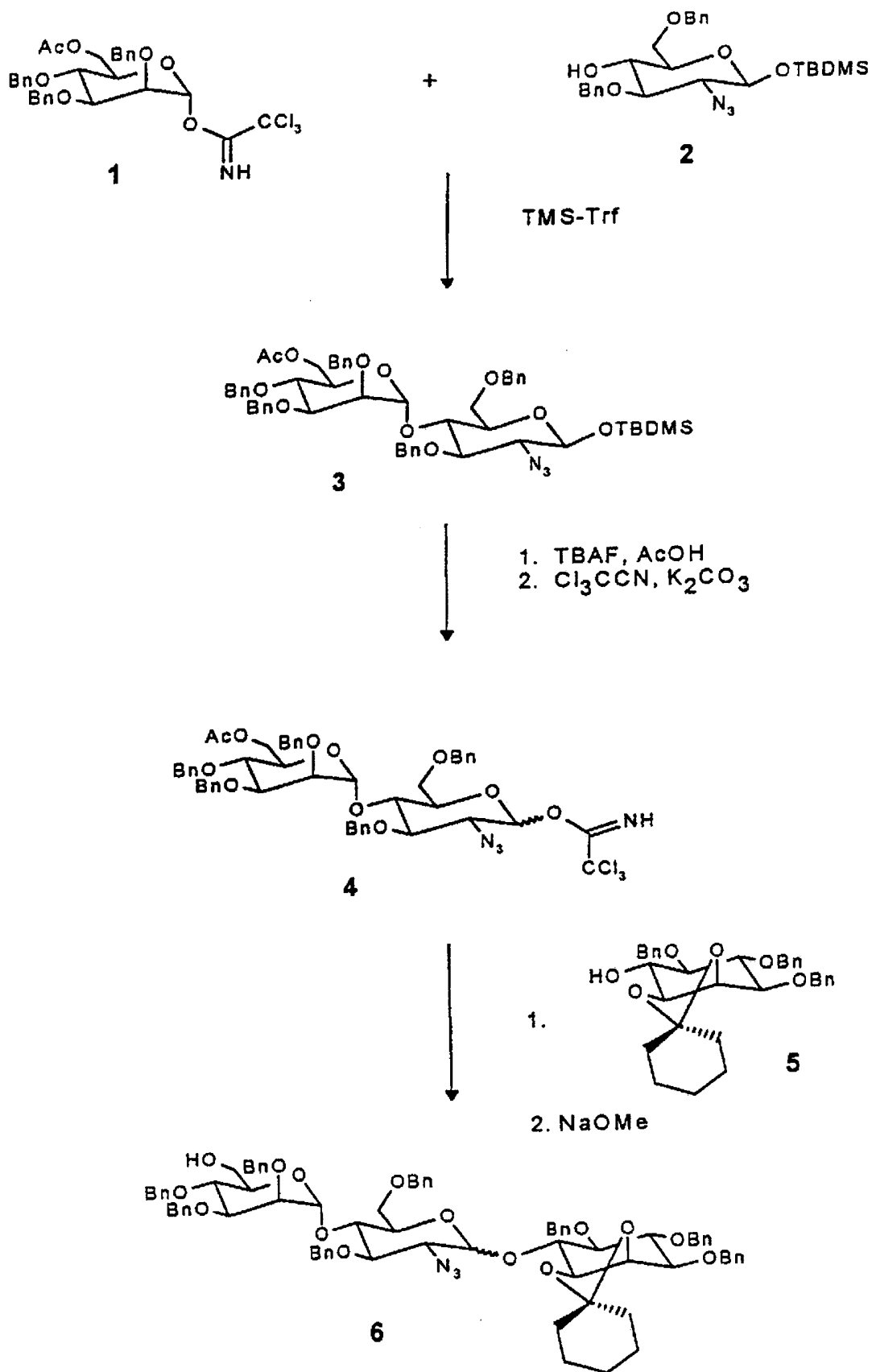
40

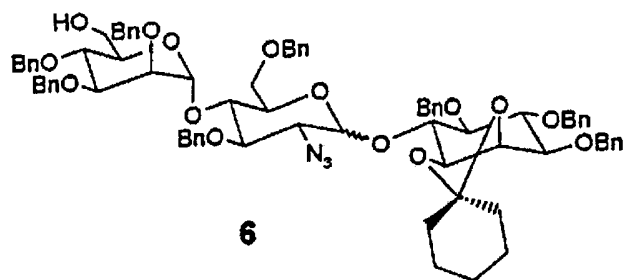
45

50

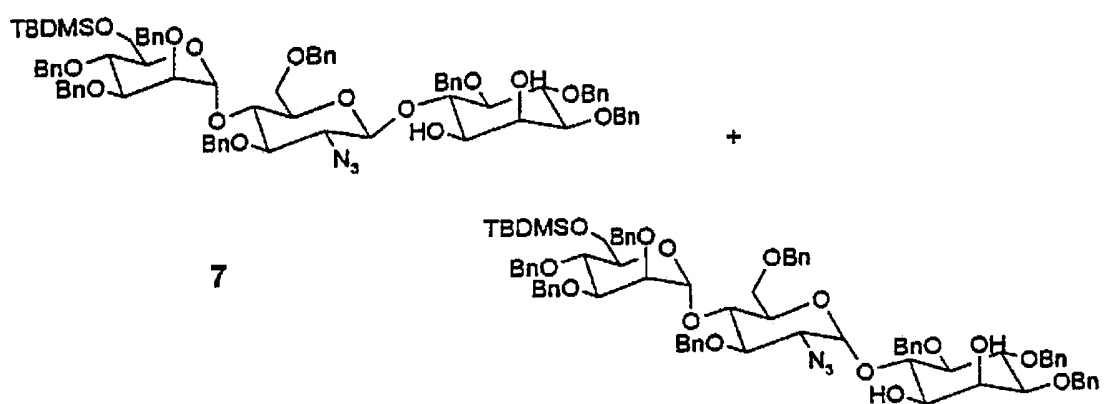
Syntéza sloučeniny 16

- 14 g kyseliny fosforité se čtyřikrát zahustí s pyridinem a potom se vyjme do 200 ml vysušeného pyridinu. Při teplotě 10 °C se přikape 16 ml pivaloylchloridu, reakční směs se nechá stát po dobu 5 15 minut při teplotě místnosti, načež se do ní vnese 18,1 g (6,9 mmol) sloučeniny 15. Po jedné hodině se směs zředí 200 ml toluenu a 150 ml směsi methylenchlorid/methylalkohol/33% NH₃ (30 : 10 : 3). Po zahustění se třikrát vydestiluje zbytkový pyridin s toluenem. Získaný zbytek se suspenduje ve 200 ml směsi methylenchlorid/methylalkohol (20 : 1) a nerozpustné součásti se odfiltruje a dvakrát se promyjí 50 ml směsi methylenchlorid/methylalkohol (20 : 1). Filtrát se 10 zahustí a získaný zbytek se čistí pomocí mžikové chromatografie, přičemž se získá 16,9 g (91 %) chráněného konečného produktu [DC: methylenchlorid/methylalkohol/33% NH₃ (100 : 7 : 1), R_f = 0,25, MS: (M + 3Li-2H)⁺ = 2691, vypočteno C₁₅₅H₁₆₃N₃O₃₄P₂, M = 2673,94]. Pro odstranění ochranných skupin se kondensuje při teplotě -78 °C 600 ml amoniaku, v němž se rozpustí 4,7g (204 mmol) sodíku, tento roztok se zředí 300 ml vysušeného tetrahydrofuranu a potom se při teplotě -78 °C pomalu přikape roztok 16,9 g (6,3 mmol) chráněného konečného 15 produktu ve 100 ml vysušeného tetrahydrofuranu. Po 15 minutách reakční doby (modrá barva nesmí zmizet) se reakční směs opatrně smísí s 10 g chloridu amonného. Když modrá barva zmizí, zředí se reakční směs opatrně 100 ml vody a 300 ml methylalkoholu a po promísení se zahustí na objem asi 150 ml. Tento roztok se zředí 2 ml směsi methylenchlorid/methylalkohol/33% NH₃ 20 (3 : 3 : 1) a nanese se na sloupec silikagelu (700 ml silikagelu), načež se eluuje 3 l směsi methylenchlorid/methylalkohol/33% NH₃ (3 : 3 : 2) a potom 3 l směsi methylenchlorid/-methylalkohol/33% NH₃ (3 : 3,5 : 3). produkt eluuje, když se potom chromatografuje směsí n-butylalkohol/ethylalkohol/voda/33% NH₃ (2 : 2 : 2 : 1). Výtěžek činí 5,5 g (78 %) sloučeniny 16 ve formě bílé pevné látky [DC: (2 : 2 : 2 : 1), R_f = 0,4, MS: (M+H)⁺ = 1116,6, vypočteno 25 C₃₆H₆₃NO₃₄P₂, M = 1115,83, ³¹P-NMR σ = 16,3 PPM pro cyklický fosfát a 7,9 pro H-fosfát.

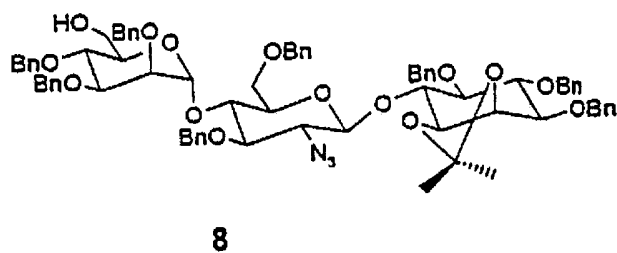


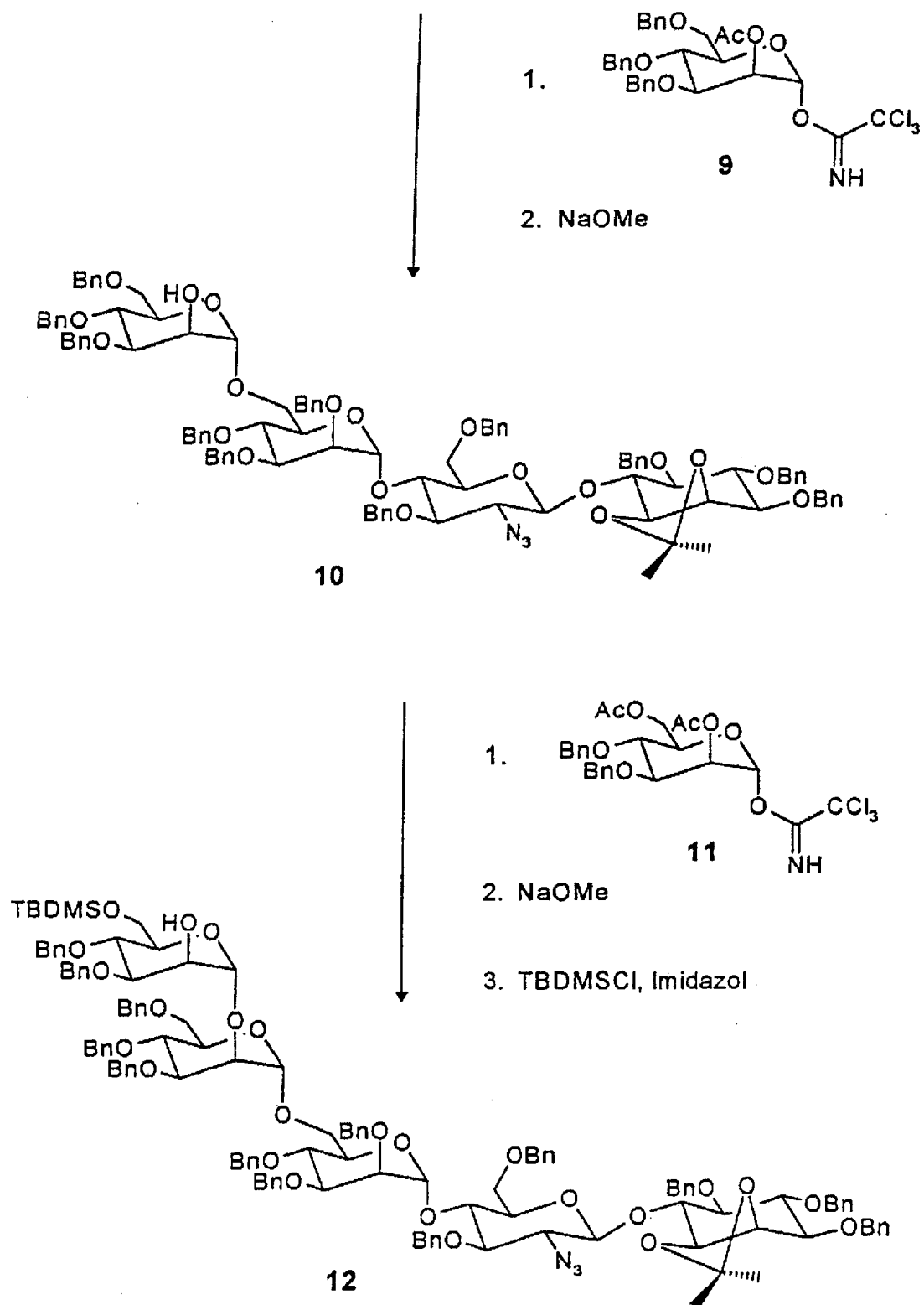


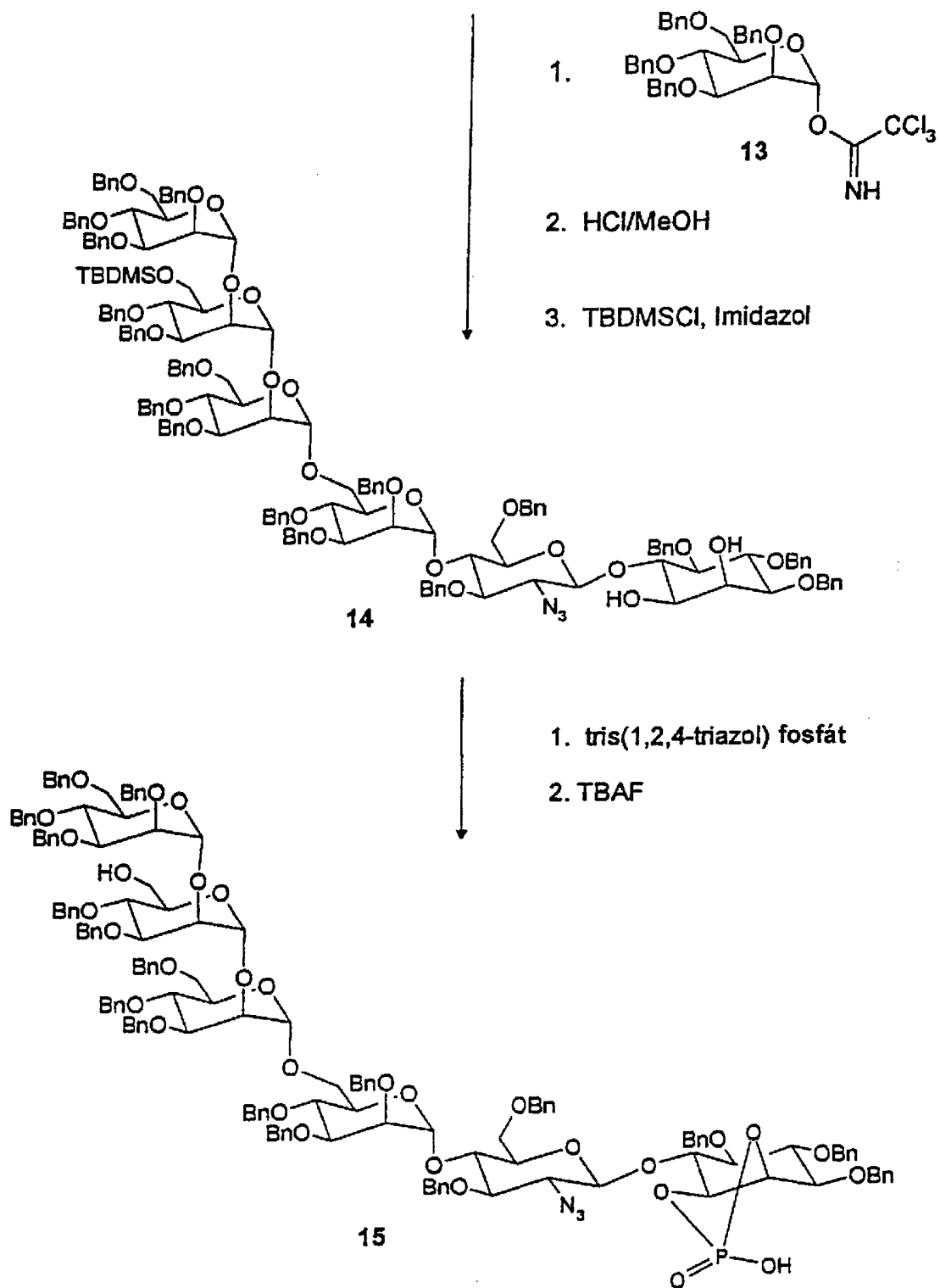
1. HCl / MeOH
2. TBDMSCl, Imidazol

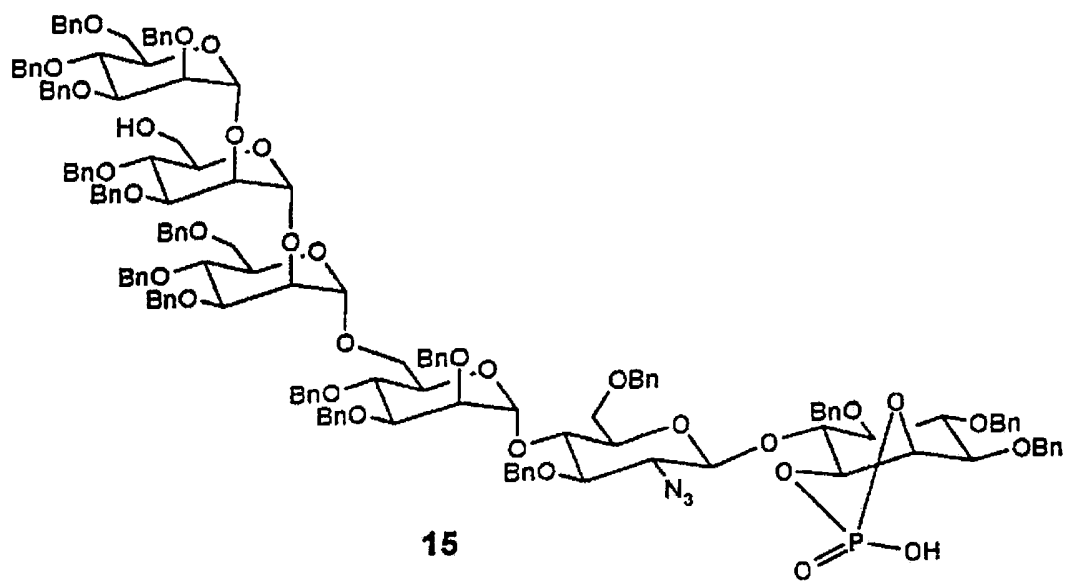


1. Dimethoxypropan, TsOH
2. TBAF



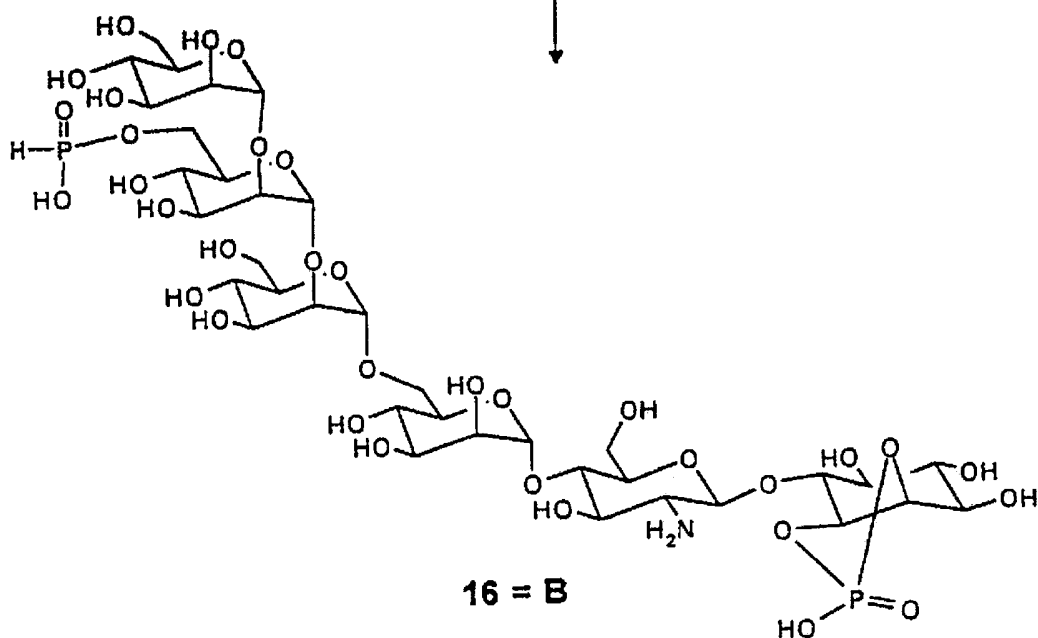






1. $\text{P}(\text{OH})_3$, PivCl

2. Na , $\text{NH}_3(\text{l})$, NH_4Cl

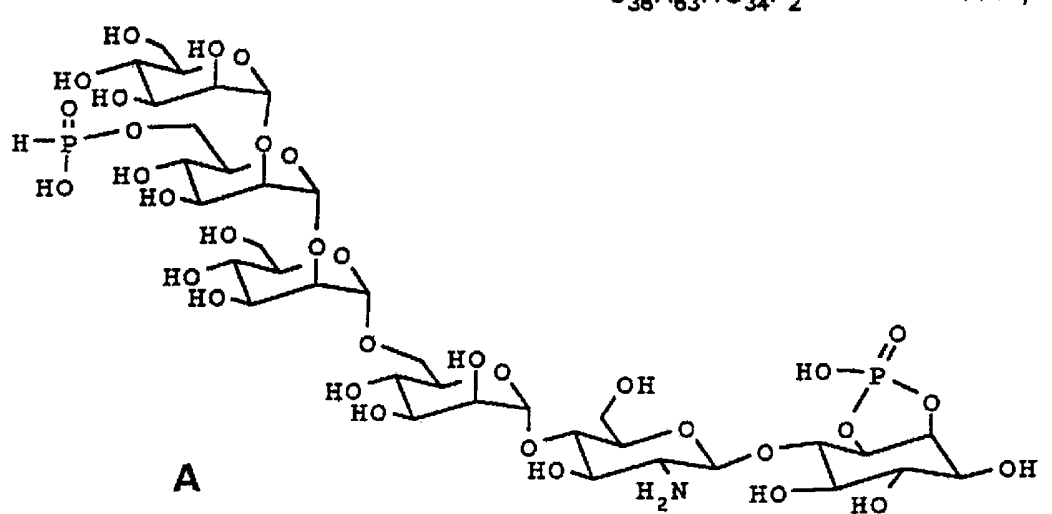


Příklad 2

Sloučenina A, C, D, E, F, G, H a I se vyrobí analogicky jako je popsáno v příklad 1. Tabulka 1 ukazuje strukturní vzorce, sumární vzorce a hmotová spektra.

5

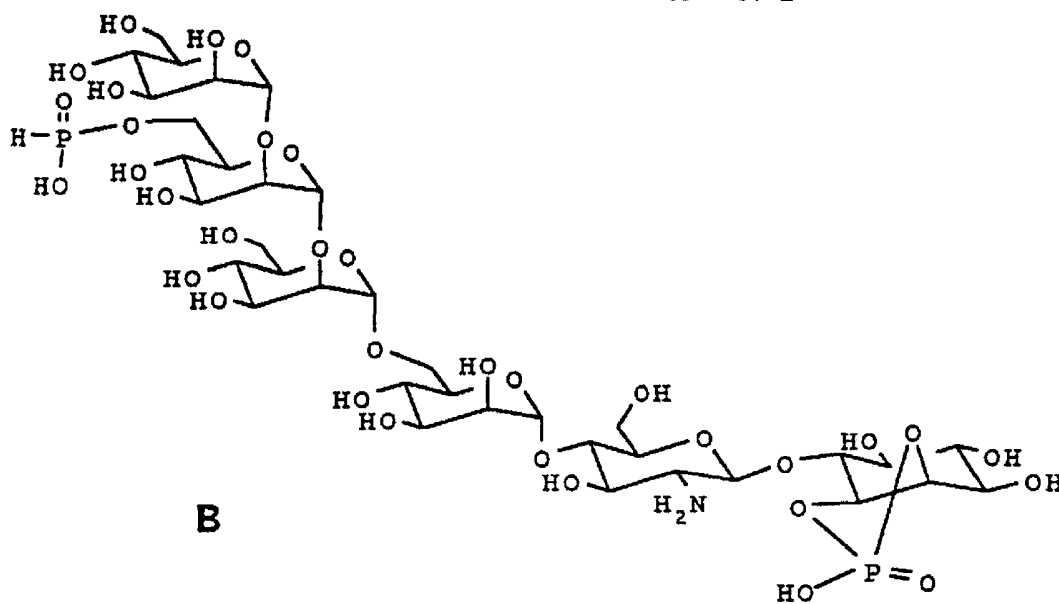
Tabulka 1

Sloučenina	sumární vzorec	hmotové spektrum (M+H) ⁺
	$C_{36}H_{63}NO_{34}P_2$	1116,5

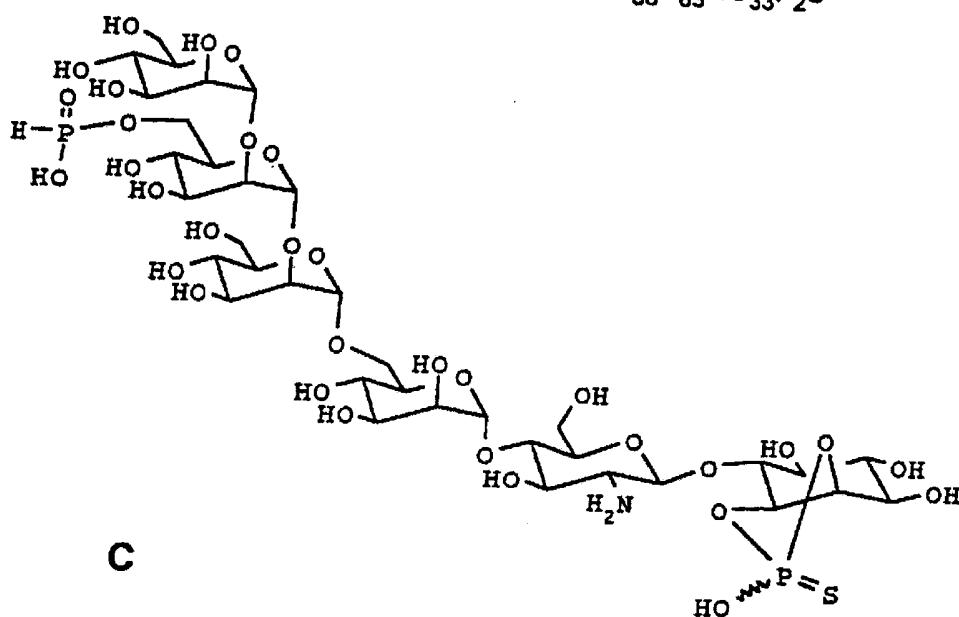
Sloučenina

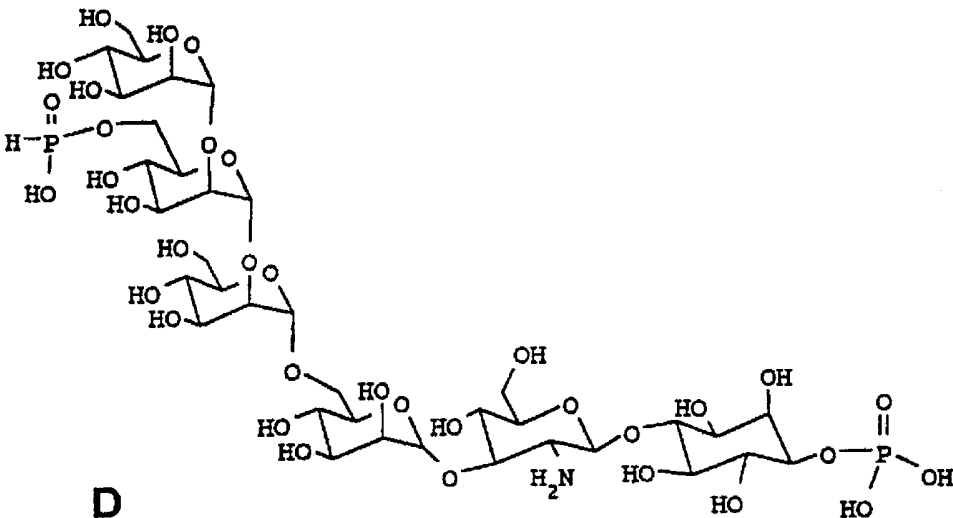
sumární
vzorechmotové
spektrum
(M+H)⁺ $C_{36}H_{63}NO_{34}P_2$

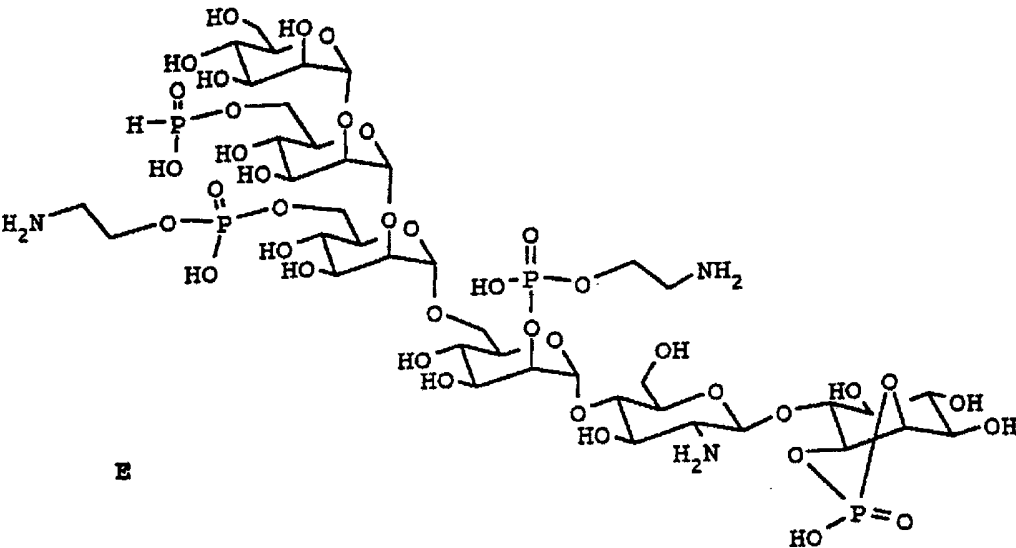
1116,5

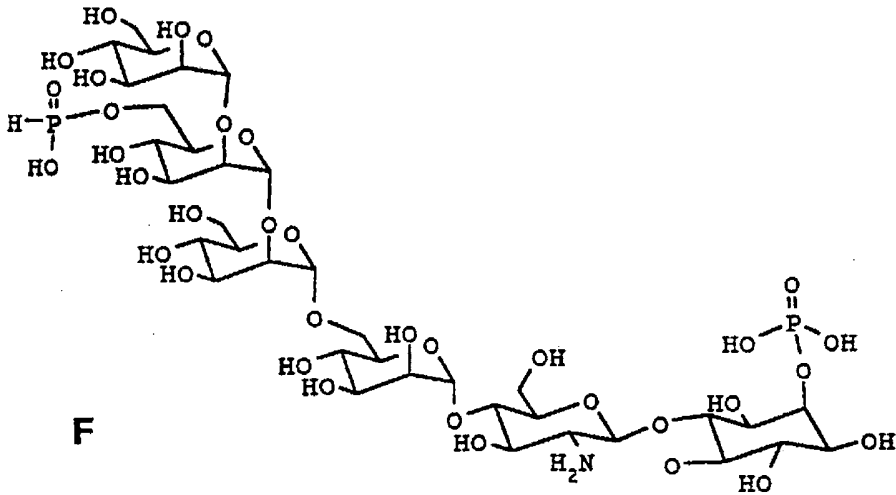
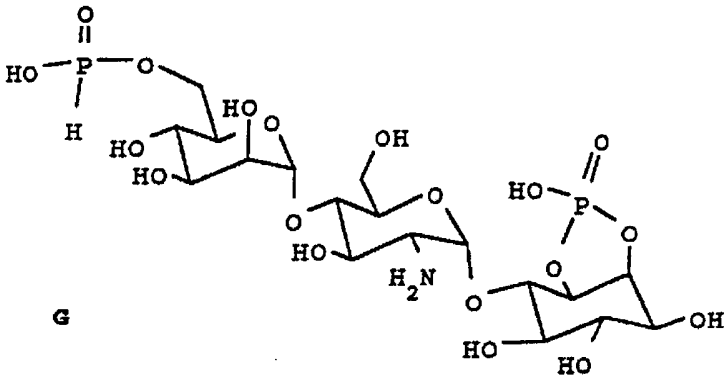
 $C_{36}H_{63}NO_{33}P_2S$

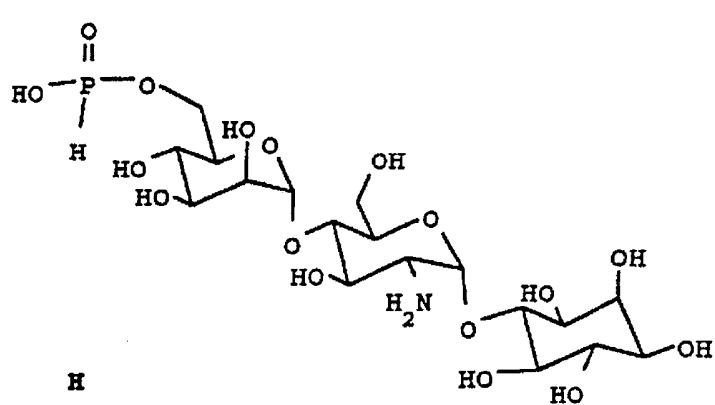
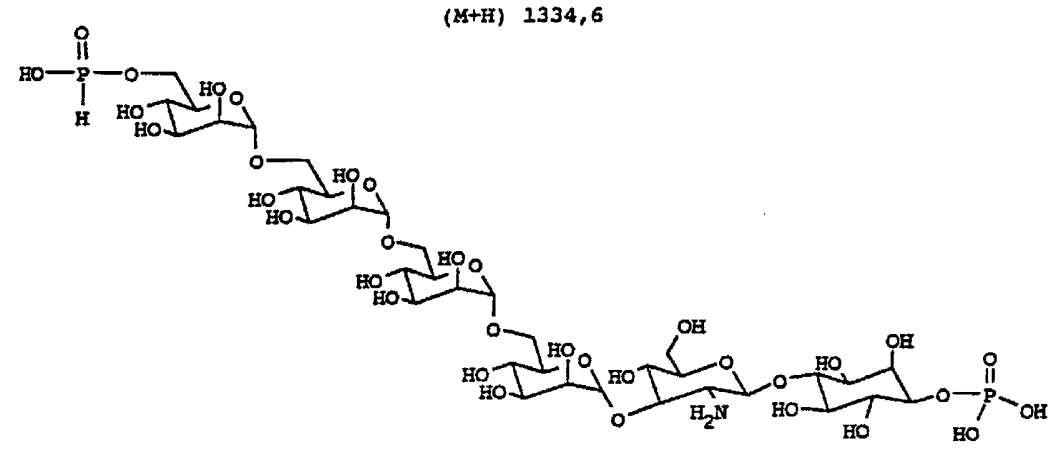
1132,7



Sloučenina	sumární vzorec	hmotové spektrum (M+H) ⁺
 D	$C_{36}H_{65}NO_{35}P_2$	1134,4

 E	$C_{40}H_{75}N_3O_{40}P_4$	1362,8
--	----------------------------	--------

Sloučenina	sumární vzorec	hmotové spektrum (M+H) ⁺
F 	$C_{36}H_{65}NO_{35}P_2$	1134,4
G 	$C_{18}H_{33}NO_{19}P_2$	630,3

Sloučenina	sumární vzorec	hmotové spektrum (M+H) ⁺
 I	$C_{18}H_{34}NO_{17}P$	568,2
		(M+H) 1334,6
 I		

Příklad 3

5 Farmaceutická účinnost

Biologická aktivita sloučenin podle předloženého vynálezu obecného vzorce I se stanovuje za pomoci izolovaných tukových buněk z krys.

10 Preparace tukových buněk z krys se provádí následujícím způsobem:

Bílá tuková tkáň nadvarlete (krysy Wistar, 160 až 180 g, žádné omezení potravy) se štěpí kolagenázou a vzniklé oddělené tukové buňky se oddělí filtrací od nerozštěpené tkáně a promyje se flokací několikrát puřem KRH (Krebs–Ringer–Henseleit).

A) Lipogeneze

- 5 Tento test stanovuje inzulinem stimulovanou přeměnu glukózy na v toluenu rozpustné produkty (triglyceridy, fosfolipidy, mastné kyseliny), které umožňují transport glukózy a syntézu triglycerid (glycerol-3-P-syntéza, esterifikace)/fosfolipid/mastné kyseliny za zahrnutí inzulin-signální přenosové kaskády. Při koncentraci glukózy 2,5 mM v testu je esterifikace (a ne glycerol-3-P-syntéza za zahrnutí transportu glukózy) určující se rychlost stimulace lipogeneze.
- 10 200 μ l (3×10^5 buněk/ml) krysích tukových buněk v KRH-pufu se inkubuje se 100 μ l D-[3- 3 H]-glukózy (25 mM, 0,4 μ Ci) za přítomnosti nebo nepřítomnosti inzulinu (10 ng/ml) nebo sloučeniny podle předloženého vynálezu obecného vzorce I po dobu 90 minut při teplotě 37 °C (konečný objem 1 ml). Přídavkem v toluenu rozpustného scintilačního kokteilu (10 ml) se buňky rozloží a lipidy se oddělí od ve vodě rozpustných produktů a inkubačního média. Po oddě-
- 15 lení fází se změří scintilačním měřením přímo bez odstranění vodné fáze radioaktivita, inkorporovaná do lipidických produktů ($[^3\text{H}]$ lipid [dpm $\cdot 10^{-3}$]). Od této aktivity se odečte kontrolní hodnota (inkubace za identických podmínek, avšak bez buněk). Hodnota lipogeneze je až 120 minut lineární. Maximální faktor stimulace – to jest poměr výsledku inkubace s inzulinem k výsledku inkubace bez inzulinu – je dán 100 %. Procentrické údaje pod „%ins_{max}“ jsou části takto definovaného faktoru stimulace. Výraz EC₅₀ udává koncentraci sloučeniny obecného vzorce I, při které je pozorováno 50 % maximální stimulaci, dosažitelné odpovídající sloučeninou obecného vzorce I.

B) Transport glukózy

- 25 Krysí tukové buňky ve 100 μ l KRH-pufu (titr 5×10^5 buněk/ml) se inkubují s inzulinem nebo se sloučeninami podle předloženého vynálezu obecného vzorce I po dobu 15 minut při teplotě 37 °C za lehkého protřepávání. Po přídavku 50 μ l 2-[3 H]deoxyglukózy (0,3 mM, 0,2 μ Ci) pokračuje inkubace při teplotě místnosti. Po určitých časových úsecích (0 až 20 minut) se odebere 100 μ l
- 30 testované vsázky a převede se do reakční nádoby (obsah 400 μ l), ve které je předloženo 250 μ l dinonylfthalátu. Po centrifugaci (15 000 x g, 1 min) se buňky na olejové vrstvě oddělí od inkubačního média pod olejovou vrstvou odříznutím trubičky na výšce olejové vrstvy a převedou se do scintilační nádoby. Po přídavku 5 ml ve vodě rozpustné scintilační kapaliny se stanoví radioaktivita. Tato celkové buňkami asociovaná radioaktivita se koriguje o pasivní, v buňkách difundovanou a v mezibuněčných prostorech uzavřenou [3 H]deoxyglukózu, odečtením kontrolní hodnoty (inkubace za přítomnosti inhibitoru transportu glukózy citochalasinu B). Iniciační (stimulovaná) rychlost transportu glukózy je až 15 minut lineární. Maximální faktor stimulace – toto je poměr výsledku inkubace s inzulinem k výsledku inkubace bez inzulinu, činí 100 %.
- 35
- 40 Výrazy „%ins_{max}“ a „EC₅₀“ jsou definovány v odstavci A) Lipogeneze.

Tabulka 2

Vzorce	Sloučenina	Lipogenese %/Ins _{max} EC ₅₀ [μM]	transport glukosy %/Ins _{max} EC ₅₀ [μM]
HO-PO(H)O-6manα1-(manα1-2)-2manα1-6manα1-4gluNβ1-6(L)inositol-1,2-(cykl.)-fosfát	A	59 7	28 8
HO-PO(H)O-6manα1-(manα1-2)-2manα1-6manα1-4gluNβ1-6(D)inositol-1,2-(cykl.)-fosfát	B	77 8,2	41 8,1
HO-PO(H)O-6manα1-(manα1-2)-2manα1-6manα1-4gluNβ1-6(D)inositol-1,2-(cykl.)-thiofosfát	C	64 7	29 10
HO-PO(H)O-6manα1-(manα1-2)-2manα1-6manα1-3gluNβ1-6(L)inositol-3-fosfát	D	33 20	18 18
HO-PO(H)O-6manα1-(manα1-2)-2manα1-6(EtNP)-6manα1(2EtNP)-4gluNβ1-6(D)inositol,2-(cykl.)-fosfát	E	48 60	34 30
HO-PO(H)O-6manα1-(manα1-2)-2manα1-6manα1-4gluNα1-6(L)inositol-2-fosfát	F	53 15	26 25
HO-PO(H)O-6manα1-4gluNα1-6(L)inositol-1,2-(cykl.)-fosfát	G	25 15	9 15
HO-PO(H)O-6manα1-4gluNα1-6(L)inositol	H	15 25	2 10
HO-PO(H)O-6manα1-6manα1-6manα1-6manα1-3gluNβ1-6(L)inositol-3-fosfát	I	18 20	14 50

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Inositolglykany s inzulínu podobným účinkem obecného vzorce I



10 a/nebo fyziologicky přijatelné soli sloučeniny obecného vzorce I a/nebo stereoizomerní formy sloučeniny obecného vzorce I, přičemž

A značí

- 15 1) $H-P(O)(OH)-$,
 2) $S(O)_2(OR^1)-$, kde R^1 značí vodíkový atom nebo alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy, nebo
 3) $NH_2-C(O)-$,

20 Z značí

- 1) 2 až 6 zbytků cukrů ze skupiny zahrnující
 1.1 manózu,
 1.2 glukózu,
 25 1.3 kyselinu glukonovou,
 1.4 kyselinu galaktonovou,
 1.5 kyselinu mannonovou,
 1.6 cukry původu z glukózaminu,
 1.7 fruktózu nebo
 30 1.8 galaktózu, nebo
- 2) 2 až 6 zbytků cukrů ze skupiny definované pod
 Z 1.1 až 1.8, jednou až šestkrát nezávisle na sobě substituovaných
 2.1 methylovou skupinou,
 35 2.2 manózou,
 2.3 cukry původu z glukózaminu,
 2.4 dimanózou nebo
 2.5 manózo-glukózaminem a glukózidická vazba obou cukrů manózy a glukózaminu
 leží mezi C-atomy 1-3, 1-2 nebo 1-6 obou cukrů a

40

R značí

- 1) inositol,
 2) inositolfosfát,
 45 3) inositolthiofosfát,
 4) inositolcyklothiofosfát nebo
 5) inositolcyklofosfát.

50

2. Inositolglykany podle nároku 1, obecného vzorce I, ve kterém

A značí $H-P(O)(OH)-$,

Z značí

- 1) 2 až 4 zbytky cukrů ze skupiny zahrnující manózu nebo cukry původem z glukóзамinu, nebo
- 2) 2 až 4 zbytky cukrů ze skupiny zahrnující manózu nebo cukry původem z glukóзамinu jednou substituované manózou a

5

R značí

- 1) inositol,
- 2) inositolfosfát nebo
- 10 3) inositolcyklofosfát.

3. Způsob výroby inositolglykanů obecného vzorce I podle některého z nároků 1 a 2, **vyznačující se tím**, že se inositolglykan postupně vystaví z chráněných předstupňů cukru a inositolu, potom se připojí zbytek A a ze získané sloučeniny se odštěpí jedna nebo více

15 temporárních ochranných skupin, zavedených pro ochranu jiných funkcí a takto získaná sloučenina obecného vzorce I se popřípadě převede na svojí fyziologicky přijatelnou sůl.

4. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje účinné množství alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle některého z nároků 1 až 2 v rozpuštěné, amorfní nebo krystalické formě.

20

5. Farmaceutický prostředek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jeden modifikovaný nebo nemodifikovaný inzulin nebo derivát inzulinu.

25 6. Použití alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I podle některého z nároku 1 nebo 2, pro výrobu farmaceutických preparátů pro ošetření diabetes mellitus nebo na inzulinu nezávislém diabetes.

30

Konec dokumentu
