[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07H 3/06
A61K 31/70

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97122958.9

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1136224C

[22] 申请日 1997.11.26 [21] 申请号 97122958.9
[30] 优先权
[32] 1996.11.28 [33] DE [31] 19649350.1
[71] 专利权人 赫彻斯特股份公司
地址 联邦德国法兰克福
[72] 发明人 W·福里克 G·默勒
审查员 王景华
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 唐伟杰

权利要求书 4 页 说明书 23 页

[54] 发明名称 具有类胰岛素作用的肌醇聚糖

[57] 摘要

本发明描述了式 I 化合物 A－Z－R (I)，其中 A 是基团 H－P(O)(OH)－，H－P(S)(OH)－，HO－P(S)(OH)－，HS－P(S)(OH)－，(C_1－C_4)－烷基－P(O)(OH)－，(C_1－C_4)－烷基－P(S)(OH)－，$S(O)_2(OR^1)$－，S(O)(OR^1)－，NH_2－C(O)－，R^1R^2N－，R^1R^2N－C(O)－NH－，R^1O－SO_2－NH－，(C_1－C_4)－烷基－SO_2－，(C_1－C_4)－烷基－S(O)－或 R^1－S－；Z 是 2－6 个取代的或未取代的糖基且 R 是取代的或未取代的肌醇。 式 I 化合物适于治疗糖尿症或非胰岛素依赖性糖尿病。

ISSN1008-4274

1. 式 I 的化合物

$$A-Z-R \quad (I)$$

和/或式 I 化合物的生理可耐受盐和/或立体异构体形式的式 I 化合物，其中

A 是基团

1) H-P(O)(OH)-,

2) H-P(S)(OH)-,

3) HO-P(S)(OH)-,

4) HS-P(S)(OH)-,

5) $S(O)_2(OR^1)$-,

6) S(O)(OR^1)-,

7) NH_2-C(O)-,

8) R^1R^2N-,

9) R^1R^2N-C(O)-NH-，或

10) R^1O-SO_2-NH-,

其中 R^1 和 R^2 彼此独立地是氢或 C_{1-4} 烷基，

Z 是 1) 2－6 个糖基，

2) 被下述基团彼此独立地单至六取代的 2－6 个糖基，所述取代基是

2.1 甲基，

2.2 糖基，

2.3 二糖基，

2.4 $-SO_2-OH$，

2.5 $-C(O)-NR^1R^2$，

2.6 $-C(O)-C_{1-4}$ 烷基，

2.7 -P(O)(H)OH，

2.8 $-P(O)(OH)_2$,

2.9 $-P(S)(H)OH$,

2.10 $-P(S)(OH)_2$,

2.11 $-P(S)(SH)(OH)$, 或

2.12 $-P(O)(OH)-O-CH_2-CH_2-NR^1R^2$

且其中 R^1 和 R^2 彼此独立地是氢或 C_{1-4} 烷基,

R 是 1) 肌醇,

2) 肌醇磷酸酯,

3) 肌醇硫代磷酸酯,

4) 肌醇环磷酸酯,

5) 肌醇环硫代磷酸酯,

6) 被下述基团彼此独立地单或二取代的 R 2) 至 5) 下定义的基团, 所述取代基是

6.1 磷酸酯基 或

6.2 硫代磷酸酯基,

7) 被下述基团单取代的 R 2) 至 5) 下定义的基团, 所述取代基是

7.1 环磷酸酯基 或

7.2 环硫代磷酸酯基,

2. 权利要求 1 的式 I 化合物, 其中

A 是 1) $H-P(O)(OH)-$,

2) $S(O)_2(OR^1)-$ 或

3) $NH_2-C(O)-$,

其中 R^1 是氢或 C_{1-4}-烷基,

Z 是 1) 源于下述糖的 2 - 6 个糖基, 所述糖是

1.1 甘露糖,

1.2 葡萄糖,

1.3 葡糖酸,

1.4 半乳糖酸,

1.5 甘露糖酸，

1.6 葡糖胺，

1.7 果糖 或

1.8 半乳糖，

2) 源于 Z 1.1 至 1.8 下定义的并且被下述取代基彼此独立地单至六取代的 2－6 个糖基，所述取代基是

2.1 甲基，

2.2 甘露糖，

2.3 葡糖胺，

2.4 二甘露糖，

2.5 甘露糖－葡糖胺，并且两个糖分子甘露糖和葡糖胺间的配糖键是介于两个糖分子的 1－3、1－2 或 1－6 位碳原子之间，

且

R 是 1) 肌醇，

2) 肌醇磷酸酯，

3) 肌醇硫代磷酸酯，

4) 肌醇环硫代磷酸酯 或

5) 肌醇环磷酸酯。

3. 权利要求 1 的式 I 化合物，其中

A 是 1) H-P(O)(OH)-，

Z 是 源于下述糖的 2－4 个糖基，所述糖是

1) 甘露糖 或

2) 葡糖胺或被甘露糖基单取代的葡糖胺，且

R 是 1) 肌醇，

2) 肌醇磷酸酯，

3) 肌醇环磷酸酯。

4. 一种制备如权利要求 1－3 任一项的式 I 化合物的方法，包括由保

护的糖和肌醇前体合成肌醇聚糖的步骤，然后加入基团 A，除去化合物的一种或多种临时引入的用以保护其它功能基的保护基，如果需要，可将如此获得式 I 化合物转化为其生理可耐受性盐。

5. 一种药物制剂，含有有效量的至少一种权利要求 1－3 任一项的式 I 化合物，所述式 I 化合物是溶解、无定形或结晶形式的。

6. 权利要求 5 的药物制剂，含有一定量的至少一种改性或未改性的胰岛素或胰岛素衍生物。

7. 一种生产权利要求 5 或 6 的药物制剂的方法，包括将至少一种式 I 化合物加到有生理可接受的赋形剂的适宜给药的剂型中，如果需要该剂型中还可加入添加剂和辅助剂。

8. 权利要求 7 的方法，其中加入至少一种改性和/或未改性的胰岛素或胰岛素衍生物。

9. 权利要求 1－3 任一项的式 I 化合物用于生产治疗糖尿病或非胰岛素依赖性糖尿病的药物的用途。

具有类胰岛素作用的肌醇聚糖

技术领域

本发明涉及具有类胰岛素作用的肌醇聚糖，这些化合物适于治疗糖尿症。

背景技术

已知胰岛素的代谢作用还形成同样具有类胰岛素作用的小分子量化合物（US 4446064）。已建议了一些具有类胰岛素作用的肌醇聚糖化合物（WO 96/14075，JP 6/293790，JP 4/120089）。

II 型糖尿病，一种非胰岛素依赖性糖尿病，伴随着外周组织如肌肉或脂肪组织的胰岛素抗性。因此降低的葡萄糖利用率是由于胰岛素对葡萄糖转运和随后代谢过程的刺激缺乏造成的。

发明内容

本发明者试图发现其它具有类胰岛素作用的化合物，现已发现本发明化合物具有体外类胰岛素作用，表现出良好的血清稳定性并对胰岛素抗性组织也具有类胰岛素作用，适于治疗糖尿症。

因此本发明涉及式 I 的具有类胰岛素作用的肌醇聚糖

A-Z-R (I)

和/或式 I 化合物的生理可耐受盐和/或立体异构体形式的式 I 化合物，其中

A 是基团

1) H-P(O)(OH)-,

2) H-P(S)(OH)-,

3) HO-P(S)(OH)-,

4) HS-P(S)(OH)-,

5) (C_1-C_4)-烷基-P(O)(OH)-,

6) (C_1-C_4)-烷基-P(S)(OH)-,

7) $S(O)_2(OR^1)$-,

8) S(O)(OR^1)-,

9) NH_2-C(O)-,

10) R^1R^2N-,

11) R^1R^2N-C(O)-NH-,

12) R^1O-SO_2-NH-,

13) (C_1-C_4)-烷基-SO_2-,

14) (C_1-C_4)-烷基-S(O)-或

15) R^1-S-

其中R^1和R^2彼此独立地是氢或(C_1-C_4)-烷基,

Z是 1)2 - 6个糖基,

2)被下述基团彼此独立地单至六取代的2 - 6个糖基,所述取代基是

2.1 甲基,

2.2 糖基,

2.3 二糖基,

2.4 -SO_2-OH,

2.5 -C(O)-NR^1R^2,

2.6 -C(O)-(C_1-C_4)-烷基,

2.7 -P(O)(H)OH,

2.8 -P(O)$(OH)_2$,

2.9 -P(S)(H)OH,

2.10 -P(S)$(OH)_2$,

2.11 -P(S)(SH)(OH),

2.12 -P(O)(OH)-O-CH_2-CH_2-NR^1R^2或

2.13 2 - 6个糖基间的配糖键被-CH_2-或-S-取代一至六次,且其中R^1和R^2彼此独立地是氢或(C_1-C_4)-烷基,

R是 1) 肌醇,

2) 肌醇磷酸酯,

3) 肌醇硫代磷酸酯,

4) 肌醇环磷酸酯,

5) 肌醇环硫代磷酸酯,

6) 被下述基团彼此独立地单或二取代的R 2)至5)下定义的基团，所述取代基是

6.1 磷酸(酯)基 或

6.2 硫代磷酸(酯)基,

7) 被下述基团单取代的R 2)至5)下定义的基团，所述取代基是

7.1 环磷酸(酯)基 或

7.2 环硫代磷酸(酯)基,

8) 肌醇，其中两个相邻的OH基被下述取代基取代，所述取代基是

8.1 $-CH_2-SO_2-NH-$。

优选的式I化合物中，是其中

A是 1) H-P(O)(OH)-,

2) $S(O)_2(OR^1)-$ 或

3) $NH_2-C(O)-$,

Z是 1) 源于下述糖的2 - 6个糖基，所述糖是

1.1 甘露糖,

1.2 葡萄糖,

1.3 葡糖酸,

1.4 半乳糖酸,

1.5 甘露糖酸,

1.6 葡糖胺,

1.7 果糖 或

1.8 半乳糖,

2) 源于Z 1.1至1.8下定义的并且被下述取代基彼此独立地单至六取代的2 - 6个糖基，所述取代基是

2.1 甲基,

2.2 甘露糖,

2.3 葡糖胺，

2.4 二甘露糖，

2.5 甘露糖－葡糖胺基，并且两个糖分子甘露糖和葡糖胺间的配糖键是介于两个糖分子的1－3、1－2或1－6个碳原子之间，

且

R是 1) 肌醇，

2) 肌醇磷酸酯，

3) 肌醇硫代磷酸酯，

4) 肌醇环硫代磷酸酯 或

5) 肌醇环磷酸酯。

特别优选的式I化合物中，其中

A是 1) H-P(O)(OH)-，

Z是 1) 源于下述糖的2－4个糖基，所述糖是

1.1 甘露糖 或

1.2 葡糖胺，

2) 源于下述糖的2－4个糖基，所述糖是

2.1 甘露糖 或

2.2 被甘露糖基单取代的葡糖胺，且

R是 1) 肌醇，

2) 肌醇磷酸酯，

3) 肌醇环磷酸酯。

糖基应理解为含3－7个碳原子的醛糖或酮糖，它们可以是D或L构型的；它们还包括氨基糖或糖醛酸。可提及的实例是葡萄糖，甘露糖，果糖，半乳糖，核糖，赤藓糖，甘油醛，景天庚酮糖，葡糖胺，半乳糖胺，葡糖醛酸，半乳糖醛酸，葡糖酸，半乳糖酸或甘露糖酸。

二糖是指由两个糖单位组成的多糖。三、四、五或六糖由3－6个糖通过类似缩醛的键合形成。在此，所述键合可以以α-或β-形式存在。糖单

位间的键合优选通过一个糖单位的 1 位与另一个糖单位的 6 位碳原子、一个糖单位的 1 位与另一个糖单位的 2 位以及一个糖单位的 1 位与另一个糖单位的 4 位进行。糖单位间的键合优选是α-形式的。

A 与 Z 例如通过 Z 的一个氧原子或者通过 Z 的一个碳原子键合，优选通过 Z 的 CH_2 基的碳原子进行键合。基团 A 10)至 12)的键合优选通过 Z 的碳原子进行，其它 A 的键合优选通过 Z 的氧原子进行。

R 与 Z 的键合与二、三、四、五或六糖的键合类似。另外，R 与 Z 的键合也可被-CH_2-或-S-取代一次或多次。

如果糖是取代的，则取代优选发生在糖 OH 基的氢原子上。

术语胰岛素抗性组织意指例如大鼠脂肪细胞，它们根本不含有胰岛素受体。

本发明的化合物可包含一个或多个磷酸（酯）基，另外该磷酸（酯）基也可由磷酸基保护基衍生。磷酸（酯）基保护基是例如苯基、苄基或羟丙基氰基(Houben Weyl, Methoden der Organischen Chemie[有机化学方法], 12 卷/1 或 12 卷/2; Teiheimer, 有机化学合成方法, 45 卷)。

式 I 化合物的生理可耐受性盐具体是指可药用的或者非毒性的盐。这类盐是例如由含酸性基团，如磷酸基或硫酸基的式 I 化合物与碱金属或碱土金属，如钠、钾、镁和钙形成的；也可与生理可耐受性有机胺，如三乙胺和三(2-羟乙基)胺形成。含碱性基团，如氨基的式 I 化合物可与无机酸，如盐酸、硫酸或磷酸形成盐，以及与有机羧酸或磺酸，如乙酸、柠檬酸、苯甲酸、马来酸、富马酸、酒石酸和对甲苯磺酸形成盐。其中碱性和酸性基团以相同数量存在的化合物可形成内盐，且不依赖于第三种成盐组分。

本发明还涉及式 I 化合物的制备方法，包括由保护的糖和肌醇前体合成肌醇聚糖的步骤，然后加入基团 A，除去化合物的一种或多种临时引入的用以保护其它功能基的保护基，如果需要，可将如此获得式 I 化合物转化为其生理可耐受性盐。

二糖或多糖可采用已知方法合成(H. Paulsen, Angew. Chem. Int. Ed. 21(1982) p. 155)。优选采用三氯乙酰亚氨酸酯法合成寡糖(R. R. Schmidt, Angew. Chem. Int. Ed. 25(1986)212-235; T. Ogawa, 四面体通讯, 31(1990)2439-2442)。

磷酸酯借助 H-磷酸酯和氨基磷酸酯法合成(W. Bannwath 等, Helvetica Chemica Acta, 70(1987), 175-186; L. A. Slotin, 合成(1977)737-752)。

可作为糖的羟基保护基的有: 苄基、乙酰基、苯甲酰基、新戊酰基、三苯甲游基、叔丁基二甲硅烷基、亚苄基、亚环己基或异亚丙基保护基。

式 I 化合物和它们的生理可耐受性盐主要可用作治疗糖尿症或非胰岛素依赖性糖尿病的药物制剂的活性化合物。

因此, 本发明还涉及药物制剂, 该制剂含有至少一种式 I 化合物和/或至少一种其生理可耐受性盐, 式 I 化合物或其盐是以溶解、无定形和/或结晶形式存在的, 优选以无定形和/或结晶形式存在。

药物制剂优选是注射溶液或悬浮液, 其 pH 约为 3.0 - 9.0, 优选约为 5.0 - 8.5, 在无菌水溶液或悬浮液中含有适宜的等渗调节剂、适宜的防腐剂, 如果需要, 还含有适宜的缓冲剂, 如果需要, 还含有适宜的缓释成分。除活性化合物外, 所有这些制剂成分构成制剂赋形剂。适宜的等渗调节剂是例如甘油、葡萄糖、甘露醇糖、氯化钠、钙或镁化合物如氯化钙或氯化镁。适宜的防腐剂是例如苯酚、间甲酚、苯甲醇和/或对羟基苯甲酸酯。

可使用缓冲剂物质如乙酸钠、柠檬酸钠或磷酸钠将 pH 调节到约 5.0 - 8.5。另外, 生理可接受的稀酸(典型的是盐酸)或碱(典型的是氢氧化钠)也适用于调节 pH。

为改变本发明制剂的作用曲线, 还可掺入改性(EP-B 132769 和 EP-B 132770)和/或未改性的胰岛素, 优选牛、猪或人胰岛素, 尤其是人胰岛素。

药物制剂的制备可如下进行: 将至少一种式 I 化合物和/或其生理可耐受性盐, 如果需要与改性和/或未改性的胰岛素或胰岛素衍生物一起加到有生理可接受的赋形剂的适宜给药的剂型中, 如果需要该剂型中还可加入添加剂和辅助剂。

具体实施方式

通过下述实施例对本发明进行更详细的说明。

实施例 1:

化合物 B 的制备

可由实施例 1 末尾的反应路线图获知该反应过程。

化合物 3 的合成

将 60g(94mmol)的 1 (T.G. Mayer, B. Kratzer, R.R. Schmidt, Angew.Chem, 106(1994)2289-93)和 21.2g(42.4mmol)的 2(A. Termin, R.R. Schmidt, Liebigs Ann. Chem.(1989)789-795)溶于 200 ml 干燥二氯甲烷和 400 ml 干燥正庚烷中。加入 70g 干燥分子筛(0.4nm)后，该混合物在室搅拌 15 分钟。然后加入 5ml 0.05M 三甲硅烷基三氟甲烷-磺酸的二氯甲烷溶液(在下面的反应中称之为催化剂溶液)。15 分钟后，加入 300ml 正庚烷/乙酸乙酯(1:1)，将该混合物滤过硅胶。硅胶用正庚烷/乙酸乙酯(1:1)洗，然后浓缩滤液。借助闪式色谱纯化后，获得 41.0 g 无色油状物 3 (99%)。TLC: 正庚烷/乙酸乙酯(1:1)，R_f = 0.6, MS: $(M+Li)^+$=981.1, 计算值 $C_{55}H_{67}N_3O_{11}Si$, M=974.21。

亚氨酸酯 4 的合成

将 41 g(42.0mmol)的 3 溶于 400 ml(THF)和 9 ml 乙酸中。加入 70 ml 1M TBAF/THF 溶液后，使混合物在室温放置 8 小时。冷冻(在-30℃冷冻 16 小时)除去乙酸，过滤浓缩后经闪式色谱纯化。获得 34.1g(94%)脱保护的化合物。将该化合物溶于 300ml 干燥二氯甲烷中。加入 50ml 三氯乙腈和 20g 碳酸钾后，使该混合物在室温放置 4 小时。滤过硅胶，硅胶用正庚烷/乙酸乙酯(1:1)洗，滤液浓缩。获得粗品: 42.1g。TLC: 正庚烷/乙酸乙酯(2:1), R_f=0.5. ^{1}H-NMR($CDCl_3$): 乙酸氨酸酯特征峰; σ=8.78(NH)和 5.63(端基异构体)(β-亚氨酸酯) 。

三糖 6 的合成

将 33.2g(33.30mmol)的 4 和 13.3g(25.0mmol)的 5(R. Aneja, S. G. Aneja, A. Parra, 四面体, Asymmetry 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, 四面体, 46(1990)8243-54)溶于 120ml 干燥二氯甲烷和 360ml 干燥正庚烷中。加入 100g 分子筛后，将该混合物在室温搅拌 15 分钟。在氩气氛下将混合物冷却到-20℃，然后用 20 ml 催化剂

溶液处理。30 分钟后，使混合物融化到室温。为进行后处理，将混合物滤过硅胶，该硅胶用正庚烷/乙酸乙酯(1:1)洗。滤液浓缩并将粗品(46.2g)溶于 150ml 二氯甲烷中。加入 400ml 甲醇和 15ml 1M NaOMe/MeOH 溶液后，使混合物在室温放置 16 小时。该溶液用 1 ml 水处理并浓缩。所得油溶于 50 ml 乙酸乙酯，用 200 ml 正庚烷/乙酸乙酯(1:1)稀释并滤过硅胶。浓缩后，残余物经闪式色谱纯化。得到 32.5g(97%)白色泡沫状端基异构体混合物。TLC: 正庚烷/乙酸乙酯(2:1)，R_f = 0.5，MS: $(M+Li)^+$=1336.7，计算值 $C_{80}H_{87}N_3O_{15}$，M=1330.59。

三糖 7 的合成

端基异构体 6 可经简单的色谱分离为衍生物 7。32.4 g(24.4mmol)的 6 溶于 200 ml 二氯甲烷。加入 500 ml 0.5M HCl/MeOH(由 17.5 ml AcCl 的 500 ml MeOH 溶液制备)和 20 ml 乙二醇后，该混合物在室温放置 17 小时。浓缩后，残余物经闪式色谱纯化。所得产物(26.9g，88%)溶于 300ml 二氯甲烷中。加入 3.0g 咪唑和 4.6g TBDMSCl。在室温 16 小时后，该混合物用 500ml 正庚烷/乙酸乙酯(2:1)稀释并滤过硅胶。该硅胶用正庚烷/乙酸乙酯(2:1)洗，并浓缩滤液。获得 21.1g(72%)的 7 和 6.3g α-产物。(22%) TLC: 正庚烷/乙酸乙酯(2:1)，R_f = 0.5(7)和 R_f=0.3(α-产物)。MS: $(M+Li)^+$=1370.6，计算值 $C_{80}H_{93}N_3O_{15}Si$，M=1364.71。

三糖 8 的合成

将 21.2g(15.5mmol)的 7 溶于 60 ml 二氯甲烷和 180 ml 二甲氧基丙烷。加入 250 mg TsOH 并使混合物在室温放置 1 小时。加入 2 ml 三乙胺后，浓缩获得 23.1g 粗品。将粗品溶于 150 ml THF，用 30 ml 1 M TBAF/THF 溶液处理。16 小时后，浓缩并经闪式色谱纯化。获得：20.0g(99%)白色泡沫状的 8。 TLC: 正庚烷/乙酸乙酯(2:1)，R_f = 0.4，MS: $(M+Li)^+$=1296.7，计算值 $C_{77}H_{83}N_3O_{15}$，M=1290.51。

四糖 10 的合成

类似于化合物 6 的合成方法，将 20.0g(15.4mmol)的 8 与

15.0g(23.5mmol)的9(T. G. Mayer, B. Kratzer, R. R. Schmidt, Angew. Chem. 106(1994)2289-93)反应，获得20.3g(76%)白色泡沫状的四糖10。TLC: 正庚烷/乙酸乙酯(2:1)，R_f = 0.6, MS: $(M+Li)^+$=1770，计算值$C_{107}H_{115}N_3O_{20}$，M=1763.09。

五糖12的合成

类似于化合物6的合成方法，将20.3g(11.8mmol)的10与12.0g(23.5mmol)的11(T. G. Mayer, B. Kratzer, R. R. Schmidt, Angew. Chem. 106(1994)2289-93)反应，获得19.4g(80%)脱酰基化合物。将该产物溶于200 ml二氯甲烷并用3.4 g(50.0mmol)咪唑处理。加入6.0 g(40.0mmol)TBDMSCl，使该混合物在室温搅拌15分钟。加入5 ml甲醇后，将其放置10分钟，然后用200 ml正庚烷/乙酸乙酯(1:1)稀释并滤过硅胶。硅胶用另外的200 ml正庚烷/乙酸乙酯(1:1)洗，滤液浓缩并经闪式色谱纯化。获得19.4g(95%)白色泡沫状的12。TLC: 正庚烷/乙酸乙酯(2:1)，R_f = 0.7, MS: $(M+Li)^+$=2226，计算值$C_{133}H_{151}N_3O_{25}Si$，M=2219.75。

六糖14的合成

将19.4g(8.9mmol)的12和14.0g(20.0mmol)的13 (T.G. Mayer, B. Kratzer, R.R. Schmidt, Angew.Chem, 106(1994)2289-93)溶于100 ml干燥二氯甲烷和300 ml干燥正庚烷中。加入40g分子筛(0.4nm)后，该混合物在室搅拌15分钟。然后加入10ml催化剂溶液并将混合物继续搅拌15分钟。为进行后处理，将混合物滤过硅胶，硅胶用正庚烷/乙酸乙酯(1:1)洗，然后浓缩滤液，获得33g粗产物。将其溶于200ml二氯甲烷中并用500ml 0.5M HCl的甲醇溶液处理。在室温2小时后，将混合物浓缩并用二氯甲烷浓缩数次。所得中间体溶于200 ml二氯甲烷并用3.4g(50mmol)咪唑和6.0g(40mmol)TBDMSCl处理。16小时后，类似于化合物12合成方法进行后处理。获得20.2g(85%)白色泡沫状的化合物14。TLC: 正庚烷/乙酸乙酯(2:1)，R_f = 0.3, MS: $(M+Li)^+$=2669，计算值$C_{161}H_{177}N_3O_{30}Si$，M=2662.26。

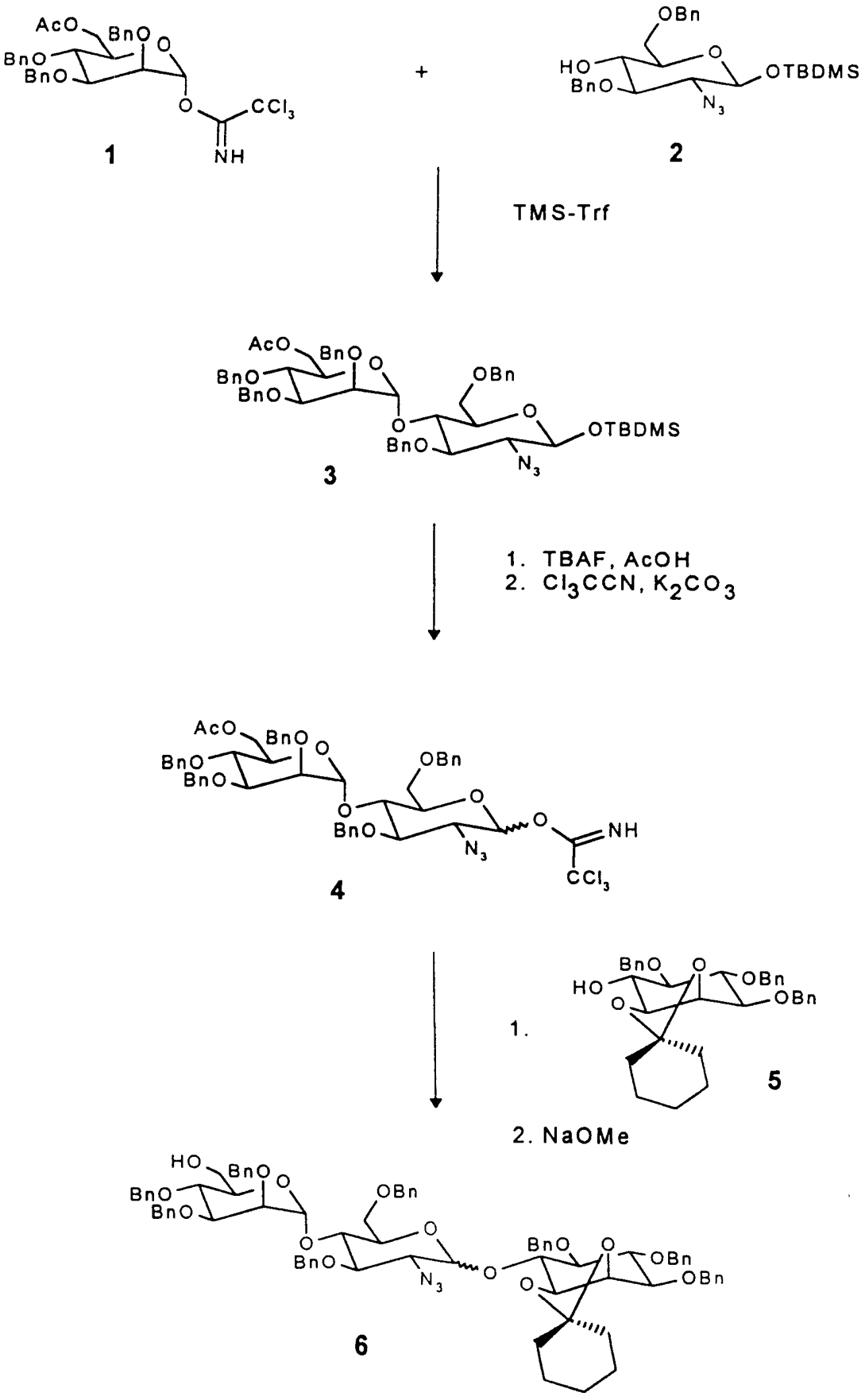
化合物15的合成

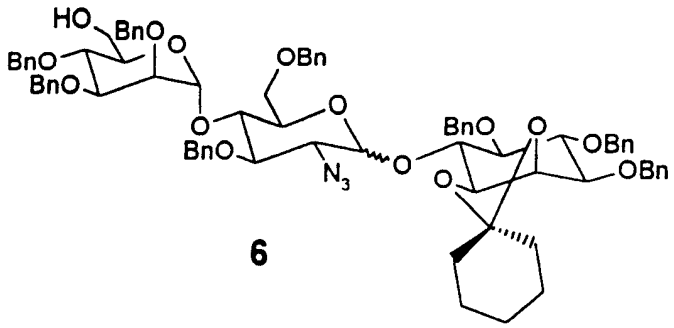
将 30.0g 三唑溶于 800ml 干燥 THF。在 10 ℃下滴加 13.5 ml 磷酰氯。然后滴加 60 ml 三乙胺，将混合物在室温搅拌 15 分钟。过滤沉淀并用少量干燥 THF 洗。将滤液加到 19.1g(7.2mmol)的 14 中。该溶液浓缩至 100 ml。15 分钟后，用 500 ml 乙酸乙酯稀释，用 100 ml 水洗两次。有机相经硫酸镁干燥，过滤并浓缩。经闪式色谱后，获得 19.0g(97%)白色泡沫状环状磷酸酯衍生物。 TLC: 二氯甲烷/甲醇/33 % NH_3(100/7/1)，R_f=0.3. MS; $(M+2Li-H)^+$=2737; 计算值 $C_{161}H_{174}N_3O_{32}PSi$，M=2724.22 。将环状磷酸酯溶于 350 ml THF，加入 100 ml TBAF(1M 的 THF 溶液)。20 小时后，浓缩混合物，残余物用闪式色谱纯化。获得 18.1g(99%)的白色泡沫状的 15。TLC: 二氯甲烷/甲醇/33 % NH_3(100/7/1)，R_f=0.3 （与原料的展开条件相同），$(M+2Li-H)^+$=2622; 计算值 $C_{155}H_{162}N_3O_{32}P$，M=2609.96。

化合物 16 的合成

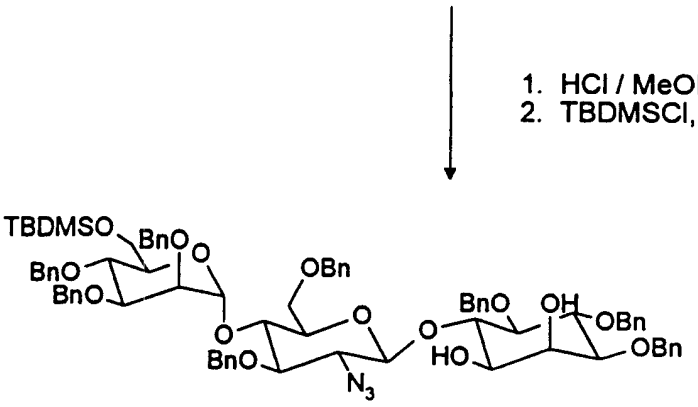
将 14g 亚磷酸用吡啶浓缩四次，然后加到 200ml 干燥吡啶中，在 10 ℃滴加新戊酰氯 16ml。使该反应溶液在室温放置 15 分钟。将 18.1g(6.9mmol)的 15 加到上述反应溶液中。1 小时后，用 200ml 甲苯和 150ml 二氯甲烷/甲醇/33%NH_3(30/10/3)。浓缩后，用甲苯将残余吡啶蒸除三次。将残余物悬浮在 200ml 二氯甲烷/甲醇(20:1)中。过滤不溶性成分并用 50ml 二氯甲烷/甲醇(20:1)洗。滤液浓缩并经闪式色谱纯化。获得 16.9(91%)的保护终产物。 TLC: 二氯甲烷/甲醇/33 % NH_3(100/7/1)，R_f=0.25 。 MS: $(M+3Li-2H)^+$=2691; 计算值 $C_{155}H_{163}N_3O_{34}P_2$，M=2673.94 。为脱保护，在-78 ℃下，将 600ml 氨冷凝。在其中溶入 4.7g(204mmol)钠。该溶液用 300ml 干燥 THF 稀释，然后在-78 ℃的反应温度下，缓慢滴加 16.9g(6.3mmol)保护的终产物的 100ml 干燥 THF 溶液，反应 15 分钟后（蓝色不必消失），用 10g 氯化铵小心地处理反应混合物。当蓝色消失时，该混合物小心地用 100ml 水和 300ml 甲醇稀释。使其融化，然后浓缩至约 150ml。该溶液用 2 1 二氯甲烷/甲醇/33%NH_3(3/3/1)稀释，上闪式硅胶柱(700ml 的硅胶)。先用 3 升二氯甲烷/甲醇/33%NH_3(3/3/2)，然后用 3 升(比率为 3/3.5/3)洗脱。如果混合物进行色谱，则用正丁醇/乙醇/水/33%NH_3(2/2/2/1)洗脱产物。获得 5.5g(78%)白色固体状的 16 。 TLC: (2/2/2/1)，R_f=0.4. MS: $(M+H)^+$=1116.5; 计算值

$C_{36}H_{63}NO_{34}P_2$, M=1115.83. ^{31}P-NMR(D_2O) σ=16.3ppm(环磷酸酯)和 7.9(H-磷酸酯)。


AcO
BnO
BnO
BnO
O
O
CCl3
NH
1
+
OBn
HO
BnO
O
OTBDMS
N3
2
TMS-Trf
3
1. TBAF, AcOH
2. Cl3CCN, K2CO3
4
1.
5
2. NaOMe
6

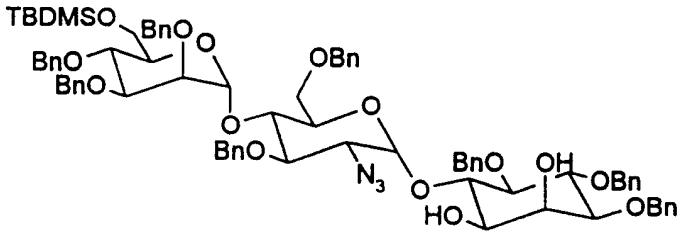


6

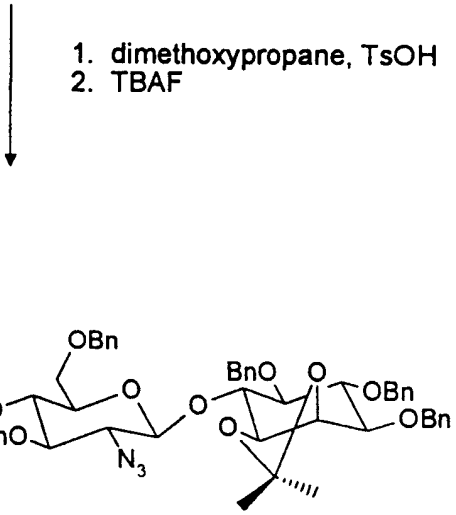


1. HCl / MeOH
2. TBDMSCl, imidazole

+

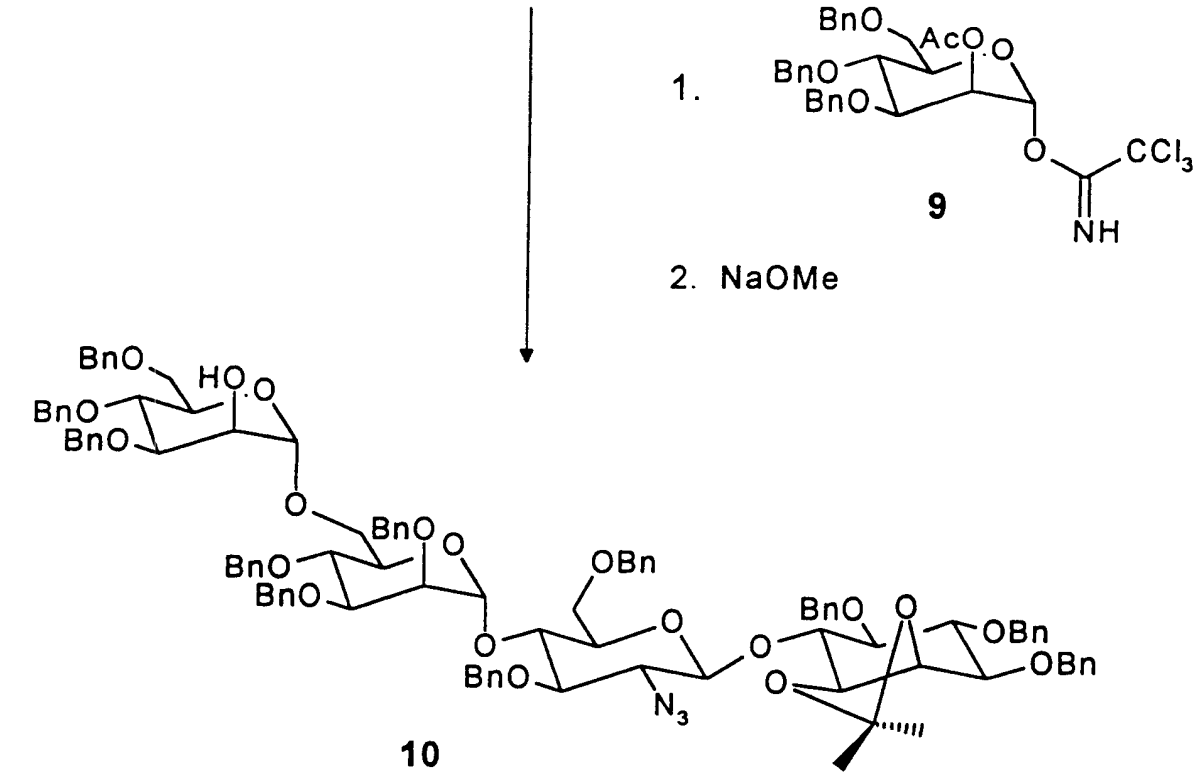


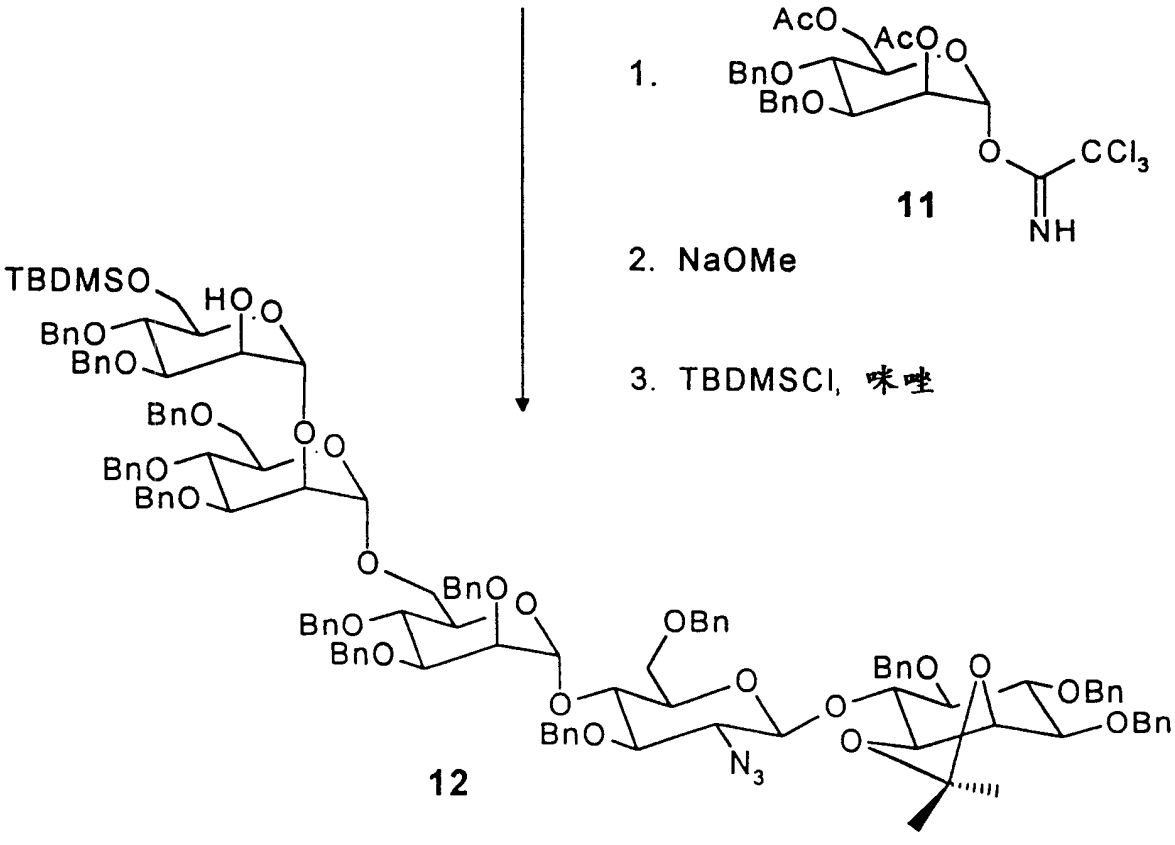
7

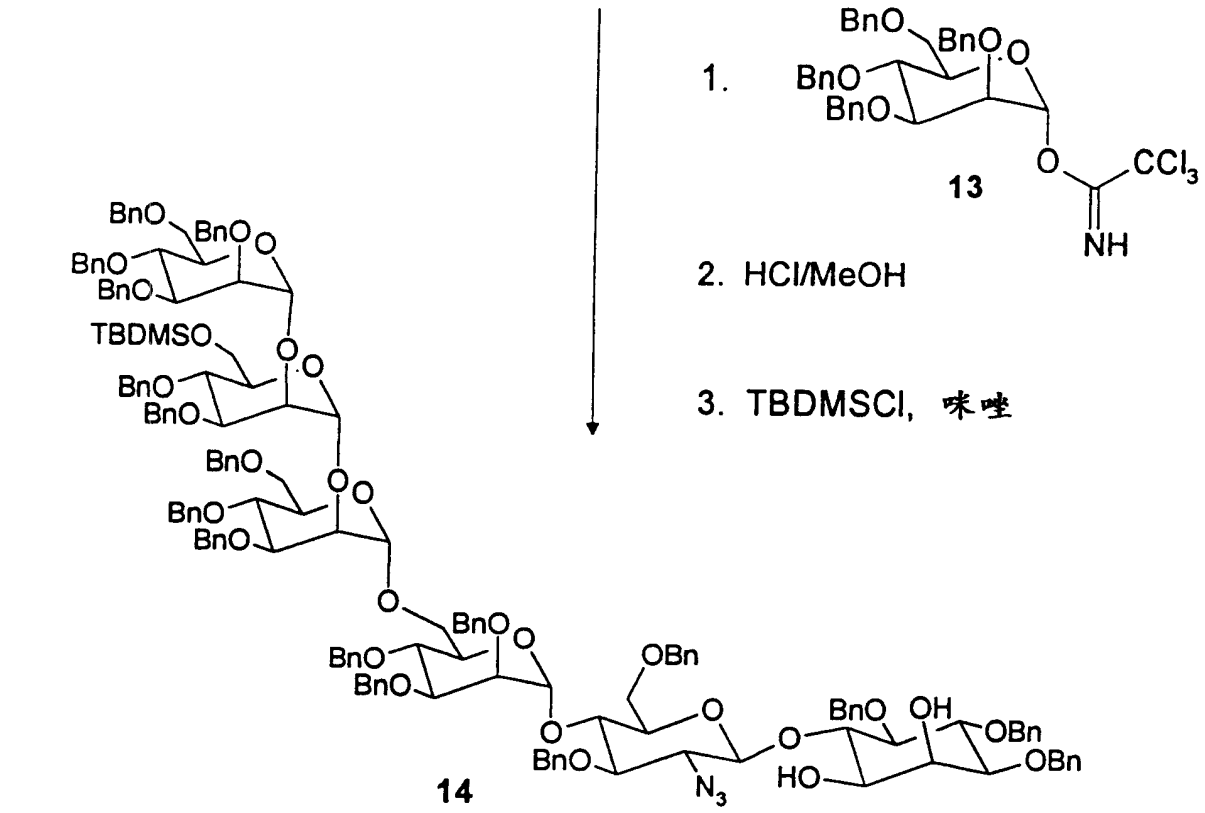


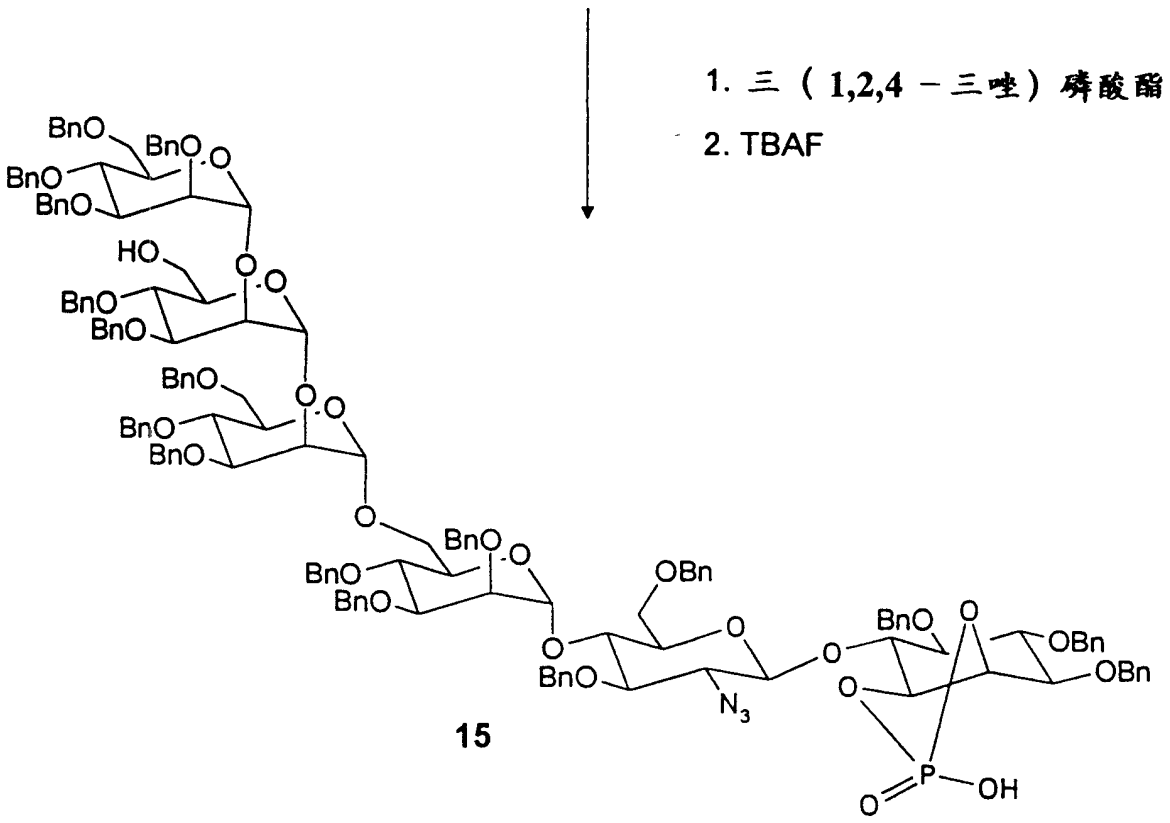
1. dimethoxypropane, TsOH
2. TBAF

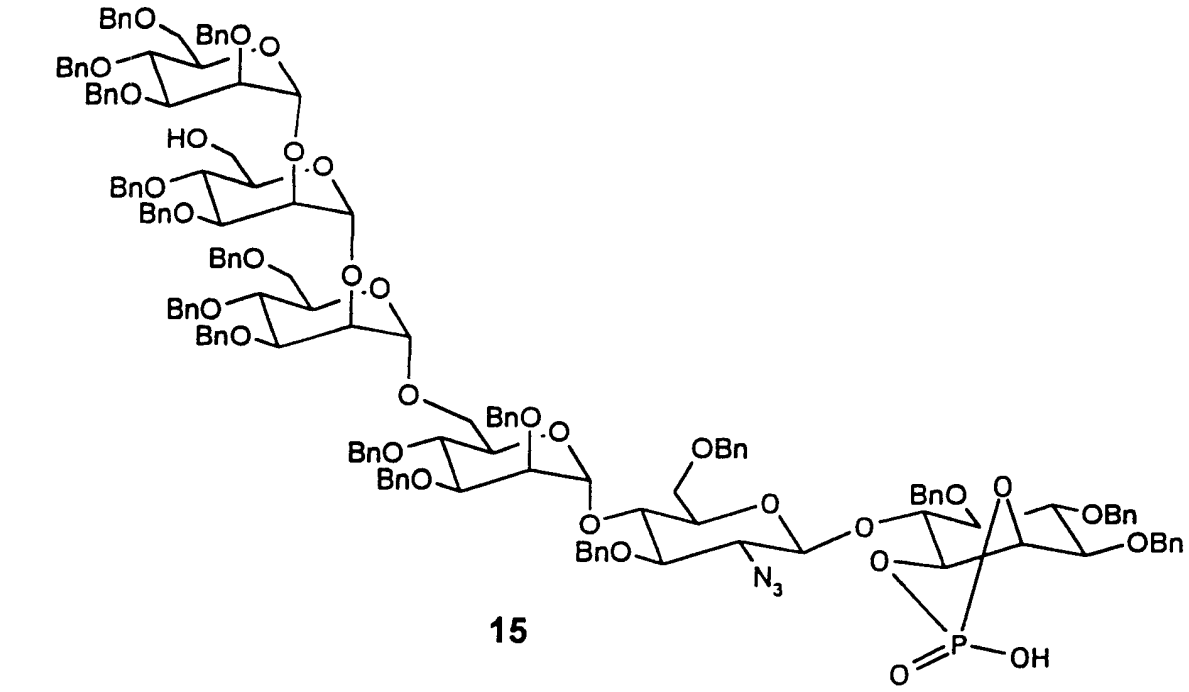
8


1.
9
2. NaOMe
10

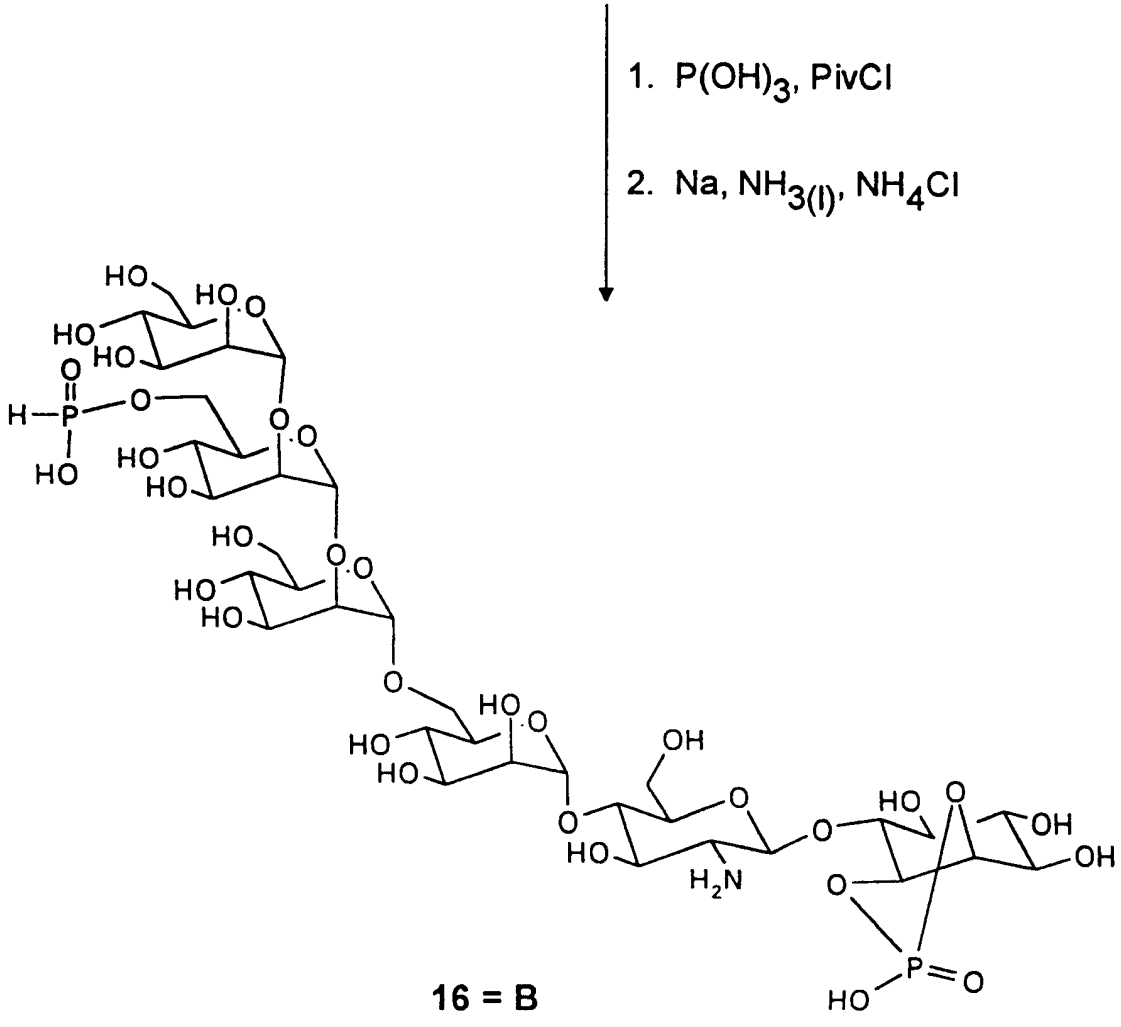

1.
11
2. NaOMe
3. TBDMSCl, 咪唑
12


1.
13
2. HCl/MeOH
3. TBDMSCl, 咪唑
14


1. 三（1,2,4－三唑）磷酸酯
2. TBAF
15



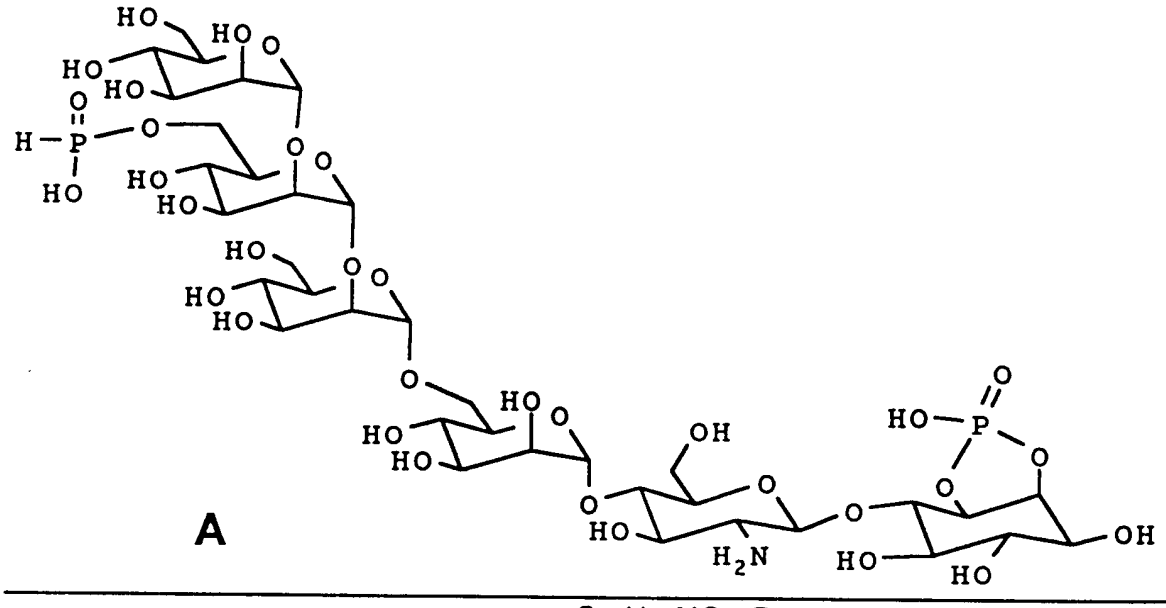
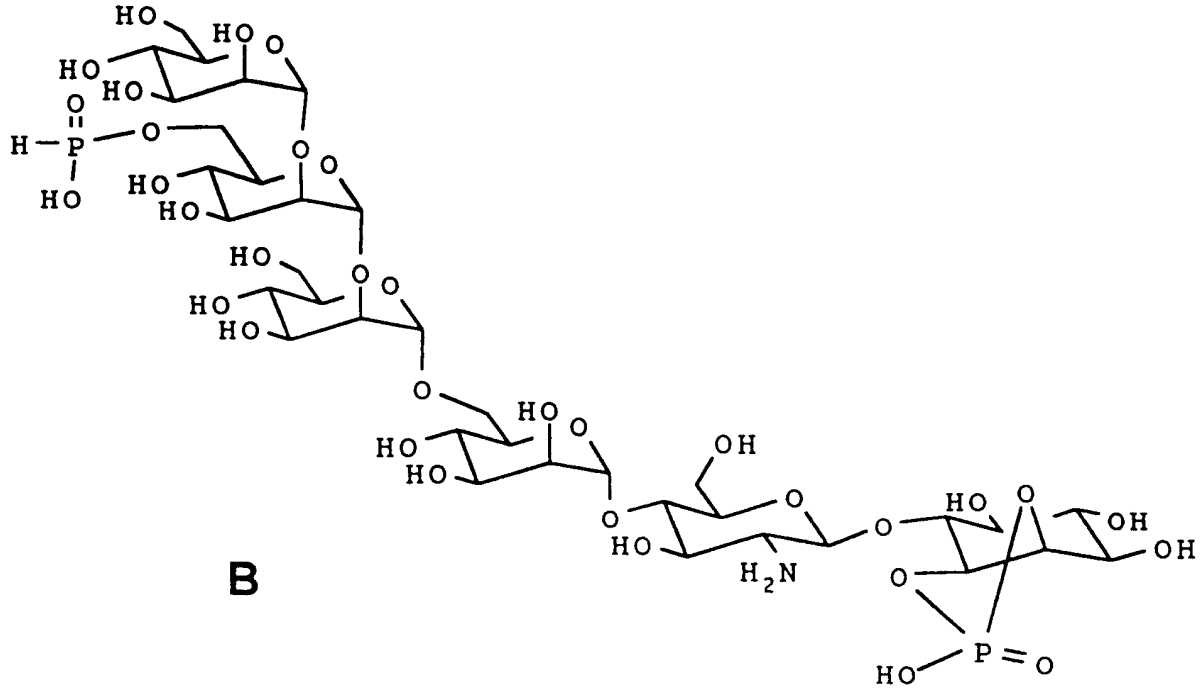
15



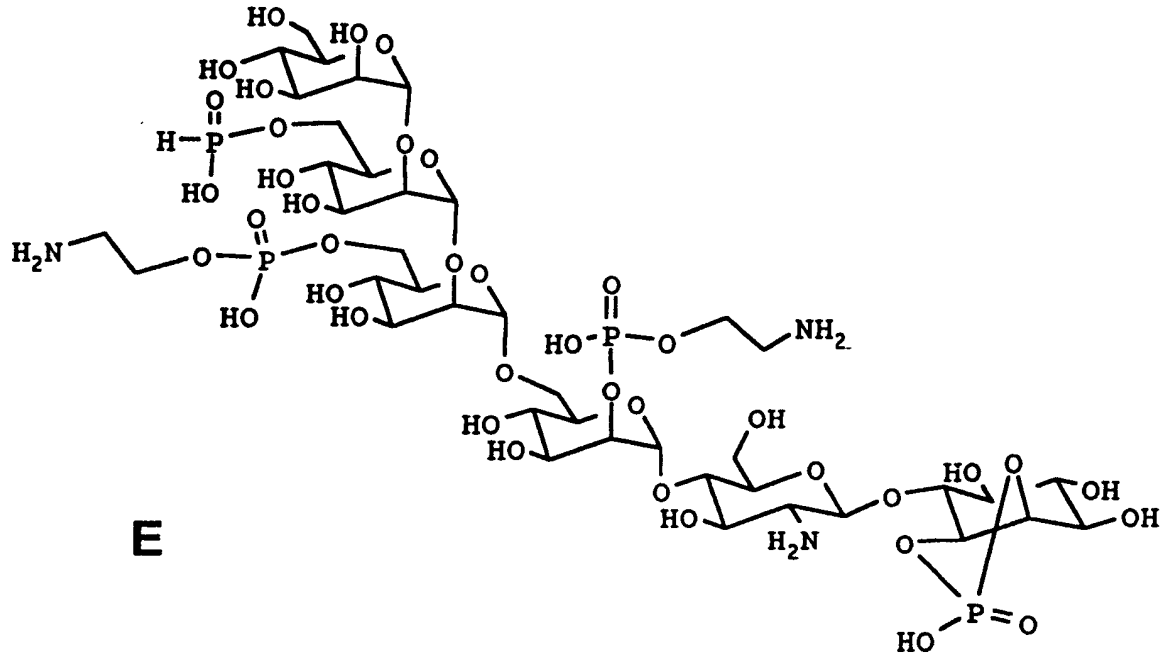
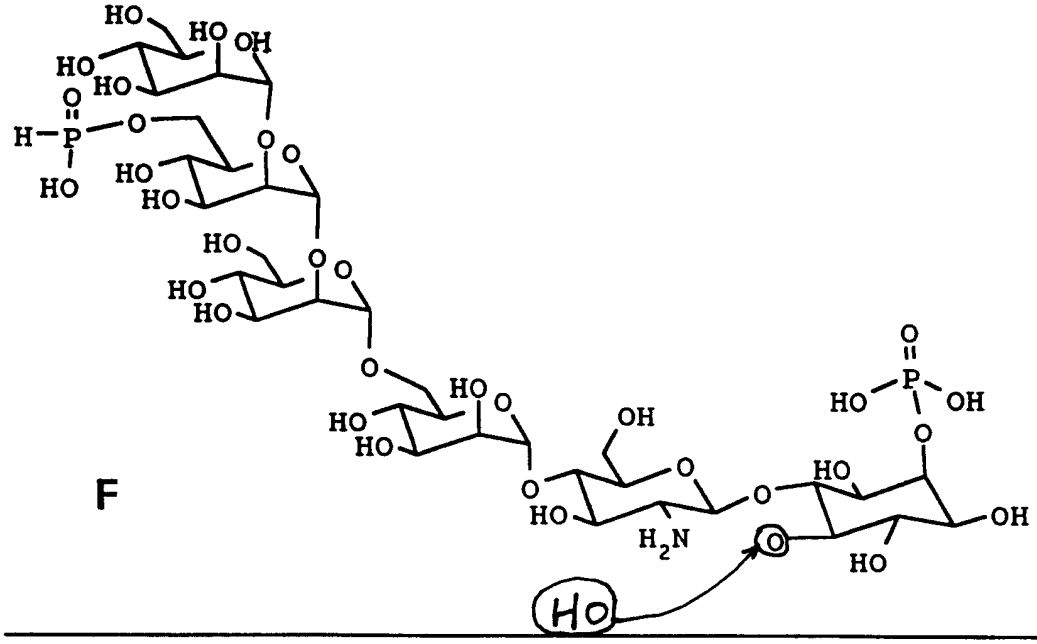
16 = B

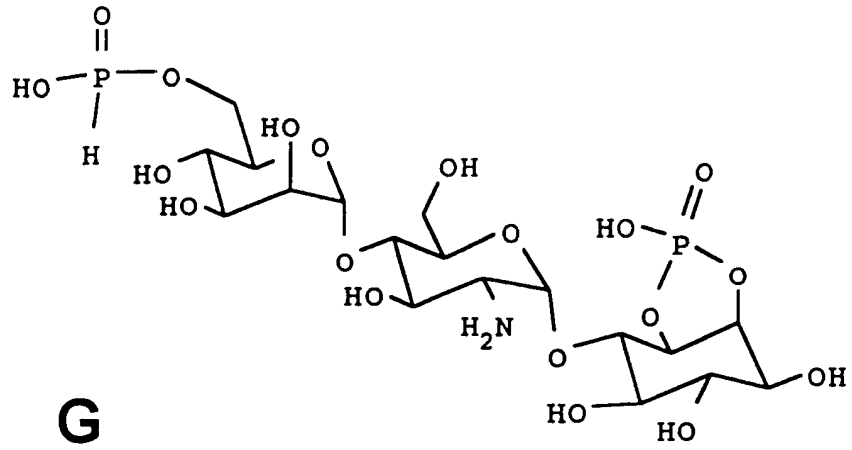
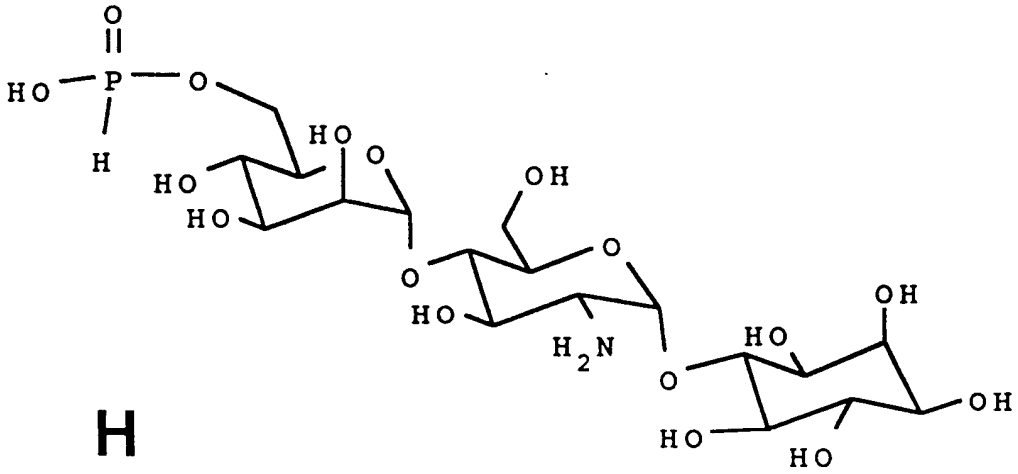
实施例 2：

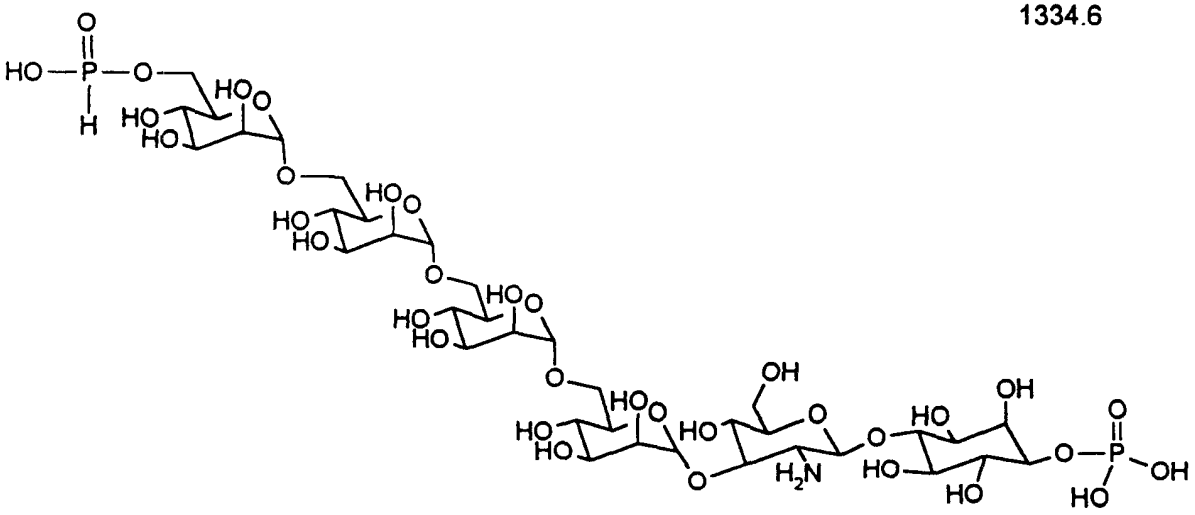
类似于实施例 1 的方法制备混合物 A、C、D、E、F、G、H 和 I。表 1 显示结构式、实验式和质谱。

化合物	实验式	质谱 $(M+H)^+$
A 	$C_{36}H_{63}NO_{34}P_2$	1116.5
B 	$C_{36}H_{63}NO_{34}P_2$	1116.5

化合物	实验式	质谱 $(M+H)^+$
C	$C_{36}H_{63}NO_{33}P_2S$	1132.7
D	$C_{36}H_{65}NO_{35}P_2$	1134.4

化合物	实验式	质谱(M+H)$^+$
E 	$C_{40}H_{75}N_3O_{40}P_4$	1362.8
F 	$C_{36}H_{65}NO_{35}P_2$	1134.4

化合物	实验式	质谱(M+H)$^+$
G 	$C_{18}H_{33}NO_{19}P_2$	630.3
H 	$C_{18}H_{34}NO_{17}P$	568.2

化合物	实验式	质谱(M+H)$^+$
		1334.6

实施例 3:

药物活性

借助由大鼠分离的脂肪细胞测定本发明式 I 化合物的生物活性。

由大鼠制备脂肪细胞的过程如下:

用胶原酶消化付睾的白色脂肪组织(Wistar 大鼠, 160 - 180g, 未禁食), 所得分离的脂肪细胞通过过滤出未消化的组织得以分离并用 Krebs-Ringer-Henseleit 缓冲液(KRH 缓冲液)将其悬浮洗涤数次。

A)脂肪形成

该试验测定葡萄糖向甲苯可溶性产物(甘油三酯、磷脂、脂肪酸)的胰岛素可刺激性转化, 该转化促进葡萄糖转运和甘油三酯(甘油-3-P 合成, 酯化)/磷脂/脂肪酸合成(包括胰岛素信号传递级联)。在试验中, 葡萄糖的浓度为 2.5mM, 酯化反应(不是包括葡萄糖转运的甘油-3-P 合成)是刺激脂肪形成的定速反应。

在胰岛素(10ng/ml)或本发明的式 I 化合物存在或不存在条件下, 将 200 微升(3 x 10^5 细胞/ml)KRH 缓冲液中的的大鼠脂肪细胞与 100 微升 D-[3-^{3}H]葡萄糖(25mM, 0.4μCi) 在 37 ℃培养 90 分钟(终体积 1ml)。通过加入甲苯可溶的闪烁合剂(10ml)使细胞破裂, 将脂质从水溶性产物和保温介质中分

离出来。分层后，无需除去水相即可直接用闪烁测定法测定结合于脂质产物中的放射性([^{3}H][dpm x 10^{-3}])。将该放射性值减去对照值（在相同条件下保温，但不加细胞）。至 120 分钟脂肪形成率都是线性的。最大刺激因子（与胰岛素保温的结果和未与胰岛素保温的结果的比率）定为 100 %。"%Ins_{max}"下的百分数是以此定义的最大刺激因子的部分。EC_{50}表示通过观察各种式 I 化合物获得的 50 % 最大刺激时的式 I 化合物的浓度。

B) 葡萄糖转运

将 100 微升 KRH 缓冲液中的大鼠脂肪细胞(滴度 5 x 10^5 细胞/ml)与胰岛素或本发明的式 I 化合物在 37 ℃轻轻振摇下培养 15 分钟。加入 15 微升 2-[^{3}H]-脱氧葡萄糖(0.3mM, 0.2μCi)后，在室温继续培养。在一定时间(0-20 分钟)后，取出 100 微升该试验液并将其转入一反应容器中（有 400 微升内容物），该容器中有起初加入的 250 微升邻苯二甲酸二壬酯。离心(15000 x g, 1 分钟)后，在油层下通过切取油层水平管(tube)从培养基的油层分离出细胞，然后转移到闪烁容器中。加入 5ml 水溶性闪烁液体后，测定放射性。将总的细胞相关的放射性减去对照值（在葡萄糖转运抑制剂细胞松弛素 B 存在下培养）进行[^{3}H]-脱氧葡萄糖校正，[^{3}H]-脱氧葡萄糖是被动释放到细胞中的并存在于细胞间隙中。直至 15 分钟起初的（刺激的）葡萄糖转运率都是线性的。最大刺激因数是有胰岛素的培养结果与没有胰岛素的培养结果的比率，设为 100 %。

术语"%Ins_{max}"和"EC_{50}"是在 A) 脂肪形成下定义的。

表 2

分子式	化合物	脂肪形成 %Ins_{max} EC_{50} [μM]		葡萄糖转运 %Ins_{max} EC_{50} [μM]	
HO-PO(H)O-6Manα1(Manα1-2)-	A	59	7	28	8

2Manα1-6Manα1-4GluNβ1-6 (L) 肌醇-1, 2 (环) -磷酸酯					
HO-PO (H) O-6Manα1 (Manα1-2) -2Manα1-6Manα1-4GluNβ1-6 (D) 肌醇-1, 2 (环) -磷酸酯	B	77	8.2	41	8.1
HO-PO (H) O-6Manα1 (Manα1-2) -2Manα1-6Manα1-4GluNβ1-6 (D) 肌醇-1, 2 (环) -硫代磷酸酯	C	64	7	29	10
HO-PO (H) O-6Manα1 (Manα1-2) -2Manα1-6Manα1-3GluNβ1-6 (L) 肌醇-3-磷酸酯	D	33	20	18	18
HO-PO (H) O-6Manα1 (Manα1-2) -2Manα1 (6-EtNP) -6Manα1 (2-EtNP) -4GluNβ1-6 (D) 肌醇-1, 2 (环) -磷酸酯	E	48	60	34	30
HO-PO (H) O-6Manα1 (Manα1-2) -2Manα1-6Manα1-4GluNα1-6 (L) 肌醇-2-磷酸酯	F	53	15	26	25
HO-PO (H) O-6Manα-4GluNα1-6 (L) 肌醇-1, 2 (环) -磷酸酯	G	25	15	9	15
HO-PO (H) O-6Manα1-4GluNα1-6 (L) 肌醇	H	15	25	2	10
HO-PO (H) O-6Manα1-6-Manα1-6Manα1-6Manα1-3GluNβ1-6 (L) 肌醇-3-磷酸酯	I	18	20	14	50