PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
308 144
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:

C07K 5/037	(2006.01)
C07C 323/60	(2006.01)
A61K 38/06	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01)
C07C 323/64	(2006.01)
A61K 31/10	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-319**
(22) Přihlášeno: **09.05.2014**
(40) Zveřejněno: **18.11.2015**
(Věstník č. 46/2015)
(47) Uděleno: **11.12.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.01.2020**
(Věstník č. 4/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
T. MIRON ET AL: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 1463, 2000, 20-30, XP000926152; A. Rabinkov et al.: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA - Molecular Cell Research 1499, 2000, 144–153; Zhang Guodong et al: Cysteine and glutathione mixed-disulfide conjugates of thiosulfinates: chemical synthesis and biological activities 2010 Journal of agricultural and food chemistry 58, 1564 – 1571.
WO 0136450; JP H0782144.

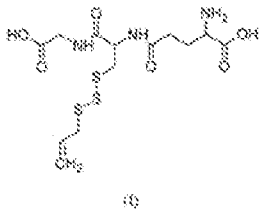
(73) Majitel patentu:
Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, CZ

(72) Původce:
MUDr. Radomír Hyšpler, Ph.D., Hradec Králové 11, CZ
RNDr. Alena Tichá, Ph.D., Hradec Králové 7, CZ
prof. MUDr. Zdeněk Zadák, CSc., Hradec Králové 9, CZ
Ing. Miloš Hroch, Ph.D., Hradec Králové 9, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
Způsob přípravy S-allylthioglutathionu, popřípadě ve směsi s S-allyldithioglutathionem, směs S-allylthioglutathionu s S-allyldithioglutathionem a S-allyldithioglutathion

(57) Anotace:
Postup přípravy S-allylthioglutathionu, kdy se redukovaný glutathion podrobí reakci s diallyldisulfidem v dimethylsulfoxidu za vzniku S-allylthioglutathionu. Dále řešení poskytuje variantu tohoto postupu, kdy se nejprve podrobí reakci se sulfanem oxidovaný glutathion za vzniku směsi redukovaného glutathionu a thioglutationu, a tato směs je pak podrobena reakci s dimethylallyldisulfidem v dimethylsulfoxidu za vzniku směsi S-allylthioglutathionu s S-allyldithioglutathionem. Taktéž je předmětem řešení farmaceutická směs sestávající z S-allylthioglutathionu a S-allyldithioglutathionu a dále S-allyldithioglutathion vzorce I.



CZ 308144 B6

Způsob přípravy S–allylthioglutathionu, popřípadě ve směsi s S–allyldithioglutathionem, směs S–allylthioglutathionu s S–allyldithioglutathionem a S–allyldithioglutathion

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nového způsobu přípravy S–allylthioglutathionu, popřípadě ve směsi s allyldithioglutathionem, a rovněž se týká nové směsi S–allylthioglutathionu s S–allyldithioglutathionem a nové sloučeniny S–allyldithioglutathionu.

Dosavadní stav techniky

S–allylthioglutathion (nazývaný též S–allylmerkaptoglutathion) je používán v přípravcích pro léčbu aterosklerózy, onemocnění koronárních cév, trombózy, zvýšených hladin cholesterolu, vysokého krevního tlaku, Alzheimerovy choroby, glaukomu, rakoviny a zánětlivých onemocnění.

Je známo, že glutathion reaguje s allicinem (diallylthiosulfmátem) *in vivo* za vzniku S–allylthioglutathionu, a zopakováním této reakce in vitro s allicinem nebo diallyldisulfidem v alkoholu byl S–allylthioglutathion poprvé uměle připraven (WO 01/36450). V dokumentu WO 2011/044113 byla popsána příprava S–allylthioglutathionu reakcí redukovaného glutathionu s příslušným thiosulfinátem (allicinem) za laboratorní teploty ve vodě. Miron et al., Eur J Med Chem 45 (2010) 1912–1918 popisuje reakce redukovaného glutathionu s S–allylthio–6–merkaptopurinem, S–allylthio–6–merkaptopurin ribosidem, nebo S–allylthiocaptoprilem za vzniku S–allylthioglutathionu.

Dosud známé postupy přípravy S–allylthioglutathionu jsou složité, často vícekrokové, a vycházejí z poměrně drahých či špatně přečistitelných vstupních surovin.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje zlepšený způsob přípravy S–allylthioglutathionu, jehož podstata spočívá v tom, že se redukovaný glutathion (GSH) podrobí reakci s diallyldisulfidem (DADS) v dimethylsulfoxidu (DMSO).

S výhodou se pak po proběhnutí reakce produkt vysráží acetonem.

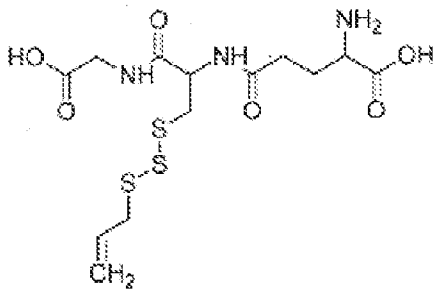
Ve výhodném provedení se reakční směs zahřeje na teplotu v rozmezí 70 až 90 °C.

V dalším výhodném provedení poskytuje předkládaný vynález způsob přípravy S–allylthioglutathionu, kde vzniká S–allylthioglutathion ve směsi s S–allyldithioglutationem, jehož podstata spočívá v tom, že se oxidovaný glutathion (GSSG) podrobí reakci se sulfanem za vzniku směsi redukovaného glutathionu (GSH) a thioglutathionu (GSSH). Tato směs je pak podrobena reakci s diallyldisulfidem v organickém rozpouštědle podle předkládaného vynálezu za vzniku směsi S–allylthioglutathionu s S–allyldithioglutathionem.

Ve výhodném provedení se reakce se sulfanem provádí tak, že se oxidovaný glutathion vystaví působení sulfidu alkalického kovu, s výhodou sulfidu sodného, a ekvimolárního množství anorganické kyseliny, s výhodou kyseliny chlorovodíkové.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále směs S–allylthioglutathionu a S–allyldithioglutathionu. Tato směs obsahuje více organicky vázané síry než samotný S–allylthioglutathion, což může být přínosné v některých klinických situacích. Ve výhodném provedení je tato směs v podstatě ekvimolární.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále nová sloučenina S–allyldithioglutathion vzorce I



(I)

Postup podle předkládaného vynálezu vychází z levnějších surovin, je jednodušší, a tedy ve výsledku úspornější. Navíc ve výhodném provedení vynálezu je připravena nová sloučenina S–allyldithioglutathion a tato látka, stejně jako připravená směs ji obsahující, je nová a dosud neznámá.

Objasnění výkresů

Obr. 1 ukazuje chromatogram produktu z příkladu 1.

Obr. 2 ukazuje hmotnostní spektrum majoritního píku chromatogramu z obr. 1.

Obr. 3 ukazuje chromatogram produktu z příkladu 2.

Obr. 4 ukazuje hmotnostní spektrum píku o retenčním čase 2,8 minuty chromatogramu z obr. 3.

Obr. 5 ukazuje hmotnostní spektrum píku o retenčním čase 6,3 minuty chromatogramu z obr. 3.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Příprava S–allylthioglutathionu

10 g redukovaného glutathionu bylo rozpuštěno ve 33 ml dimethylsulfoxidu (DMSO) s 3,3 ml diallyldisulfidu (DADS). Reakční směs byla zahřívána na teplotu 85 °C do rozpuštění glutathionu. Do reakční směsi byla přidána redestilovaná voda (17 ml) a produkt byl následně vysrážen přidáním acetonu (250 ml). Reakční směs byla zcentrifugována, supernatant byl odstraněn, precipitát dvakrát promyt čistým acetonem a vysušen za sníženého tlaku (membránový koncentrátor, max. tlak 1000 Pa, což odpovídá 10 mbar) při teplotě 60 °C. Výtěžek reakce byl 11,8 g (95 %).

Produkt byl analyzován metodou LC–MS. Chromatogram produktu ukázal jeden prominentní pík v retenčním čase 2,8 minuty (obr. 1). Hmotnostní spektrum tohoto píku vykazuje hlavní pík při m/z 379,97 (obr. 2), což odpovídá protonované molekule $[M+H^+]$ S–allylthioglutathionu.

Příklad 2: Příprava směsi S–allylthioglutathionu a S–allyldithioglutathionu

1,2 g oxidovaného glutathionu bylo spolu s 8 ml DMSO, 580 mg $Na_2S.9H_2O$ a 800 µl 6M HCl bylo mícháno při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. K reakční směsi bylo přidáno 400 µl

diallyldisulfidu (DADS) a směs byla kontinuálně míchána za laboratorní teploty po dobu jedné hodiny.

K reakční směsi bylo přidáno 8 ml vody, směs byla promíchána a vysrážena v 80 ml acetonu. Směs byla zcentrifugována, supernatant odstraněn, precipitát dvakrát promyt čistým acetonem a vysušen za sníženého tlaku (membránový koncentrátor, max. tlak 1000 Pa, což odpovídá 10 mbar) při 60 °C.

Produkt byl analyzován metodou LC–MS. Chromatogram produktu ukázal dva majoritní píky v retenčním čase 2,8 minuty a 6,3 minuty (obr. 3). Hmotnostní spektrum píku o retenčním čase 2,8 minuty vykazuje hlavní pík při m/z 380,0 (obr. 4), což odpovídá protonované molekule [$M+H^+$] S–allylthioglutathionu. Hmotnostní spektrum píku o retenčním čase 6,3 minuty vykazuje hlavní pík při m/z 412,0 (obr. 5), což odpovídá protonované molekule [$M+H^+$] S–allyldithioglutathionu.

LC–MS měření byla prováděna hmotnostním detektorem typu iontová past LCQ Fleet (Thermofisher, San Jose, CA, USA), vybaveným elektrosprejem pracujícím v pozitivním módu.

Chromatografické podmínky

Kolona:	Phenomenex KINETEX C18 (150x3 mm, 2,6 μm)
Průtok:	0,6 mL/min
Teplota:	40 °C
Mobilní fáze A:	mravenčan amonný (5mM, pH=3,8)
Mobilní fáze B:	acetonitril
Gradient:	0 až 30 min 10 až 40% MFB
Nástřik:	0,5 μL

Vzorek (cca 2 mg) byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze A.

Nastavení hmotnostního detektoru

Ionizace:	ESI+
Napětí elektrospreje:	4 kV
Napětí v kapiláře:	20 V
Teplota v kapiláře:	260 °C
Průtok zmlžovacího plynu:	40 jednotek
Průtok pomocného plynu:	10 jednotek

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy S–allylthioglutathionu, **vyznačený tím**, že se redukovaný glutathion podrobí reakci s diallyldisulfidem v dimethylsulfoxidu za vzniku S–allylthioglutathionu.

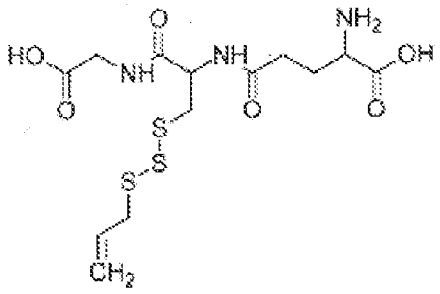
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že se reakční směs zahřeje na teplotu v rozmezí 70 až 90 °C.

3. Způsob přípravy S–allylthioglutathionu podle nároku 1 nebo 2, kde vzniká S–allylthioglutathion ve směsi s S–allyldithioglutationem, **vyznačený tím**, že se nejprve oxidovaný glutathion podrobí reakci se sulfanem za vzniku směsi redukovaného glutathionu a thioglutationu, a tato směs je pak podrobena reakci s diallyldisulfidem v organickém rozpouštědle podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 za vzniku směsi S–allylthioglutathionu s S–allyldithioglutationem.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačený tím**, že se reakce se sulfanem provádí tak, že se oxidovaný glutathion vystaví působení sulfidu alkalického kovu a ekvimolárního množství anorganické kyseliny.

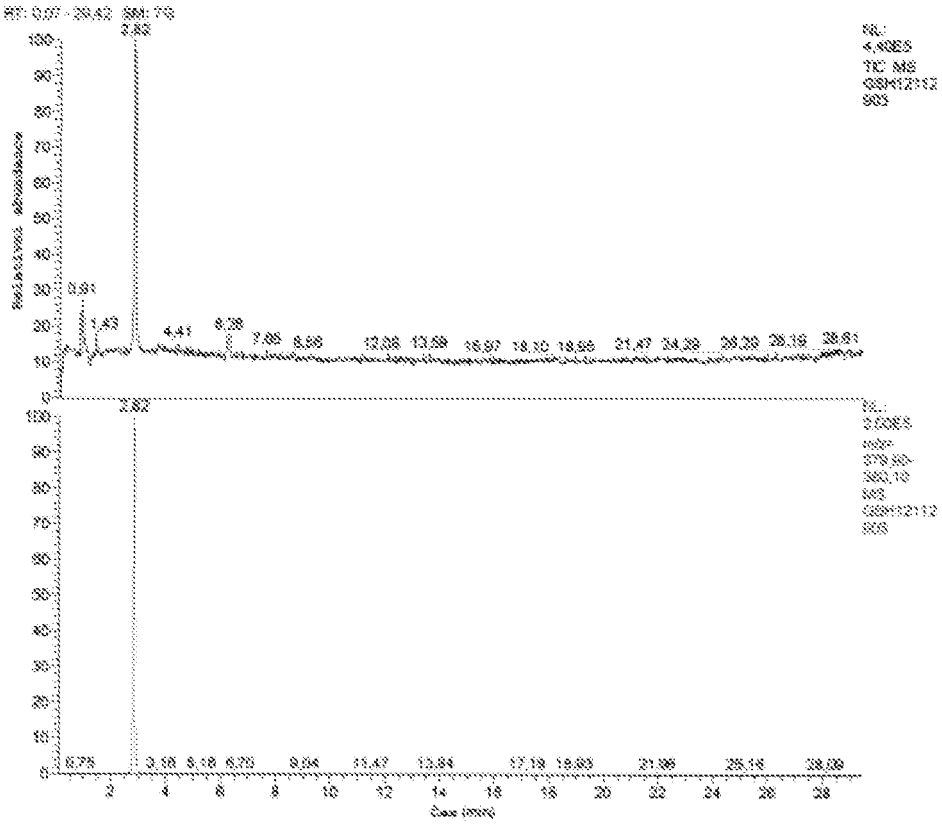
5. Farmaceutická směs, **vyznačená tím**, že sestává z S–allylthioglutathionu a S–allyldithioglutationu.

6. S–allyldithioglutation vzorce I:

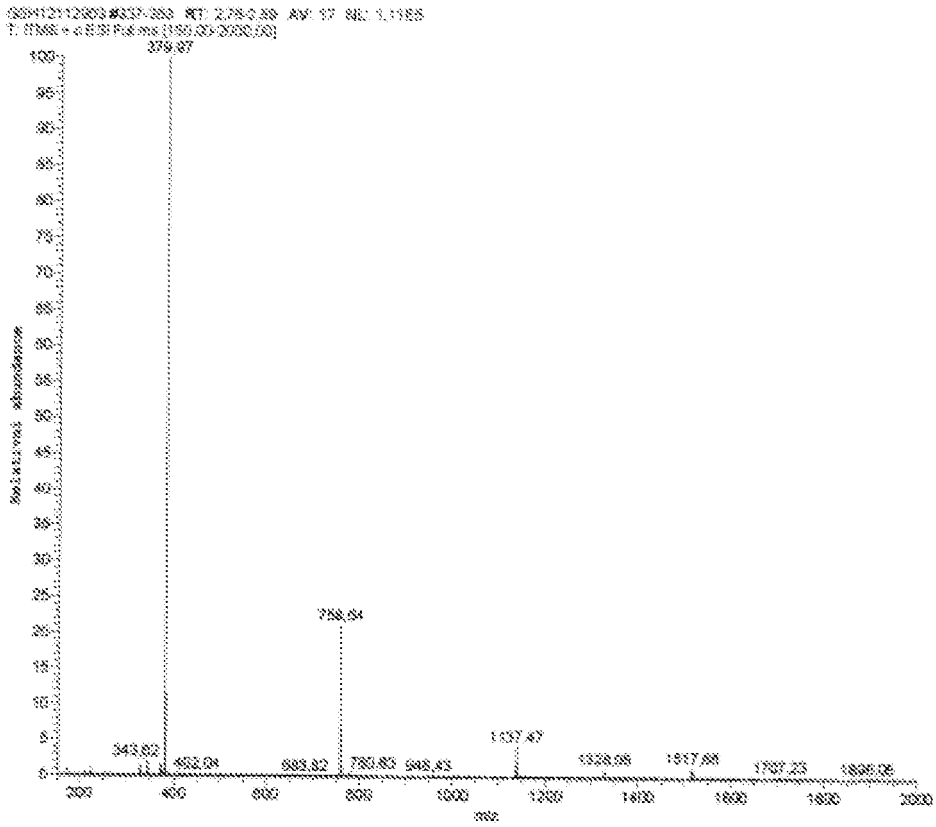


(I)

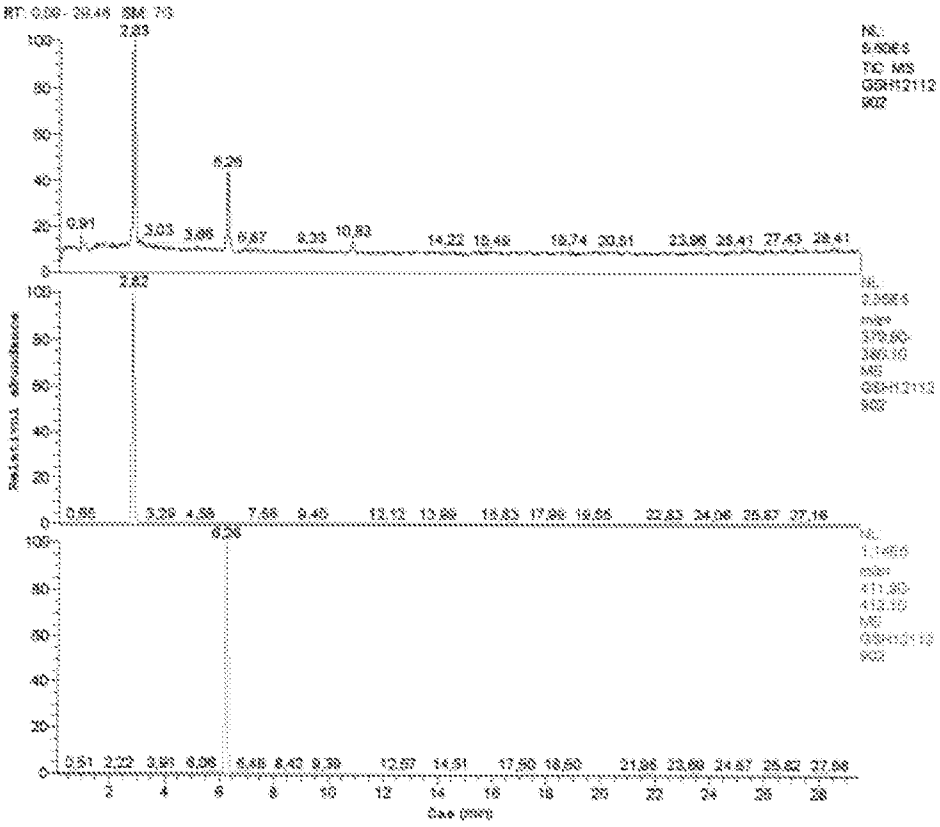
5 výkresů



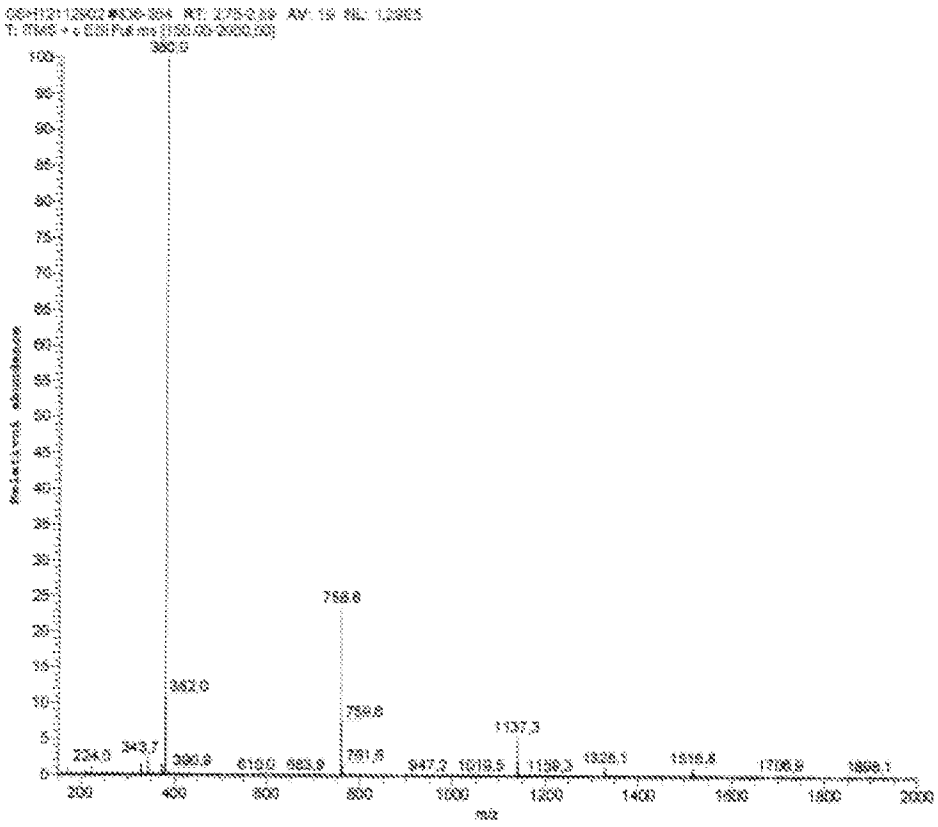
Obr. 1


379.67
758.64
1037.47
343.62
492.09
693.82
780.83
948.43
1338.08
1517.68
1707.23
1896.78
m/z

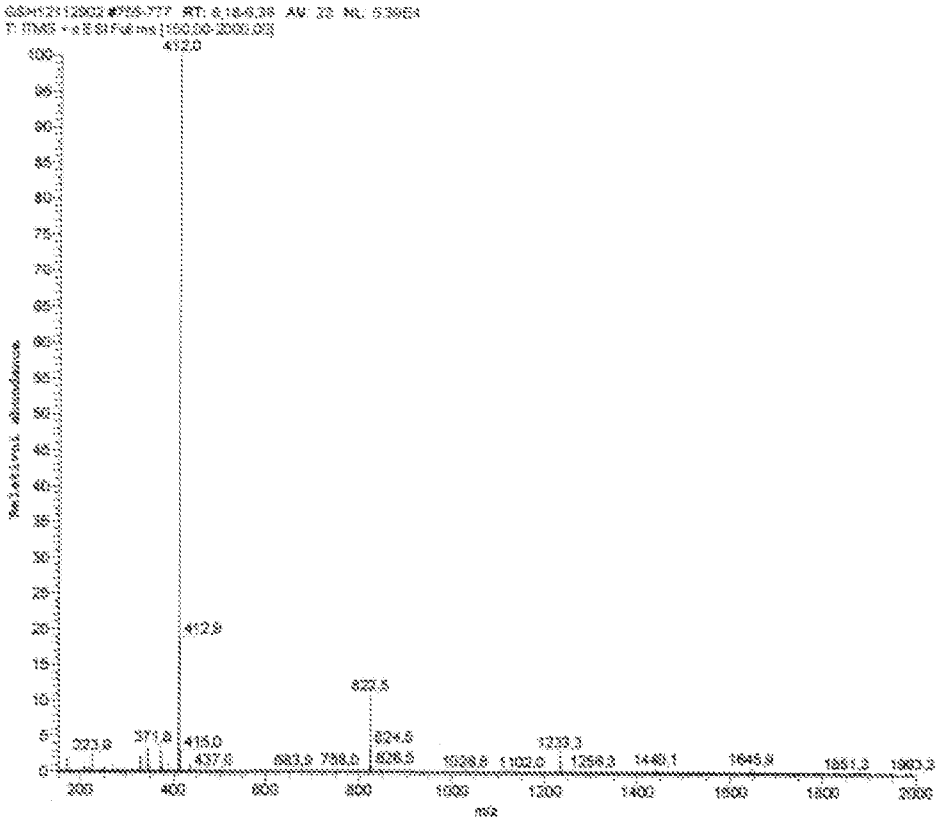
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4


412.0
412.9
822.5
824.6
826.5
221.9
371.9
416.0
437.6
883.9
788.0
1228.8
1102.0
1238.3
1358.3
1440.1
1645.9
1851.3
1983.3
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
m/z

Obr. 5