

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

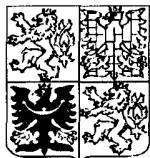
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

4075-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26. 06. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.06.95, 29.06.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/000533, 95/002784**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 07. 98**
(Věstník č. 7/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/11032**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/01335**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K	31/35
A 61 K	31/70
A 61 K	31/445
C 07 D	309/10
C 07 D	405/14
C 07 H	15/00

(71) Přihlášovatel:

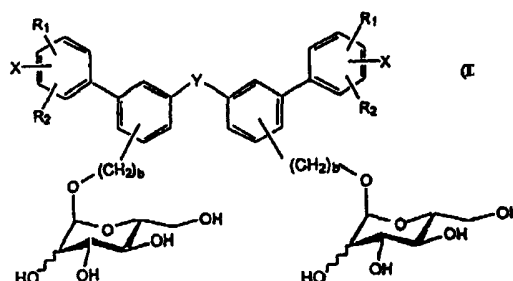
TEXAS BIOTECHNOLOGY CORPORATION,
Houston, TX, US;

(72) Původce:

Kogan Timothy P., Sugarland, TX, US;
Dupre Brian, Houston, TX, US;
Scott Ian L., Houston, TX, US;
Bui Huong, Pearland, TX, US;
Wheeler Kathy L., Nocona, TX, US;
Keller Karin M., Houston, TX, US;
Kassir Jamal M., Houston, TX, US;

(74) Zástupce:

Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou
12, Praha 7, 17000;

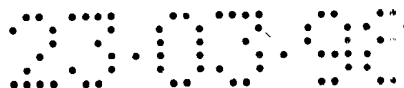


(54) Název přihlášky vynálezu:

Di- a trivalentní malé molekuly selektinových inhibitorů

(57) Anotace:

Sloučeniny podle vzorce /II/, kde význam jednotlivých symbolů je uveden v popisu, inhibující vazbu E-selektinu, P-selektinu nebo L-selektinu k sialyl-Lewis^x a sialyl-Lewis^a přítomným na povrchu určitých bílých krvinek. Látky mohou být součástí farmaceuticky účinných kompozic, využitelných při terapii chorob léčených inhibicí selektinové vazby k sialyl-Lewis^x.



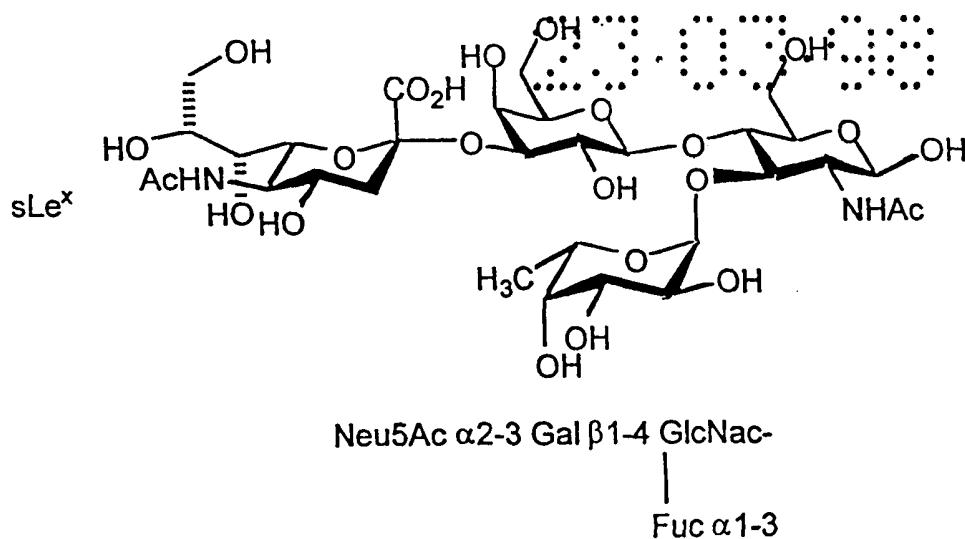
Di- a trivalentní malé molekuly selektinových inhibitorů

Oblast techniky

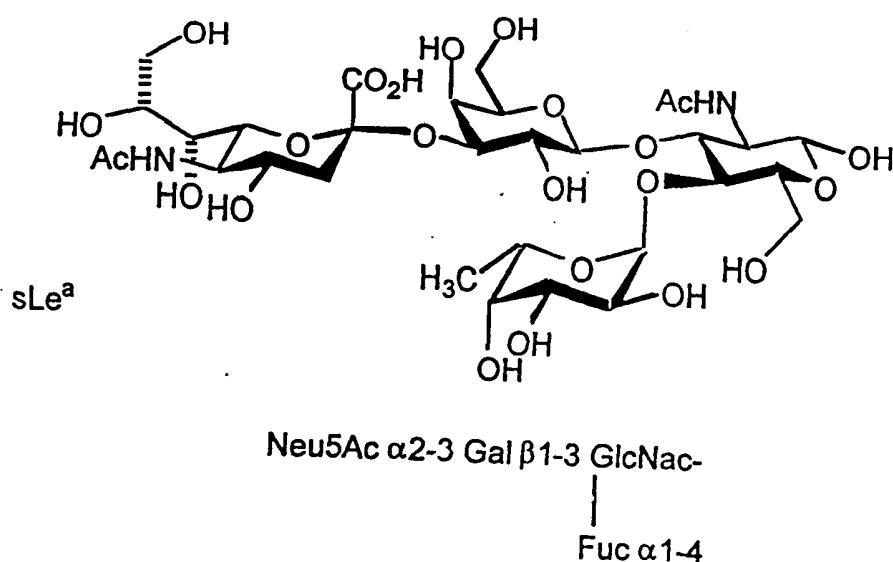
Předložený vynález se týká sloučenin, které inhibují vazbu E-selektinu, P-selektinu nebo L-selektinu k sialyl-Lewis^x a sialyl-Lewis^a a způsobů inhibice vazby E-selektinu, P-selektinu nebo L-selektinu k sialyl-Lewis^x nebo sialyl-Lewis^a za použití uvedených sloučenin. Předložený vynález se také týká farmaceuticky účinných kompozic, obsahujících sloučeniny, které inhibují vazbu E, P nebo L-selektinu k sialyl-Lewis^x nebo sialyl-Lewis^a.

Dosavadní stav techniky

E-selektin, který byl také nazván ELAM-1 pro endotheliální leukocytovou adhezi molekuly-1 a LECAM-2 pro lektinovou adhezi molekuly, je glykoprotein, který se nachází na povrchu endotheliálních buněk, buněk, které vystýlají vnitřní stěnu kapilár. E-selektin rozpoznává a váže se ke karbohydrátu sialyl-Lewis^x (sLe^x), který je přítomen na povrchu určitých bílých krvinek. E-selektin napomáhá bílým krvinkám rozpoznávat a adherovat ke kapilární stěně v plochách, kde tkáň, obklopující kapiláru byla infikována nebo poškozena. E-selektin je jedním ze tří nyní známých selektinů. Další dva jsou L-selektin a P-selektin. P-selektin je exprivován v zaníceném endotheliu a destičkách a má větší strukturní podobnost k E-selektinu a může také rozpoznávat sialyl-Lewis^x. L-selektin je exprivován na leukocytech a také má větší strukturní podobnost k P- a E-selektinu. Struktura sialyl-Lewis^x a sialyl-Lewis^a (sLe^a) je znázorněna vzorci I_a a I_b dále:



Ia



Ib

Jestliže tkáň byla napadena mikroorganismem nebo byla poškozena, bílé krvinky, nazývané také leukocyty, hrají hlavní roli v zánětlivé odezvě. Jeden z nejdůležitějších aspektů zánětlivé odezvy zahrnuje příhodu buněčné adheze. Obecně jsou bílé krvinky nalézány v krevním oběhu. Nicméně jestliže je tkáň infikována nebo poškozena, musí být bílé krvinky schopny rozpoznávat napadenou nebo poškozenou tkáň a být schopny se vázat ke stěně kapiláry blízko poškozené tkáně a difundovat kapilárou do postižené tkáně. E-selektin napomáhá dvěma



jednotlivým typům bílých krvinek rozpoznávat postižená místa a vázat se ke kapilární stěně tak, že tyto bílé krvinky mohou difundovat do postižené tkáně.

Existují tři hlavní typy bílých krvinek: granulocyty, monocyty a lymfocyty. Z těchto kategorií E-selektin rozpoznává sLe^x přítomný jako glykoprotein nebo glykolipid na povrchu monocytů a neutrofilů. Neutrofily jsou podtřídou granulocytů, které pohlcují a rozkládají malé organismy, zejména bakterie. Monocyty, po opuštění krevního proudu stěnou kapiláry, zrají na makrofágy, které pohlcují a štěpí invadující mikroorganismy, cizí tělesa a stárnoucí buňky.

Monocyty a neutrofily jsou schopny rozpoznávat místo, kde byla tkáň poškozena, vazbou k E-selektinu, který je produkován na povrchu endotheliálních buněk, vystýlajících kapiláry, jestliže tkáň, obklopující kapiláru byla infikována nebo poškozena. Typicky, produkce E-selektinu a P-selektinu je zvýšena, jestliže je tkáň sousedící s kapilárou poškozena. P-selektin je přítomen v podstatě v zásobních granulích, ze kterých může být rychle mobilizován k buněčnému povrchu po té, co endothelium bylo aktivováno. Naopak E-selektin vyžaduje *de novo* RNA a proteinovou syntézu a píkové exprese se dosáhne asi 4 až 6 hodin po aktivaci a klesá na základní hladiny po asi 24 až 48 hodinách. Bílé krvinky rozpoznávají postižené plochy, protože sLe^x skupiny přítomné na povrchu bílých krvinek se vážou k E-selektinu a P-selektinu. Tato vazba zpomaluje rychlost cirkulace bílých krvinek v krevním proudu, protože působí rolování leukocytů podél aktivovaného endothelia před integrinem zprostředkovaným připojením a migrací a napomáhá lokalizovat bílé krvinky v plochách poškození nebo infekce.

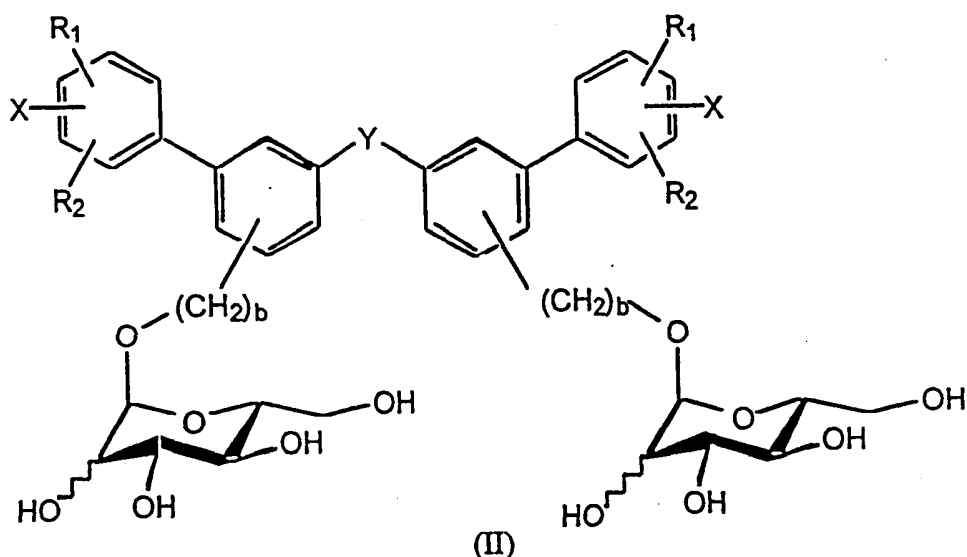
23.03.98

Zatímco migrace bílých krvinek na místo poškození napomáhá potírání infekce a rozložení cizího materiálu, akumulace přebytečného počtu bílých krvinek může způsobit rozsáhlé poškození tkáně. Sloučeniny schopné blokovat tento proces mohou proto být přínosem jako terapeutická činidla. Bylo by tedy vhodné vyvinout inhibitory, které by mohly bránit inhibici vazby bílých krvinek k E-selektinu nebo P-selektinu. Například některé z chorob, které mohou být léčeny inhibicí selektinové vazby k sLe^x zahrnují, ale nejsou tak omezeny, ARDS, Crohnovu chorobu, septický šok, traumatický šok, multiorgánové selhání, autoimunitní choroby, astma, zánětlivou střevní chorobu, lupénku, revmatoidní artritidu a reperfuzní poškození, které se objevuje po srdečních atacích, mrtvicích a orgánových transplantátech. Navíc bylo zjištěno u některých bílých krvinek, sLe^a , že se blízce příbuzný regiochemický isomer sLe^x , nachází na různých rakovinových buňkách, zahrnujících plicní a střevní rakovinové buňky. Bylo naznačeno, že buněčná adheze, zahrnující sLe^a může být zahrnuta v metastázách určitých rakovin.

Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje sloučeniny, mající dále uvedený obecný vzorec II

23.03.98



kde X je vybrán ze skupiny, zahrnující

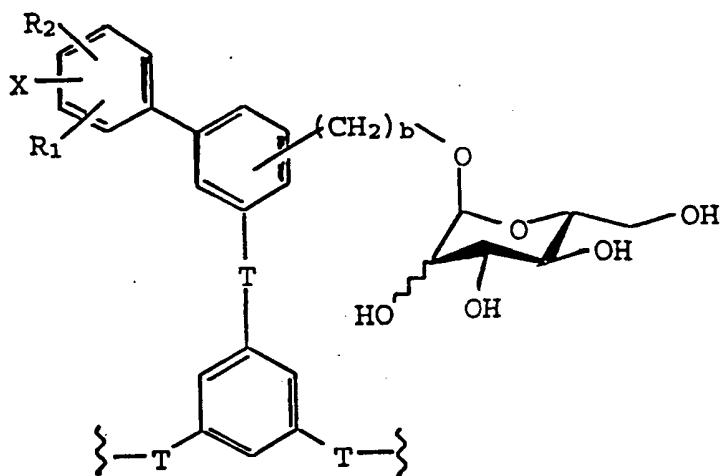
$-\text{CN}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CONHOH}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$,
 $-\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{CONHOH}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CONHNH}_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{COZ}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{Z}$,
 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$,
 $-\text{CH}(\text{OZ})(\text{CO}_2\text{H})$, $-\text{CH}(\text{Z})(\text{CO}_2\text{H})$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{PO}_3\text{D}_1\text{D}_2$,
 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CONH}(\text{CHR}_3)\text{CO}_2\text{H}$, (1-H-tetrazolyl-5-alkyl-) a
 $-\text{OH}$;

Pro divalentní struktury je Y $-(\text{CH}_2)_f-$,

$-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$, $-(\text{CH}_2)_f\text{O}(\text{CH}_2)_f-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{O}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$
 $-(\text{CH}_2)_f\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_f\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_g-$,
 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_g\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_f\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_g\text{CO}-$, $-(\text{CH}_2)_f\text{V}(\text{CH}_2)_f-$
 $-(\text{CH}_2)_f\text{COVCO}(\text{CH}_2)_f-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{COVCO}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$,
 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{V}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$, $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_f\text{NHCO}-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{W}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$,
 $-((\text{CH}_2)_f\text{WSW}(\text{CH}_2)_f-$,
 $-(\text{CH}_2)_f\text{CONH}(\text{CH}_2)_f\text{NHCO}(\text{CH}_2)_f-$, $-(\text{CH}_2)_f\text{COW}(\text{CH}_2)_f\text{WCO}(\text{CH}_2)_f$ nebo
 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_f\text{W}(\text{CH}_2)_f\text{CH}_2-$, kde V je $-\text{N}[(\text{CH}_2)_q]_2\text{N}-$ a q je nezávisle
 2 až 4 a W je aryl nebo heteroaryl;

23.03.98

pro trivalentní struktury je Y



a T je vybrán ze skupiny, zahrnující $-(CH_2)_f-$, $-CO(CH_2)_f-$, $-(CH_2)_gS(O)_b(CH_2)_f-$ a $-CO(CH_2)_gS(O)_b(CH_2)_f-$, kde karbonylová skupina je umístěna ve styku s bifenylovou jednotkou;

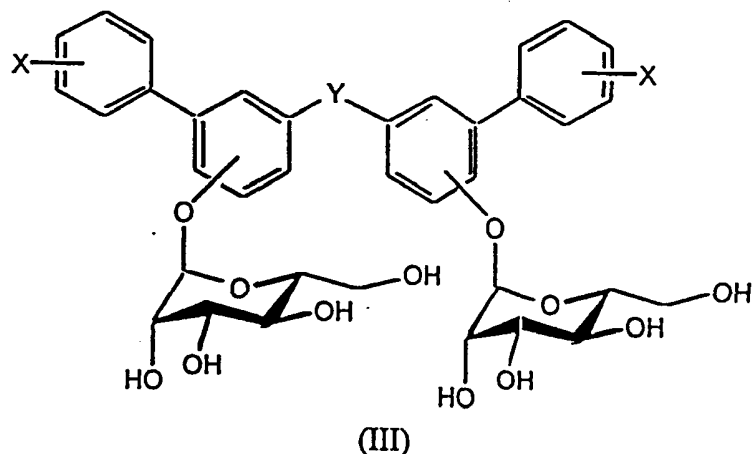
R₁ a R₂ jsou nezávisle vybrány ze skupiny, zahrnující vodík, alkyl, halogen, $-OZ$, $-NO_2$, $-(CH_2)_nCO_2H$, $-NH_2$ a $-NHZ$;

R₃ je vybrán ze skupiny, zahrnující vodík, alkyl, aralkyl, hydroxyalkyl, aminoalkyl, alkylkarboxylovou kyselinu a alkylkarboxamid;

f je 1 až 16, g je 0 až 6, n je 0 až 6, m je 1 až 6, p je 0 až 6, b je 0 až 2, Z je alkyl, aryl nebo aralkyl, D₁ a D₂ nezávisle znamenají vodík nebo alkyl, a jejich farmaceuticky přijatelné soli, estery, amidy a proléčiva.

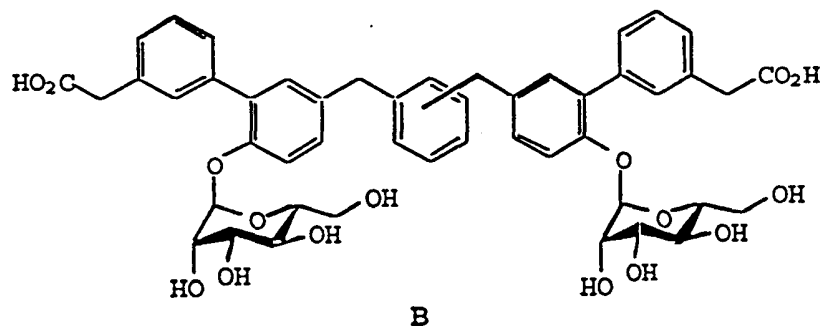
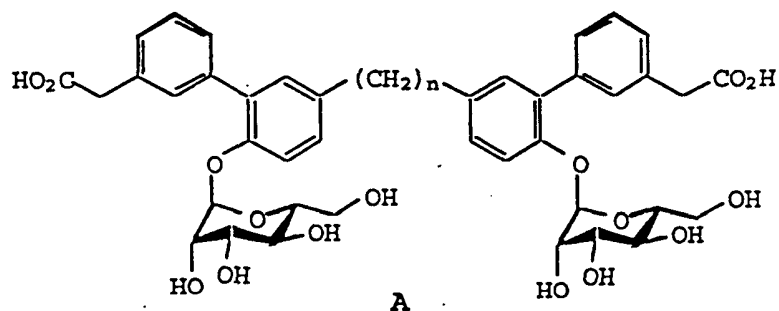
Zejména poskytuje tento vynález sloučeniny vzorce III:

23.03.98

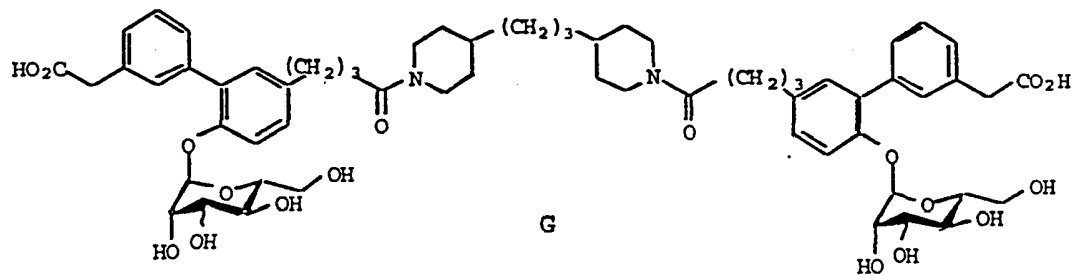
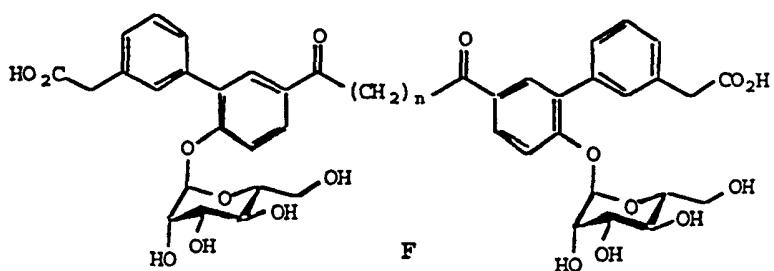
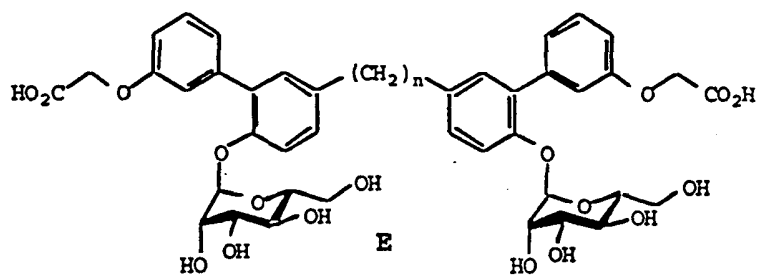
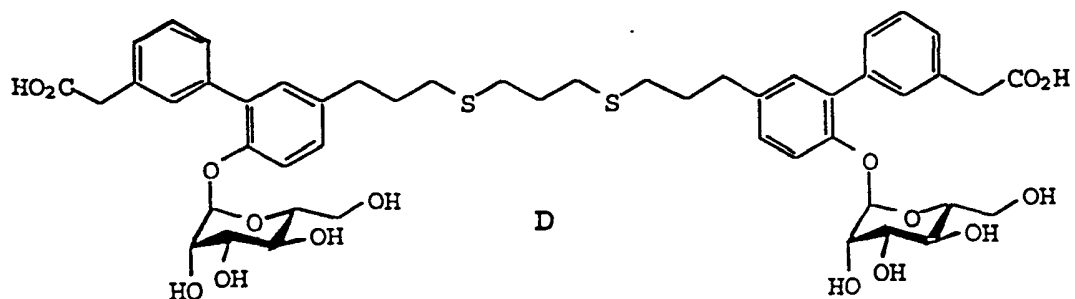
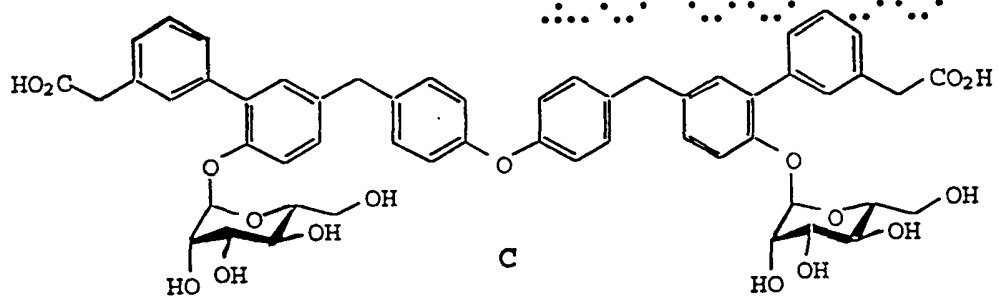


kde X je $-\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ nebo $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ a Y je $-(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{W}(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{WOW}(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, nebo $-(\text{CH}_2)_n\text{COW}(\text{CH}_2)_n\text{WCO}(\text{CH}_2)_n-$ kde W a n jsou definovány výše.

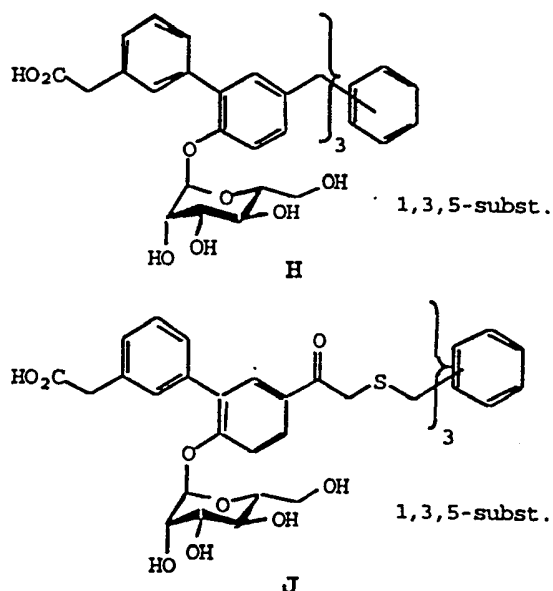
Zvláště výhodné sloučeniny zahrnují:



23.03.98



23.03.98



Vynález také poskytuje farmaceutické kompozice obsahující sloučeninu vzorce II nebo vzorce III a farmaceuticky přijatelný nosič.

Vynález dále poskytuje způsob inhibice vazby E-selektinu, P-selektinu, nebo L-selektinu k sLe^x nebo k sLe^a zahrnující stupeň ve kterém se pacientovi podává účinné množství sloučeniny mající strukturu podle vzorce II nebo III působící inhibici vazby E-, P- nebo L- selektinu k sLe^x nebo sLe^a nebo farmaceuticky účinné kompozice obsahující sloučeninu vzorce II nebo III a farmaceuticky přijatelný nosič.

Sloučeniny podle vynálezu lze použít ve způsobech léčby chorob jako je ARDS, Crohnova choroba, septický šok, traumatický šok, víceorgánové selhání, autoimunitní choroby, asthma, zánětlivá choroba střev, psoriása, revmatoidní artritida, reperfuční poruchy, které se objevují u srdečních

23.03.99

případů, mrtvic, trasplantací orgánů a rakoviny, která zahrnují podání terapeuticky účinného množství sloučeniny mající vzorec II nebo III živočichovi, který potřebuje tuto léčbu pro snížení symptomů uvedených chorob.

Bylo zjištěno, že sloučeniny vzorce (II) znázorněné výše působí inhibici vazby E-, P- nebo L-selektinu k SLe^x nebo SLe^a.

V podaném textu výraz "alkyl" znamená monovalentní skupinu s přímým nebo rozvětveným řetězcem o 1 až 12 atomech uhlíku zahrnující ale neomezené pouze na ně methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sek-butyl, isobutyl, terc.butyl, a podobně.

Výraz "nižší alkyl" znamená alkylovou skupinu o jednom až šesti atomech uhlíku.

Výraz "halogen" znamená některý atom vybraný ze skupiny zahrnující chlor, fluor, brom a jod.

Výraz "alkoxy" znamená alkylovou skupinu připojenou k molekule přes atom kyslíku zahrnující ale neomezenou jenom na ně methoxy, ethoxy, isopropoxy, n-butoxy, sek-butoxy, isobutoxy, terc.butoxy a podobně.

Výraz "alkylamino" znamená skupiny mající strukturu -NH-(alkyl), nebo -N-(alkyl)₂ zahrnující například skupiny jako methylamino, ethylamino, isopropylamino a podobně.

Výraz "aryl" znamená karbocyklické aromatické skupiny zahrnující ale neomezené pouze na ně fenyl, 1- nebo 2-naftyl, fluorenyl, (1,2)-dihydronaftyl, indenyl, indanyl, thienyl,

23.03.99

benzothienyl, thienopyridyl a podobně.

Výraz "aralkyl" (také označovaný arylalkyl) znamená arylovou skupinu připojenou k alkylové skupině zahrnující ale neomezené pouze na ně benzyl, 1- a 2-naftylmethyl, halobenzyl, alkoxybenzyl, hydroxybenzyl, aminobenzyl, nitrobenzyl, guanidinobenzyl, fluorenylmethyl, fenylmethyl(benzyl), 1-fenylethyl, 2-fenylethyl, 1-naftylethyl a podobně.

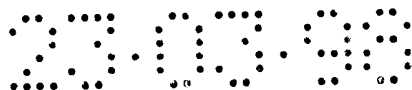
Výraz "hydroxyalkyl" znamená -OH skupinu připojenou k alkylové skupině.

Výraz "aminoalkyl" znamená skupinu mající strukturu $-NR_xR_y$ připojenou k alkylové skupině. Skupiny R_x a R_y jsou nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující například vodík, alkyl a aryl.

Výraz "alkylkarboxylová kyselina" zahrnuje karboxylovou skupinu ($-CO_2H$) připojenou k alkylové skupině.

Výraz "alkylkarboxamid" znamená skupinu mající vzorec $-CONR_xR_y$ která je připojena k alkylové skupině, kde R_x a R_y jsou definovány výše u definice aminoalkylu.

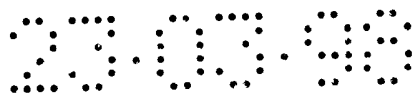
Výraz "farmaceuticky přijatelné soli, estery, amidy a proléčiva" použitý v tomto textu se týká těch karboxylatových solí, aminokyselinových adičních solí, amidů a proléčiv sloučenin podle vynálezu které jsou v mezích podle lékařského posouzení vhodné pro použití pro styk s tkáněmi pacientů a jsou netoxické, nedráždí a nepůsobí alergické reakce a podobně při současném posouzení stupně prospěch/riziko a účinnosti pro zamýšlený účel, rovněž jako amfoterních forem sloučenin podle vynálezu. Výraz "soli" se týká relativně netoxických



adičních solí sloučenin podle vynálezu s anorganickými a organickými kyselinami. Tyto soli mohou být připraveny in situ během konečné izolace a čištění sloučenin nebo mohou být připraveny odděleně reakcí přečištěných sloučenin v jejich volné formě s vhodnou organickou nebo anorganickou kyselinou nebo bazí a vzniklá sůl se izoluje. Reprezentativní soli zahrnují soli jako je bromovodíková, chlorovodíková, síranová, hydrogensíranová, dusičnanová, octanová, šťavelanová, valerátová, oleátová, palmitátová, stearátová, laurátová, borátová, mléčnanová, fosforečnanová, tosylátová, citrátová, maleátová, fumarátová, jantarátová, vinanová, naftylátová, mesylátová, glukohexanátová, laktobionátová, laurylsulfonátová sůl a podobně. Tyto soli mohou také obsahovat kationty na bázi alkalických kovů a kovů alkalických zemin jako je sodík, lithium, draslík, vápník, hořčík a podobně, rovněž jako netoxické kationty amonia, kvarterního amonia a aminů, které zahrnují, ale nejsou na ně omezeny amonium, tetramethylamonium, tetraethylamonium, methylamin, dimethylamin, trimethylamin, triethylamin, ethylamin a podobně. (Viz například práce S.M.Berge a sp., "Pharmaceutical Salts" J.Pharm.Sci., 66:1-19 (1977), která je do tohoto textu včleněna pro úplnost odkazem.)

Příklady farmaceuticky přijatelných, netoxických esterů sloučenin podle vynálezu zahrnují C₁ až C₆ alkylestery ve kterých alkylová skupina má přímý nebo rozvětvený řetězec. Přijatelné estery také zahrnují C₅ až C₇ cykloalkylestery a rovněž arylalkylestery jako je benzyl, nejsou však omezeny pouze na něj. Výhodné jsou C₁ až C₄ alkylestery. Estery sloučenin podle vynálezu lze připravit obvyklými způsoby.

Příklady farmaceuticky přijatelných, netoxických amidů sloučenin podle vynálezu zahrnují amidy odvozené od amonia,



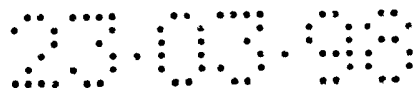
primárních C₁ až C₆ alkylaminů a sekundárních C₁ až C₆ dialkylaminů, kde alkylové skupiny mají přímý nebo rozvětvený řetězec. V případě sekundárních aminů amin může také být ve formě 5 nebo 6 členného heterocyklu obsahujícího jeden atom dusíku. Výhodné jsou amidy odvozené od amonia, primární C₁ až C₃ alkylamidy a sekundární C₁ až C₂ dialkylamidy. Amidy sloučenin podle vynálezu lze připravit obvyklými způsoby.

Výraz "proléčivo" se týká sloučenin, které jsou rychle in vivo transformovány na mateřskou sloučeninu výše uvedeného vzorce například hydrolýzou v krvi. Podrobná diskuze k této tématice je uvedena v pracích T.Higuchi a V.Stella "Pro-drugs as Novel Delivery Systems" Vol.14 A.C.S.Symposium Series a Bioreversible Carriers in Drug Design, ed.Edward B.Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, které jsou obě včleněny do tohoto textu odkazem.

Vynález také poskytuje farmaceuticky účinné kompozice obsahující sloučeniny podle vynálezu. Předpokládá se, že tyto farmaceuticky účinné kompozice mohou obsahovat sloučeninu podle vynálezu a další sloučeniny, které inhibují nebo konkurují vazbě E-selektinu nebo P-selektinu k sLe^x nebo sLe^a včetně sLe^x a sLe^a samotných.

Farmaceutický účinné kompozice podle vynálezu obsahují fyziologický nosič a sloučeninu podle vzorců II nebo III.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu mohou obsahovat jednu nebo více sloučenin majících výše uvedené struktury II nebo III zpracované společně s jedním nebo více netoxickými, fyziologicky přijatelnými nosiči, pomocnými látkami nebo vehikuly, které jsou v tomto textu souhrnně označovány jako nosiče, určené pro parenterální injekce, pro orální podání

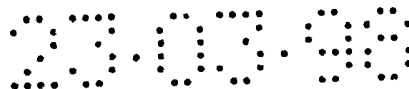


v pevné nebo tekuté formě, pro rektální nebo topické podání a podobně.

Tyto kompozice mohou být podávány lidem a živočichům buď orálně, rektálně, parenterálně (intravenosně, intramuskulárně nebo subkutanně), intracisternálně, intravaginálně, intraperitoneálně, lokálně (prášky, masti nebo kapky), nebo buďálně nebo inhalací (za rozprášení nebo jako nosní spreje).

Kompozice vhodné pro parenterální injekci mohou obsahovat fyziologicky přijatelné sterilní vodné nebo nevodné roztoky, disperze, suspenze nebo emulze a sterilní prášky určené pro rekonstituci na sterilní injekční roztoky nebo disperze. Příklady vhodných vodných a nevodných nosičů, ředidel, rozpouštědel nebo vehikulí zahrnují vodu, ethanol, polyol (propylenglykol, polyethylenglykol, glycerin a podobně), jejich vhodné směsi, rostlinné oleje (jako je olivový nebo "cannola" olej) a organické estery které lze injekčně aplikovat jako je ethyloleat. Správnou tekutost lze zajistit například použitím povlaku jako je lecithinový, zajištěním požadované velikosti částic v případě disperzí a použitím povrchově aktivních látek.

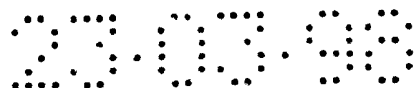
Tyto kompozice mohou také obsahovat pomocné látky jako jsou konzervační prostředky, smáčivé prostředky, emulgátory a dispergační prostředky. Prevenci před působením mikroorganismů lze zajistit různými antibakteriálními a proplísňovými prostředky jako jsou například parabeny, chlorbutanol, fenol, kyselina sorbová a podobně. Také může být žádoucí obsah isotonisujících přísad, například cukrů, chloridu sodného a podobně. Protrahovanou absorpci injekční farmaceutické formy lze zajistit použitím prostředků zpouždujících absorpci například monostearanu hlinitého a želatiny.



Je-li to žádoucí, a pro účinnější distribuci, lze uvedené sloučeniny včlenit do transportních systémů s pomalým nebo časově závislým nebo cíleným uvolňováním, jako jsou polymerové matrice, liposomy a mikrosféry. Ty mohou být sterilizovány například přes mikrobiální filtr nebo včleněním sterilizačních prostředků ve sterilní vodě nebo nějakém jiném sterilním injektovatelném médiu bezprostředně před použitím.

Pevné dávkové formy pro orální podávání zahrnují tobolky, tablety, pilulky, prášky a granule. V těchto pevných dávkových formách se účinná sloučenina nebo proléčivo ve formě esteru smísí s nejméně jednou obvyklou přísadou (nebo nosičem) jako je citrát sodný nebo hydrogenfosforečnan vápenatý nebo (a) plnivy nebo ředidly jako jsou například škroby, laktosa, sacharosa, glukosa, manitol a kyselina křemičitá, (b) pojivy, jako například karboxymethylcelulosa, alginaty, želatina, polyvinylpyrrolidon, sacharosa a akáciová klovatina, (c) zvlhčující prostředky jako například glycerin, (d) látky usnadňující rozpad jak například agar-agar, uhličitán vápenatý, bramborový nebo tapiokový škrob, kyselina alginová, určité komplexy silikátů a uhličitánu sodného, (e) retardéry rozpouštění jako například parafin, (f) urychlovače absorpce jako například kvarterní amoniové sloučeniny, (g) smáčecí prostředky jako například cetylalkohol a glycerinmonostearat, (h) adsorbenty jako například kaolin a bentonit, a (i) kluzné látky jako například talek, stearan vápenatý, stearan hořečnatý, pevné polyethylenglykoly, laurylsíran sodný nebo jejich směsi. V případě tobolek, tablet a pilulek tyto dávkové formy mohou také obsahovat pufrovací prostředky.

Pevné kompozice podobného typu mohou být použity jako náplně měkkých nebo tvrdých želatinových tobolek za použití



přísad jako je laktosa nebo mléčný cukr a rovněž jako vysokomolekulární polyethylenglykoly a podobně.

Pevné dávkové formy jako jsou tablety, dražé, tobolky, pilulky a granule mohou být připraveny s potahy a obaly jako jsou enterosolventní potahy a jiné v oboru dobře známé. Mohou také obsahovat prostředky nepropouštějící záření a mohou to také být kompozice ze kterých se uvolňuje účinná sloučenina nebo sloučeniny až v určité části intestinálního traktu v prodloužené době. Příkladem takto formulovaných kompozic které lze použít jsou kompozice z polymerních substancí a vosků.

Účinné sloučeniny mohou také být je-li to žádoucí v mikrozapouzdřené formě s jednou nebo s více výše uvedenými přísadami.

Tekuté dávkové formy pro orální podání zahrnují farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy a tinktury. Kromě účinných sloučenin mohou tekuté dávkové formy obsahovat inertní ředidla běžně používaná v oboru jako je voda nebo jiná rozpouštědla, prostředky usnadňující rozpustnost a emulgátory jako například ethylalkohol, isopropylalkohol, ethylkarbonat, ethylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, dimethylformamid, oleje zejména bavlníkový olej, arašídový olej, klíčkový olej, olivový olej, "cannola" olej, ricinový olej a sesamový olej, glycerin, tetrahydrofurfurylalkohol, polyethylenglykoly a estery mastných kyselin sorbitanu nebo směsi těchto substancí a podobně.

Kromě těchto inertních ředidel mohou tyto kompozice také obsahovat pomocné látky jako jsou smáčecí prostředky, emulgační suspenzační prostředky, sladidla, a chuťová a čichová

23.03.98

korigencia.

Suspenze mohou obsahovat kromě účinných sloučenin suspenzační prostředky, například ethoxylované isostearylalkoholy, polyoxyethylensorbitol a estery sorbitanu, mikrokrytalickou celulosu, metahydroxid hlinitý, agar-agar, tragant nebo směsi těchto substancí a podobně.

Kompozice pro rektální podání jsou výhodně čípky, které mohou být připraveny smísením sloučenin podle vynálezu s vhodnými nedráždivými přísadami nebo nosiči jako je kakaové máslo, polyethylenglykol nebo čípkový vosk, které jsou za obvyčejné teploty v pevném stavu ale tekuté při tělesné teplotě a proto v dutině rektální nebo vaginální tají a uvolňují účinnou složku.

Dávkové formy pro topické podání sloučeniny podle vynálezu zahrnují masti, prášky, spreje a inhalační formy.

Účinná složka se smísí za sterilních podmínek s fyziologicky přijatelným nosičem a některými konzervačními látkami, pufrů nebo hnacími plyny podle potřeby. V rozsahu tohoto vynálezu se předpokládají i oftalmologické přípravky, jako jsou oční masti, suspenze, prášky a roztoky.

Sloučeniny podle vynálezu lze podávat také ve formě liposomů. Jak je v oboru známo, liposomy jsou obecně odvozeny od fosfolipidů nebo jiných lipidových substancí. Liposomy jsou tvořeny mono- nebo multilamelárními hydratovanými tekutými krystaly které jsou dispergovány ve vodném médiu. Lze použít jakýkoli netoxický, fyziologicky přijatelný a metabolizovatelný lipid schopný vytvořit liposomy. Předkládané kompozice v liposomové formě mohou obsahovat kromě inhibitorů

23.03.98

vazby selektinu podle vynálezu také stabilizátory, konzervační prostředky, přísady a podobně. Výhodnými lipidy jsou fosfolipidy a fosfatidylcholin (lecithiny) a to jak přírodní tak syntetické. Způsoby tvorby liposomů jsou v oboru dobře známy.

Skutečné dávkové hladiny účinné složky v kompozicích podle vynálezu mohou být různé, tak aby se docílilo obsahu účinné složky efektivního k dosažení terapeutické odezvy u konkrétní kompozice a způsobu podání. Zvolená dávková hladina proto závisí na požadovaném terapeutickém účinku, na způsobu podání, na požadované době léčby a na dalších faktorech.

Celková denní dávka sloučenin podle vynálezu podávaná příjemci v jedné nebo v rozdělených dávkách může být v rozmezí asi 0,3 mg až asi 50 mg na kilogram tělesné hmotnosti. Dávková jednotka kompozic může tedy obsahovat subnásobek těchto dávek umožňujících dosažení denních dávek. Je třeba chápat, že specifická hladina dávek pro konkrétního pacienta ať již člověka nebo jiného živočicha, bude záviset na různých faktorech zahrnujících tělesnou hmotnost, všeobecný zdravotní stav, pohlaví, dietu, dobu a způsob podávání, rychlost absorpce a vylučování, kombinaci s dalšími léčivy a stupeň choroby, která bude léčena.

Zejména lze sloučeniny podle vynálezu použít k léčení různých chorob souvisejících se k záněty a s rozpoznáváním a s adhezí buňka-buňka. Například sloučeniny podle vynálezu lze podávat pacientovi k léčení septického šoku, chronických zánětlivých chorob jako je psoriáza a revmatoidní artritida, a reperfučních poškození tkání, která se objevují po srdečních infarktech, mrtvicích a transplantacích orgánů, multiorgánového selhání, autoimunitních chorob, astma, a

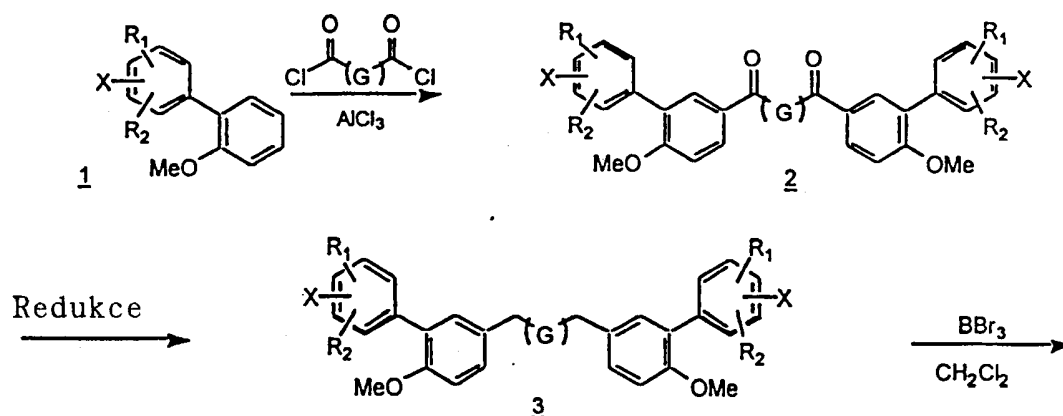
23.03.98

zánětlivého onemocnění střev. V každém případě účinné množství sloučenin podle vynálezu se podává buď samotné nebo ve formě farmaceuticky účinné kompozice pacientovi, který potřebuje tuto léčbu. Také se připouští, že lze podávat kombinaci těchto sloučenin pacientovi, který potřebuje toto podávání. Sloučeniny podle vynálezu mohou také být podávány k léčení dalších chorob souvisejících s adhezí buňka-buňka adhezí. Jelikož sloučeniny podle vynálezu inhibují vazbu E-selektinu nebo P-selektinu k sLe^x nebo sLe^a , lze potenciálně léčit jakoukoliv nemoc související s touto interakcí inhibicí této vazebné interakce.

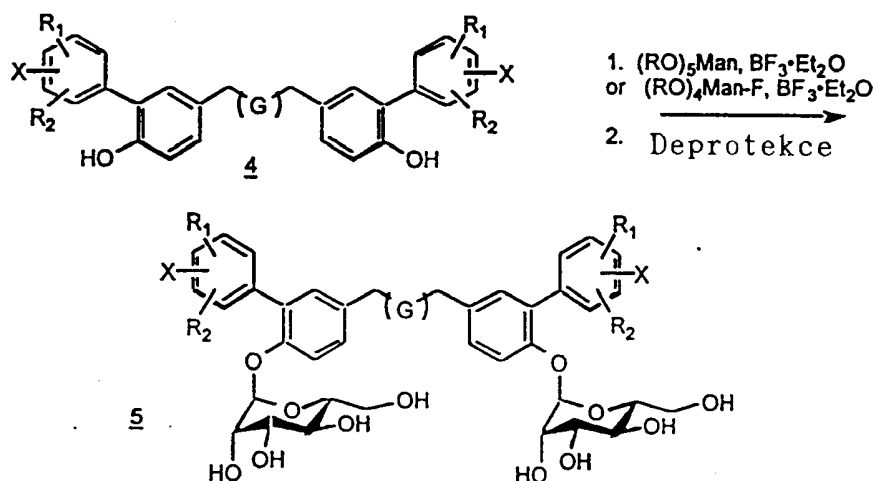
Kromě toho jak bylo zjištěno na určitých bílých krvinkách, sLe^a se nachází na různých rakovinových buňkách zahrnujících buňky z plic a z tlustého střeva. Předpokládá se, že buněčná adheze zahrnující sLe^a může souviset s metastázami určitých druhů rakoviny a že inhibitory vazby sLe^a mohou být vhodné při léčení těchto typů rakoviny.

Mnoho sloučenin podle vynálezu lze syntetizovat podle následujících obecných schemat syntézy.

Schema 1



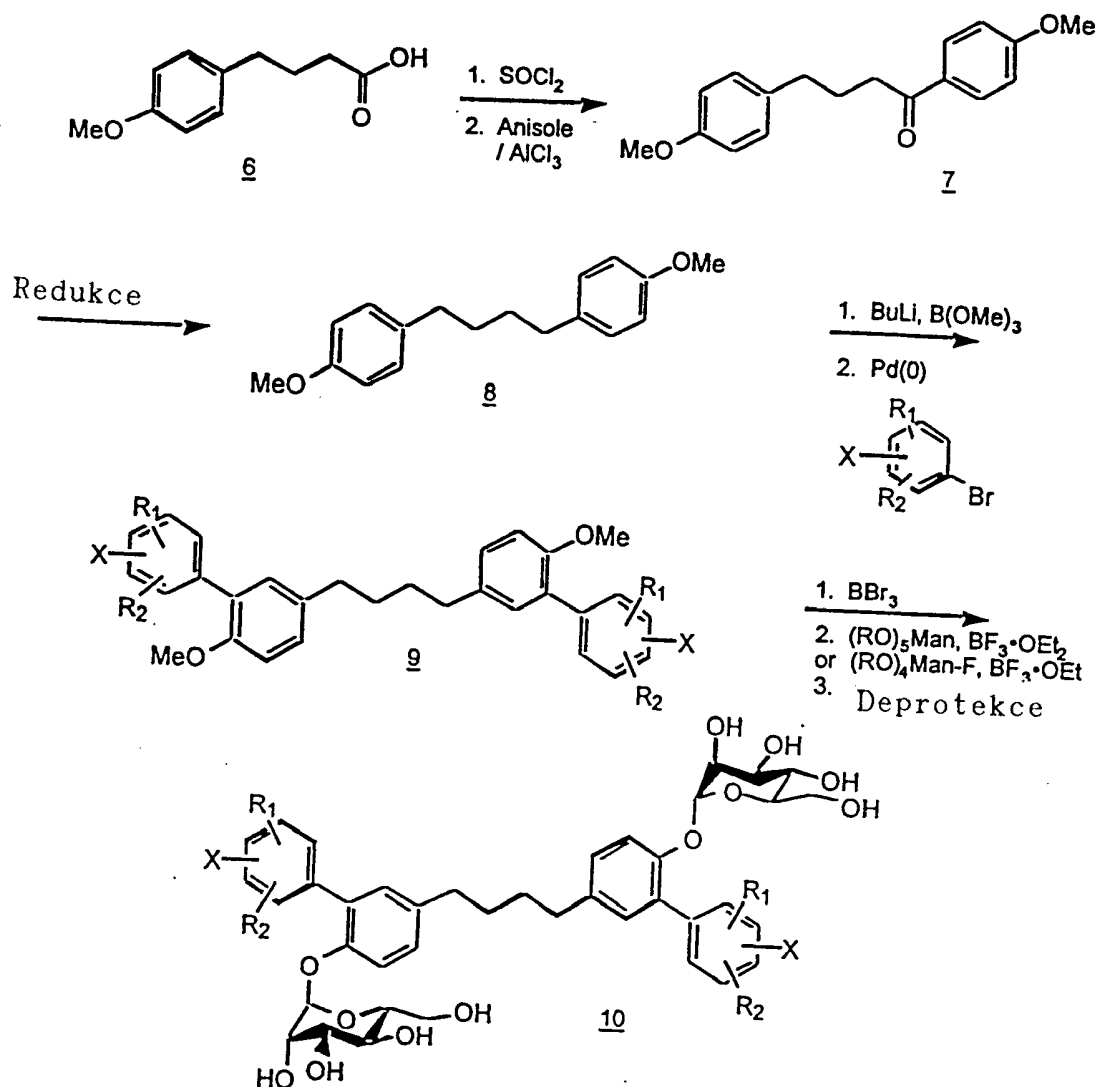
23.03.98



Podle tohoto schematu reaguje substituovaný bifenylyl (1, U.S.patent č.5,444,050) s chloridem dikyseliny za tvorby diaryldionu 2. Výhodné příklady zahrnují chloridy dikyselin s přímým nebo rozvětveným řetězcem o pěti až 16 atomech uhlíku a aryl- a aralkyl- chloridy dikyselin. Tyto sloučeniny lze redukovat jedním z mnoha způsobů známých pracovníkům v oboru, totiž katalytickou hydrogenací, Wolff-Kishnerovou redukcí, hydridy kovů jako triethylsilanem, nebo Clemmensenovou redukcí. Vzniklé sloučeniny (3) se převedou na fenol 4 působením tribromidu boru v halogenovaném rozpouštědle výhodně při teplotě 0 °C až teplotě místnosti. Glykosylací za použití mannosy s chránicí skupinou v přítomnosti etherátu trifluoridu boru a následnou bážickou hydrolýzou se získá požadovaná sloučenina 5.

23.03.98

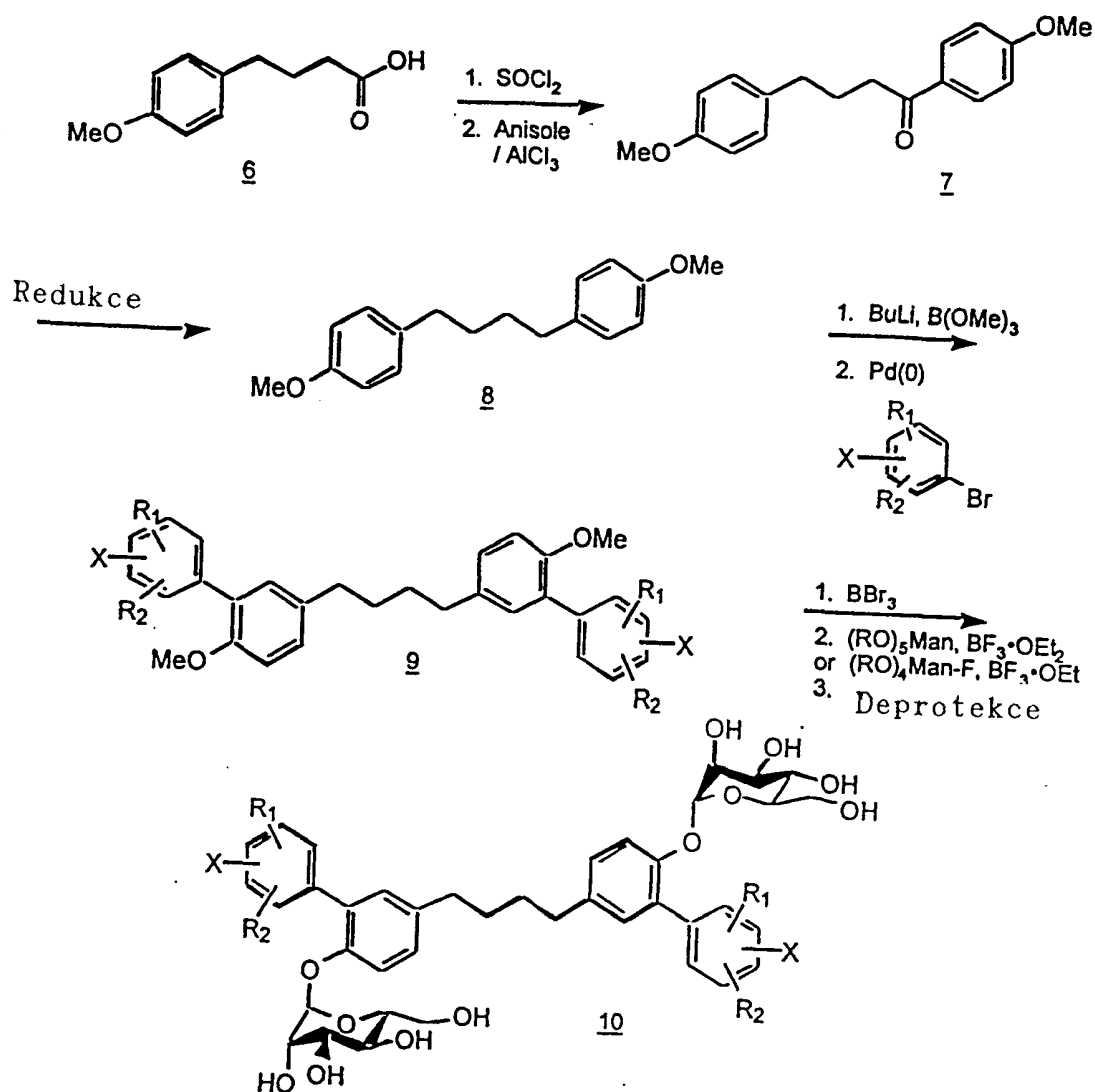
Schema 2



V některých případech může být žádoucí zavést spojovací článek mezi dvěma kruhy, které jsou později substituovány jednotkou mannosy před připojením kruhu, na kterém je karboxylová kyselina. Například podle tohoto schématu se sloučenina jako je 4-(4-methoxyfenyl)butanová kyselina převede na chlorid kyseliny použitím thionylchloridu, načež se Friedel-Craftsovou reakcí s anisolem získá keton **7**. Redukcí ketonu některým z mnoha způsobů známých pracovníkům zkušeným v oboru získá sloučenina **8**. Orto-lithiací vzhledem k

23.03.98

Schema 2

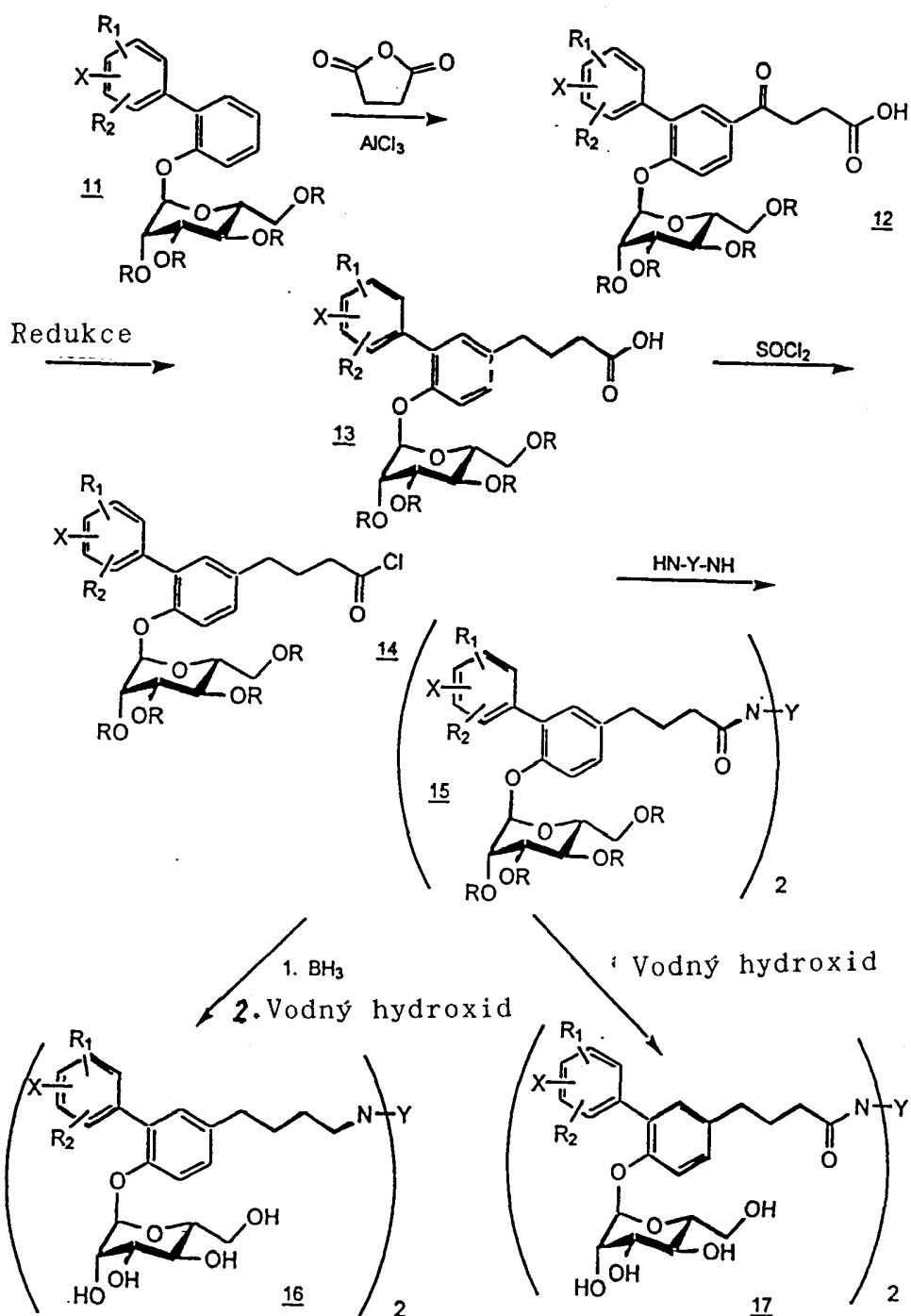


V některých případech může být žádoucí zavést spojovací článek mezi dvěma kruhy, které jsou později substituovány jednotkou mannosy před připojením kruhu, na kterém je karboxylová kyselina. Například podle tohoto schématu se sloučenina jako je 4-(4-methoxyfenyl)butanová kyselina převede na chlorid kyseliny použitím thionylchloridu, načež se Friedel-Craftsovou reakcí s anisolem získá keton **7**. Redukcí ketonu některým z mnoha způsobů známých pracovníkům zkušeným v oboru získá sloučenina **8**. Orto-lithiací vzhledem k

23.03.98

methoxyskupinám, konverzí na kyselinu boritou a paladiem zprostředkovanou biarylovou kopulací se získá sloučenina 9. Demethylací etherů a potom glykosylací a odstraněním chránících skupin se získá cílená sloučenina 10.

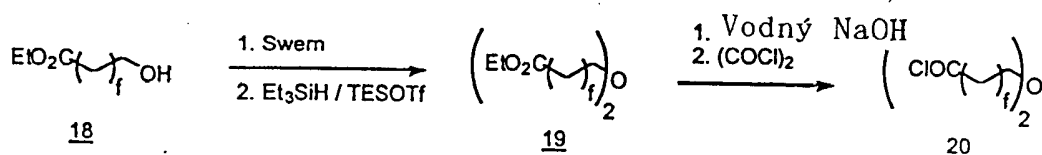
Schema 3



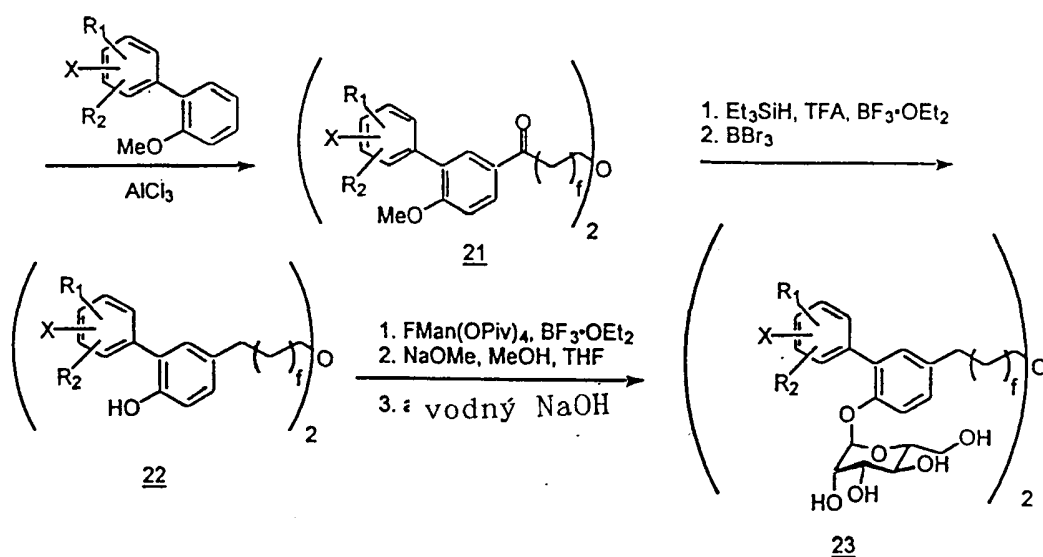
23.03.99

V dalších případech může být výhodné provést Friedel-Craftsovu reakci se sloučeninou jako je sloučenina 11 (U.S.patent č.5,444,050) ve které cukerná složka je již přítomna. Například lze zpracovat sloučeninu 11 s anhydridem kyseliny jantarové za přítomnosti Lewisovi kyseliny jako je chlorid hlinitý za získání ketokyseliny 12. Redukcí ketonu jedním ze způsobů známých pracovníkům v oboru se získá kyselina 13, která se převede na chlorid kyseliny 14 použitím thionylchloridu v halogenovaném rozpouštědle při nízké teplotě nebo použitím jiného vhodného způsobu. Chlorid kyseliny se nechá reagovat s jedním z mnoha primárních nebo sekundárních aminů, zejména diaminů jako je ethylendiamin, piperazin, homopiperazin, 4,4'-trimethylendipiperidin nebo jiný alkyldiamin za tvorby multimerních sloučenin jako je 15. Redukcí amidů za použití boranu nebo jiného vhodného reakčního činidla v okysličeném rozpouštědle při nízké teplotě s následnou hydrolýzou chránících skupin se získá požadovaná sloučenina 16. Dále je možné amidy 15 hydrolyzovat přímo za získání amidů 17.

Schema 4

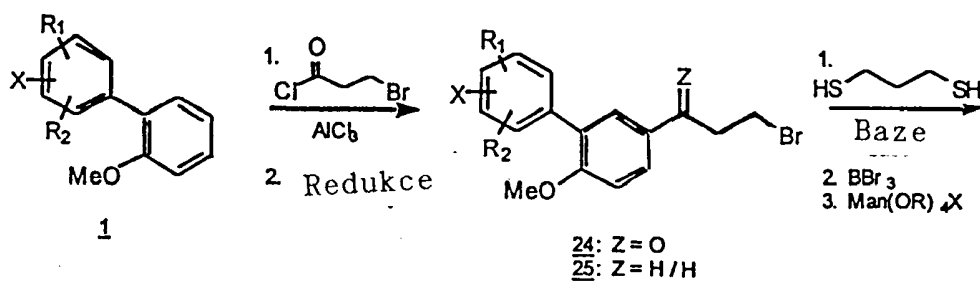


23.03.98

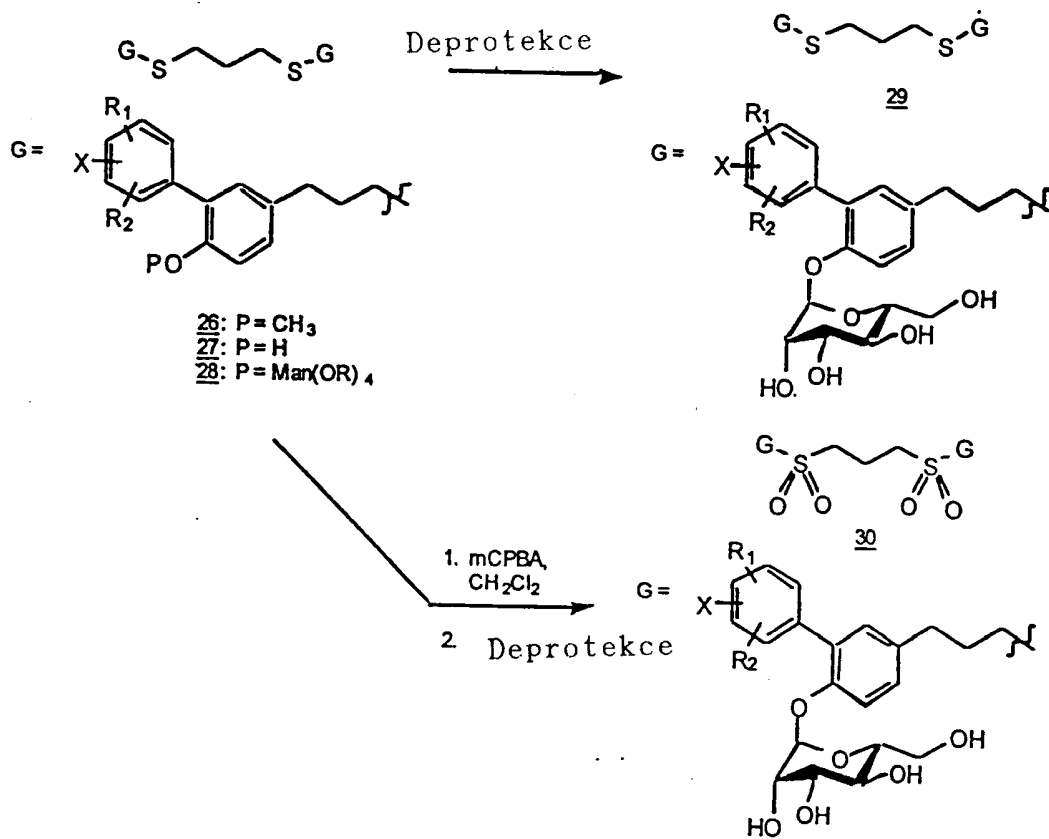


Sloučeniny spojované etherovými vazbami lze připravit podle schematu 4. Oxidace hydroxyesterů (18) vede k aldehydům které samokondenzují na ethery (19), které se převedou na chloridy kyselin (20). Friedel-Craftsova kopulace, redukce, demethylace, glykosilace a odstranění chránících skupin vede k etherům (23).

Schema 5



23.03.98

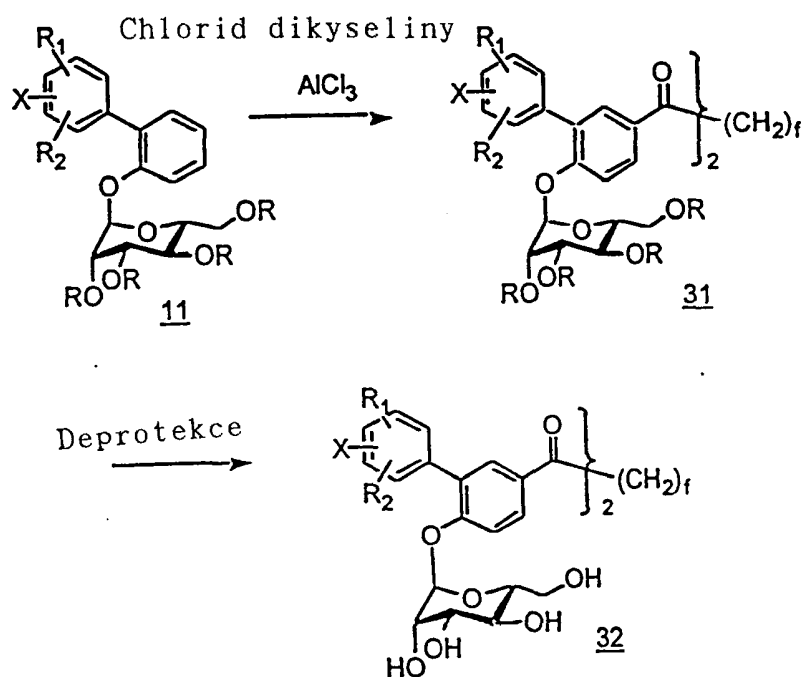


V některých případech může být žádoucí připravit jiné sloučeniny sledem reakcí znázorněných na schématu 5. Sloučenina 1 se tak může podrobit Friedel-Craftsově reakci s jinými halogenovanými halidy kyseliny například s 3-brompropionylchloridem za získání 24. Redukci benzylketonu lze provést jedním z mnoha způsobů známých pracovníkům v oboru za tvorby halidu 25. Reakcí 25 s 1,3-propandithiolem nebo jiným vhodným disulfidem za přítomnosti vhodné báze se získá sloučenina 26. Demethylaci lze provést jedním z mnoha způsobů, zejména pomocí tribromidu boru v halogenovaném rozpouštědle

23.03.98

při nízké teplotě, čímž se získá fenol 27. Tento fenol se nechá reagovat s chráněným mannopyranosidem za použití etheratu trifluridu boru v halogenovaném rozpouštědle a odstraněním chránících skupin vodnou bazí se získá sloučenina 29. Alternativně lze glykosid 28 zpracovat s vhodným oxidačním prostředkem jako je kyselina m-chlorperoxybenzoová ve vhodném rozpouštědle čímž se získá sulfon. Zpracováním s vodnou bazí se získá konečná sloučenina 30.

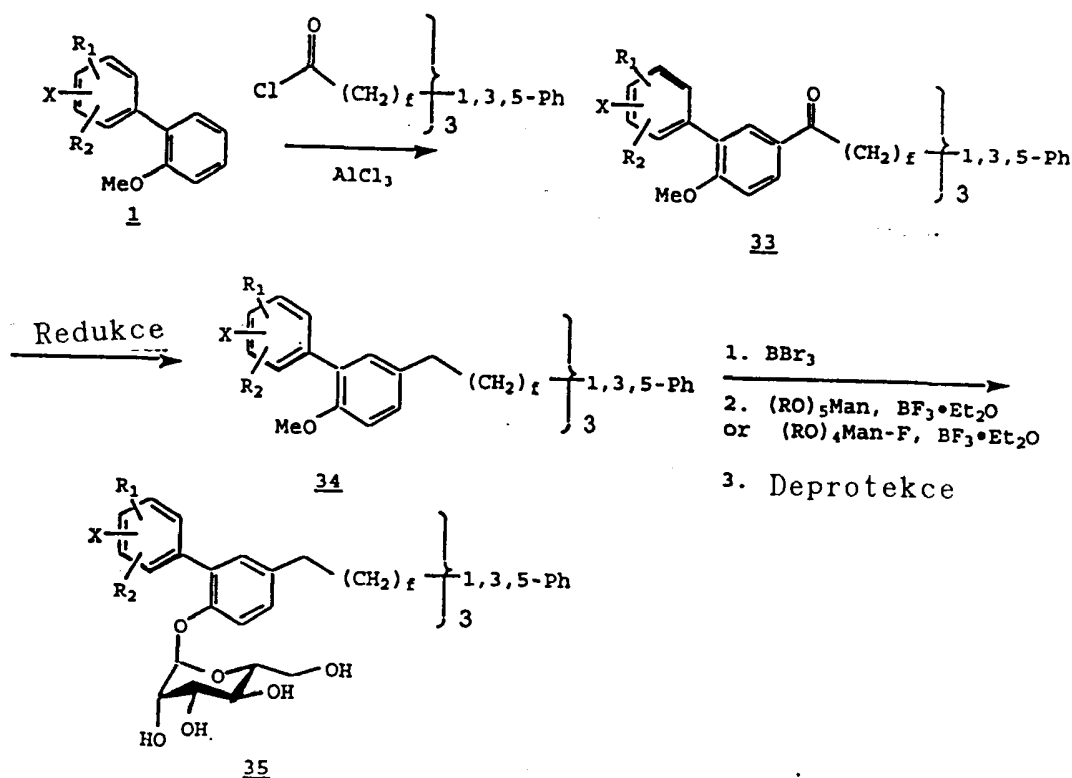
Schema 6



V ještě dalších případech se meziprodukt 11 podrobí Friedel-Craftsově reakci s chloridem dikyseliny v halogenovaném rozpouštědle za přítomnosti chloridu hlinitého nebo jiné vhodné Lewisovi kyseliny a získá se 31. Odstraněním chránících skupin z mannosové složky za použití vodného hydroxidu nebo methoxidu a potom hydroxidu se získá konečná sloučenina 32.

23.03.98

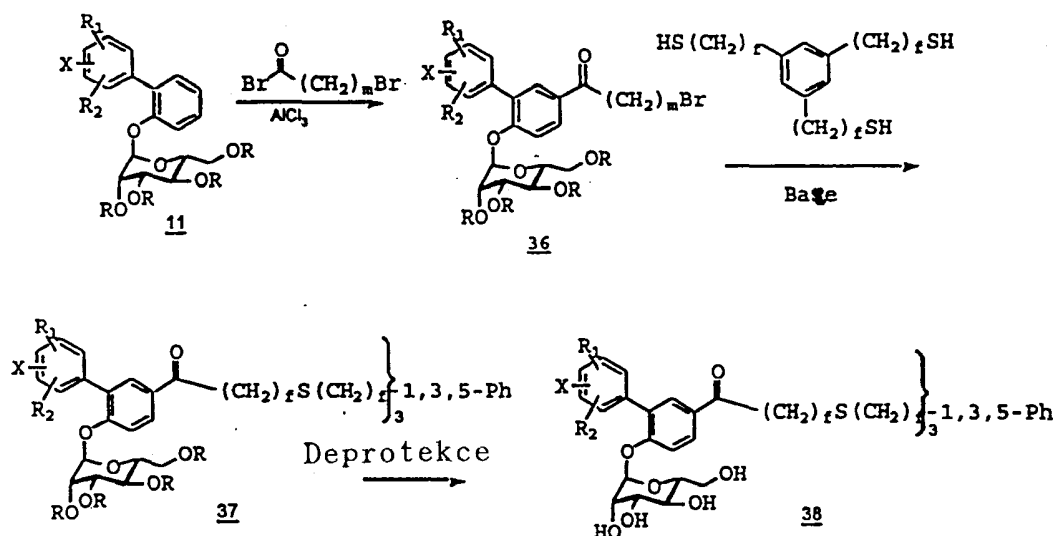
Schema 7



Podle tohoto schematu reaguje substituovaný bifenylyl (1, U.S.patent č.5,444,050) s chloridem trikyseliny za získání benzylketonu 33. Tyto ketony lze redukovat jedním z mnoha známých způsobů pracovníkům v oboru a jsou uvedeny ve schematu 1. Vzniklé sloučeniny (34) mohou být demethylovány, glykosylovány a odstraněním chránících skupin se získají požadované sloučeniny 35.

23.03.98

Schema 8



Podobným způsobem se sloučenina 11 podrobí Friedel-Craftsově reakci s bromidem bromalkylkyseliny a získá se tak 36. Reakcí bromketonu s 1,3,5- substituovaným benzentriethiolem za přítomnosti base se získá sloučenina 37. Hydrolyzou chránících skupin se získají požadované sloučeniny (38).

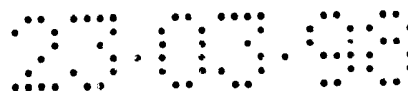
Vynález je dále objasněn pomocí následujících reprezentativních příkladů:

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

1,6-bis[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)-fenyl]hexan

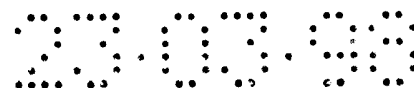
Stupeň 1: Adipoylchlorid (2,0 g, 10,9 mmol) se rozpustí v



1,2-dichlorethanu (55 ml) a ochladí se v ledové lázni. Přidá se chlorid hlinitý (5,8 g, 43,5 mmol) a potom methylester kyseliny 3-(2-methoxyfenyl)octové (5,75 g, 22,4 mmol) [T.P.Kogan, B.Dupré, I.L.Scott, K.Keller, H.Dao a P.Beck, US patent 5,444,050 a T.P.Kogan, B.Dupré, K.M.Keller, I.L.Scott, H.Bui, R.V.Market, P.J.Beck, J.A.Voytus, B.M.Revelle a D.Scott, J.Med.Chem, 1995, 38, 4976-4984] a směs se míchá 30 minut při teplotě místnosti a potom se smíchá s ledovou vodou (30 ml). Organické složky se vyizolují a vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 5 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Zbytek se přečistí rychlou chromatografií (SiO_2 , gradientová eluce hexanem až hexan/ethylacetat 3:1) za získání produktu 2 (2,23 g, 33 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,96 (dd, $J=6,6$, 1,9 Hz, 2H), 7,92 (d, $J=1,9$ Hz, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,34 (t, $J=6$ Hz, 2H), 7,18-7,28 (m, 4H), 7,00 (d, $J=6,3$ Hz, 2H), 3,87 (s, 6H), 3,69 (s, 6H), 3,68 (s, 4H), 3,01 (m, 4H), 1,84 (m, 4H) ppm. IR (NaCl): 1741, 1677 cm^{-1} .

Stupeň 2: Část A: Produkt ze stupně 1 (2,23 g, 3,6 mmol) se rozpustí v acetonitrilu a zpracuje se s roztokem hydroxidu lithného (0,8 g, 18 mmol monohydratu hydroxidu lithného v 8 ml vody). Tato směs se míchá přes noc při teplotě místnosti a pak se okyselí 2N HCl na pH 4 a extrahuje se ethylacetatem. Extrakty se spojí, vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí za sníženého tlaku. IR (NaCl): 1711, 1677 cm^{-1} .

Část B: Ketokyselina z části A (1,86 g, 3,1 mmol) se rozpustí v dimethylsulfoxidu (15 ml) a smísí se hydrazinem (1,0 ml, 31 mmol). Tato směs se zahřívá v atmosféře dusíku 2,5 hodiny při 80 $^{\circ}\text{C}$ a pak se ochladí. Přidá se terc.butoxid draselný (3,5 g, 31 mmol) a směs se znovu zahřívá přes noc při 80 $^{\circ}\text{C}$ načež se smíchá s vodou (30 ml), okyselí se 2N HCl a

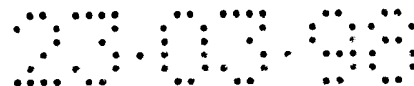


extrahuje se ethylacetatem. Extrakty se spojí, vysuší se (MgSO_4) a zahuštěním za sníženého tlaku se získá sloučenina 3 (1,6 g, 91 %). IR (NaCl): 1713 cm^{-1} .

Stupeň 3: Část A: Dikyselina ze stupně 2, části B (1,6 g, 2,8 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (14 ml) v atmosféře dusíku ochladí se v lázni suchý led/2-propanol. Pomalu se přidá tribromid boru (1,4 ml, 14 mmol); směs se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti a pak se smísí s ledem-vodou (25 ml). Organické vrstvy se oddělí, promyje se nasyceným roztokem hydrogenuhlčitanu sodného (20 ml), vodou (20 ml), nasyceným chloridem sodným (20 ml) a pak se vysuší (MgSO_4) a zahuštěním za sníženého tlaku se získá 2,38 g surového produktu.

Část B: Zbytek z části A se smísí s methanolem (50 ml) a přidá se kyselina sírová (5 kapek). Tato směs se zahřívá přes noc při teplotě zpětného toku a pak se zahustí za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí v dichlormethanu (50 ml), zpracuje se s uhlčitanem sodným a pak se zfiltruje přes vrstvu silikagelu. Filtrát se zahustí za sníženého tlaku a - přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 , gradientová eluce hexanem až hexan/ethylacetat 3:1) se získá 1,6-bis(3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-4-hydroxyfenyl)hexan (0,9 g, 38 %). ^1NMR (400 MHz, CDCl_3): 6,80–7,50 (m, 14H), 3,70 (s, 6H), 3,68 (s, 4H), 2,55 (dd, $J=5,5, 5,5\text{ Hz}$, 4H), 1,59 (m, 4H), 1,36 (m, 4H) ppm. IR (NaCl): $3430, 1731\text{ cm}^{-1}$.

Stupeň 4: 1,6-bis-(3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-4-hydroxyfenyl)hexan (0,9 g, 1,6 mmol) se rozpustí v 1,2-dichlorethanu (8 ml). V jedné dávce se přidá pentaacetat α -D-mannosy (1,9 g, 4,8 mmol) a potom se pomalu přidá etherat trifluoridu boru (2,5 ml, 19,2 mmol). Tato směs se míchá při teplotě místnosti v atmosféře dusíku přes noc a pak se smísí s



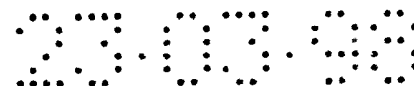
vodou (15 ml). Organický podíl se oddělí a vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 2 ml). Tyto extrakty se spojí s původní organickou frakcí, vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 , gradientová eluce hexanem až hexan/ethylacetat 3:1) se získá 1,6-bis-[3-(3-karbomethoxy-methylfenyl)-4-(tetra- α -acetyl- α -D-mannopyranosyl)oxyfenyl]-hexanu (1,5 g, 77 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,31–7,37 (m, 6H), 7,19–7,24 (m, 4H), 7,09–7,13 (m, 4H), 5,25 (d, $J=0,6$ Hz, 2H), 3,57–3,66 (m, 6H), 3,3–3,50 (m, 10H), 2,54 (m, 4H), 1,58 (m, 4H), 1,34 (m, 4H) ppm. IR (NaCl): 1752 cm^{-1} .

Stupeň 5: Glykosid ze stupně 4 (1,5 g, 1,2 mmol) se rozpustí v acetonitrilu (6 ml) a zpracuje s roztokem monohydratu hydroxidu lithného (1,0 g, 24 mmol) ve vodě (10 ml). Tato směs se míchá přes noc při teplotě místnosti a pak se okyselí na pH 2 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Tato směs se pak zahustí za sníženého tlaku a přečištěním zbytku pomocí HPLC (reversní fáze, gradientová eluce 5–50 % acetonitrilu ve vodě, detekce při 254 nm) se získá 1,6-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]-hexan, (5), (0,35 g, 33 %) ve formě bílé pevné látky, t.t. $115\text{--}117\text{ }^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 7,31–7,37 (m, 6H), 7,19–7,24 (m, 4H), 7,09–7,13 (m, 4H), 5,25 (d, $J=0,6$ Hz, 2H), 3,57–3,66 (m, 6H), 3,3–3,50 (m, 10H), 2,54 (m, 4H), 1,58 (m, 4H), 1,34 (m, 4H), ppm. IR (KBr): $3420, 1711\text{ cm}^{-1}$.

Příklad 2

Dvojsodná sůl 1,6-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)-fenyl]hexanu (alternativní způsob).

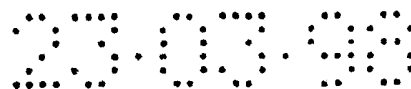
Stupeň 1: Adipoylchlorid (16,8 ml, 112 mmol) a



methylester kyseliny 3-(2-methoxyfenyl)fenyloctové (60,9 g, 225 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (300 ml) a ochladí se na 0 °C. Přidá se chlorid hlinitý (67,7 g, 507 mmol), míchá se 5 minut při 0 °C a pak přidá led. Produkt se extrahuje EtOAc (1 l), promyje se vodou (500 ml), nasyceným NaHCO₃ (50 ml) a nasyceným NaCl (5 ml). Pak se roztok vysuší Na₂SO₄, zfiltruje se přes vrstvičku síranu hořečnatého, zahustí se a rekrystalizací z ether/ethylacetat se získá sloučenina 2 (64,7 g, 89 %).

Stupeň 2: Tento bis-ke-ton 2 (15 g, 23,1 mmol) se rozpustí v horké směsi EtOAc:EtOH (4:1, 100 ml). Vzniklý roztok se ochladí a přidá se kyselina trifluoroctová (1 ml) a Pearlmanův katalyzátor (0,75 g). Tato směs se třepe v atmosféře vodíku (50 psi) po dobu 18 hodin a zfiltruje se přes vrstvu celitu. Roztok se pak promyje nasyceným NaHCO₃, vodou a nasyceným solným roztokem, vysuší se (Na₂SO₄), zfiltruje se se přes MgSO₄ a zahustí se. Z produktu se k odstranění EtOAc odpaří toluen a zbytek se suší ve vysokém vakuu za kvantitativního výtěžku 1,6-bis-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-methoxyfenyl]-hexanu.

Stupeň 3: Tento bis-methylether (25,6 g, 41 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (165 ml) a ochladí se na 0 °C. Pak se pomalu přidá tribromid boru v dichlormethanu (33 ml), odstraní se chladicí lázeň a reakční směs se míchá 20 minut při teplotě místnosti. Pak se reakční směs ochladí v ledové lázni, vstup pro dusík se nahradí sušícím uzávěrem s CaCl₂ a po kapkách se přidá ethanol (35 ml). Tato směs se vlije na led a extrahuje se EtOAc. Organický podíl se oddělí, promyje se vodou, solným roztokem, vysuší se (MgSO₄) a zahuštěním za sníženého tlaku se získá 1,6-bis-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-hydroxyfenyl]hexan (24,2 g, 100 %).



Stupeň 4: K ledově chladnému roztoku bis-fenolu (25,37 g, 42,7 mmol) a tetra-Q-pivaloyl- α -D-mannopyranosylfluoridu (66,4 g, 128 mmol) [I.L.Scott a T.P.Kogan, US patentová přihláška podaná 20.května 1996 nazvaná "High Yield Stereoscopic Mannosylation"] v dichlormethanu (427 ml) se přidá po kapkách $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (47,3 ml, 384 mmol) a ledově chladná směs se míchá 1 hodinu. Tato směs se zředí EtOAc a promyje se vodou (2 x), hydroxidem sodným (2M), vodou a nasyceným chloridem sodným, vysuší se nad síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku. Chromatografickým přečištěním (oxid křemičitý, eluce s hexan/EtOAc s gradientem 30:1 až 6:1) se získá 1,6-bis-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-(tetra-Q-pivaloyl- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]hexan (59,8 g, 89 %).

Stupeň 5: Část A: K roztoku bis-glykosidu v THF (24 ml) se přidá methanol (24,4 ml) a potom ledově chladný roztok čerstvě připraveného methoxidu sodného (ze sodíku, 0,5 g, 22 mmol) v methanolu (24,4 ml) a směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Sraženina se oddělí filtrací a promyje se malým objemem THF/methanol (2:1, 2 x) a potom acetonem. Pevný alkoxid sodný (6,3 g) se pak přečistí dalším mícháním s acetonem a filtrací.

Část B: Sraženina se míchá ve vodě (27 ml) 30 minut při teplotě místnosti. Pak se pH upraví na 14 a udržuje se na hodnotě pH 14 za míchání co nejmenším množstvím hydroxidu sodného (2M). Po 4 hodin lze metodou HPLC na reversní fázi zjistit, že odstranění chránících skupin je úplné. Roztok se zneutralisuje předem promytou iontoměničovou pryskyřicí (Dowex 50, vodíková forma) a zfiltruje se přes celit. Lyofilizací se získá dvojsodná sůl 1,6-bis-{3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D--mannopyranosyloxy)fenyl]hexanu ve formě slabě

23.03.98

hygroskopického bílého prášku (6,0 g, 90 %), t.t. 243–245 °C; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) 7,64 (s, 2H), 7,58 (d, $J=7,7$ Hz, 2H), 7,49 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J=8,4$ Hz, 2H), 7,19 (d, $J=7,3$ Hz, 2H), 7,12 (s, 2H), 7,07 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 5,66 (s, 2H), 4,27 (s, 2H), 4,00–4,20 (m, 4H), 4,04 (dd, $J=12,1$ a $3,3$ Hz, 2H), 3,80–3,92 (m, 6H), 3,72 (d, $J=9,2$ Hz, 2H), 2,52 (m, 4H), 1,60 (br, 4H), 1,39 (br, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) 180,9, 151,5, 138,4, 137,5, 137,4, 132,5, 130,9, 129,1, 129,0, 128,9, 127,3, 117,2, 100,2, 74,2, 70,9, 66,6, 60,9, 45,5, 32,3, 31,6, 29,5; Nalezeno: 57,54 % C, 5,98 % H, 5,12 Na: Vypočteno pro $\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{O}_{16}\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 57,50 % C, 6,08 % H, 4,78 Na.

Příklad 3

1,4-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]butan.

Stupeň 1: 4-(4-methoxyfenyl)máselná kyselina (2,0 g, 10,3 mmol) se zpracuje s thionylchloridem (20 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti 3 hodiny, zahřívá se při 65 °C přes noc a zahuštěním za sníženého tlaku se získá 4-(4-methoxyfenyl)butyrylchlorid (2,3 g) ve formě žlutého oleje, který se použije bez dalšího čištění. IR (NaCl): 1795, 1510, 1244 cm^{-1} .

Surový chlorid kyseliny (2,07 g, 9,7 mmol) a anisol (1,26 g, 11,6 mmol) se rozpustí v 1,2-dichlorethanu (32 ml) a ochladí se v ledové lázni. Tato směs se zpracuje po dávkách s chloridem hlinitým (3,9 g, 29,1 mmol), míchá se 5 minut a pak se smíchá s ledovou vodou (50 ml). Tato směs se extrahuje dichlormethanem (3 x 10 ml), extrakty se spojí, promyjí se nasyceným chloridem sodným (100 ml), vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Rychlou chromatografií na



silikagelu za použití hexan/ethylacetatu 10:1 a následným zahuštěním se získá 1,4-bis-(4-methoxyfenyl)butan-1-on (2,49 g, 82 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,90 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,11 (d, $J=8,4$ Hz, 2H), 6,91 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 6,83 (d, $J=8,4$ Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 2,90 (t, $J=7,3$ Hz, 2H), 2,65 (t, $J=7,7$ Hz, 2H), 2,02 (m, 2H) ppm. IR (NaCl): 1674, 1602, 1244 cm^{-1} .

Stupeň 2: Keton (2,49 g, 8,8 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (30 ml) a zpracuje se s kyselinou trifluor-octovou (2,7 ml, 35,2 mmol), triethylsilanem (2,8 ml, 17,6 mmol), a potom s etheratem trifluoridu boru (4,4 ml, 35,2 mmol). Tato směs se míchá při teplotě místnosti 2 hodiny a potom se ochladí v ledové lázni a smísí se s vodou (50 ml). Směs se pak extrahuje dichlormethanem (3 x 5 ml) a organické frakce se spojí, promyjí se nasyceným chloridem sodným (100 ml), vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Rychlou chromatografií na silikagelu za použití hexan/ethylacetatu 10:1 a pak zahuštěním se získá 1,4-bis-(4-methoxyfenyl)butan (2,0 g, 85 %) ve formě čirého oleje. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,07 (d, $J=8,4$ Hz, 4H), 6,81 (d, $J=8,4$ Hz, 4H), 3,78 (s, 6H), 2,56 (m, 4H), 1,61 (m, 4H) ppm. IR (NaCl): 1605, 1248 cm^{-1} .

Stupeň 3: 1,4-bis-(4-methoxyfenyl)butan (1,78 g, 6,6 mmol) a TMEDA (4,0 ml, 26,5 mmol) se smísí s bezvodým etherem (30 ml) a ochladí se v ledové lázni. Přidá se *n*-butyllithium (10,5 ml roztoku 2,5 M, 26,5 mmol) a směs se zahřeje na teplotu místnosti a míchá se 1 hodinu. Pak se reakční směs ochladí na 0 °C a zpracuje se trimethylboritanem (3,0 ml, 26,5 mmol). Tato směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, pak se reakce přeruší přidávkem 2N HCl (na pH 2) a hodinu se směs míchá. Organická fáze se oddělí a vodný podíl se extrahuje

23.03.99

ethylacetatem (3 x 5 ml). Tyto extrakty se spojí s původní organickou frakcí, vysuší se (MgSO_4) a zahuštěním za sníženého tlaku se získá kyselina boritá (3,0 g), která se dále použije bez čištění. IR (NaCl): 1603, 1490, 1416, 1328, 1234 cm^{-1} .

Surová kyselina boritá a methyl-3-bromfenylacetat (3,8 g, 16,8 mmol) se smísí s dimethoxyethanem (30 ml) a odplyní se pod dusíkem. Tato směs se zpracuje s fosforečnanem draselným (tribázickým) (10,7 g, 50,5 mmol) a s bis(trifenylfosfin)-paladium(II)chloridem (100 mg, 0,17 mmol). Tato směs se opět odplyní a pak se zahřívá 2 hodiny při teplotě zpětného toku načež se ochladí na teplotu místnosti a smísí se s vodou (100 ml). Směs se extrahuje dichlormethanem (3 x 10 ml), extrakty se spojí, promyjí se vodou (50 ml), nasyceným chloridem sodným (50 ml), vysuší se (MgSO_4) a zahustí se za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 , gradientová eluce hexan/ethylacetat v poměru 8:1 až 4:1) se získá 1,4-bis[3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-(4-methoxy)fenyl]butan (1,14 g, 24 %) ve formě čirého oleje. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,41–7,44 (m, 4H), 7,34 (t, $J=7,7$ Hz, 2H), 7,21–7,60 (m, 2H), 7,08–7,13 (m, 4H), 6,87 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 3,77 (s, 6H), 3,68 (s, 6H), 3,66 (s, 4H), 2,61 (m, 4H), 1,67 (m, 4H) ppm. IR (NaCl): 1737, 1606, 1239 cm^{-1} .

Stupeň 4: 1,4-bis[3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-(4-methoxy)fenyl]butan (0,9 g, 1,6 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (3,0 ml), ochladí se v lázni suchého ledu a zpracuje se s tribromidem boru (1,2 ml, 12,8 mmol). Tato směs se míchá při -78 °C tři hodiny a pak se umístí do mrazničky při -10 °C přes noc. Reakce se pak přeruší přidávkem ledové vody (10 ml) a směs se extrahuje dichlormethanem (3 x 5 ml). Organické podíly se spojí, promyjí se vodou (25 ml), nasyceným chloridem sodným (25 ml), vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí

za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 , hexan/ethylacetat 5:1) se získá 1,4-bis-[3-(karbomethoxymethylfenyl)-4-hydroxyfenyl]butan (0,4 g, 47 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,42 (d, $J=7,4$ Hz, 2H), 7,35–7,38 (m, 4H), 7,27–7,32 (m, 2H), 7,02–7,05 (m, 4H), 6,87 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 5,12 (s, 2H), 3,70 (s, 6H), 3,68 (s, 4H), 2,59 (m, 4H), 1,65 (m, 4H) ppm. IR (NaCl): 3439, 1732, 1606, 1263 cm^{-1} .

Stupeň 5: 1,4-bis-[3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-4-hydroxyfenyl]butan (0,4 g, 0,74 mmol) a pentacetat α -D-mannosy (0,72 g, 1,85 mmol) se rozpustí v dichlorethanu (4 ml) a pak se zpracují s etheratem trifluoridu boru (1,1 ml, 8,9 mmol). Tato směs míchá přes noc při teplotě místnosti a pak se reakce přeruší přidávkem vody (10 ml) a směs se extrahuje dichlormethanem (3 x 4 ml). Organické podíly se spojí, promyjí se vodou (15 ml), nasyceným chloridem sodným (20 ml), vysuší se (MgSO_4) a zahustí se za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 , hexan/ethylacetat 2:1) se získá 1,4-bis[3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-4-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]butan (0,88 g, 99 %) ve formě pěny. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,38–7,44 (m, 6H), 7,25–7,29 (m, 2H), 7,17 (br s, 2H), 7,07–7,11 (m, 4H), 5,40 (s, 2H), 5,20–5,30 (m, 6H), 4,15 (dd, $J=12,3, 4,8$ Hz, 2H), 3,93 (dd, $J=12,4, 2,2$ Hz, 2H), 3,76–3,82 (m, 2H), 3,72 (s, 4H), 3,68 (s, 6H), 2,63 (m, 4H), 2,13 (s, 6H), 2,01 (s, 6H), 2,00 (s, 6H), 1,97 (s, 6H), 1,67 (m, 4H), ppm. IR (NaCl): 1748, 1219 cm^{-1} .

Stupeň 6: Tento per-acetat (0,87 g, 0,73 mmol) se rozpustí v acetonitrilu (3 ml) a zpracuje se s roztokem hydratu hydroxidu lithného (0,46 g, 11 mmol ve 2 ml vody) a míchá se přes noc při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku a zbytek se okyselí koncentrovanou

kyselinou chlorovodíkovou na pH 2. Část této směsi se přečistí HPLC na reversní fázi (C₁₈, gradient 20-80 % voda/acetonitril během 45 minut, detekce při 254 nm) za získání 1,4-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α-D-mannopyranosyloxy)fenyl]butanu (230 mg) ve formě bílé pevné látky, t.t.: 195-197 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 7,31-7,39 (m, 6H), 7,20-7,25 (m, 4H), 7,10-7,15 (m, 4H), 5,25 (s, 2H), 4,88 (br d, J=4,0 Hz, 2H), 4,76 (br s, 2H), 4,60 (br s, 2H), 4,45 (br t, J=5,9 Hz, 2H), 3,55-3,68 (m, 5H), 3,62 (s, 4H), 3,40-3,50 (m, 7H), 2,60 (m, 4H), 1,62 (m, 4H) ppm. IR (KBr): 3333, 3229, 1729, 1224 cm⁻¹; nalezeno 61,30 % C, 6,15 % H: vypočteno pro C₄₄H₅₀O₁₆·0,4 TFA; 61,32 % C, 5,79 % H.

Příklad 4

N,N'-bis-[4-(3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α-D-mannopyranosyloxy)fenyl)butan-1-oyl]-4,4'-trimethyldipiperidin.

Stupeň 1: Anhydrid kyseliny jantarové (2,0 g, 19,9 mmol) a chlorid hlinitý (17,7 g, 132 mmol) se smísí s 1,2-dichlorethanem (45 ml) a ochladí v ledové lázni. Tato směs se zpracuje s roztokem etylesteru 3-(2,3,4,6-tetra-O-pivaloyl-α-D-mannopyranosyloxy)fenyl)fenyloctové kyseliny (10,0 g, 13,2 mmol) v dichlorethanu (10 ml) a směs se míchá přes noc tak, že teplota lázně se nechá postupně stoupnout až na teplotu místnosti. Pak se reakční směs smísí s ledovou vodou (100 ml) a míchá se 15 minut. Organické podíly se izolují a vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 5 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO₄) a zahustěním za sníženého tlaku se získá sloučenina 12 (13,5 g), která se použije bez dalšího čištění. IR (NaCl): 1738, 1685, 1228 cm⁻¹.

Stupeň 2: Kyselina (12) (13,5 g, 19,7 mmol) se rozpustí v



dichlormethanu (65 ml) a zpracuje se s etheratem trifluoridu boru (15,3 ml, 122 mmol) a potom s kyselinou trifluorooctovou (9,4 ml, 59,1 mmol). Pak se směs zpracuje s triethylsilanem (9,4 ml, 59,1 mmol) a míchá se přes noc při teplotě místnosti. Reakční směs se pak smísí s vodou (200 ml) a organické podíly se oddělí. Vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 10 ml) a tyto extrakty se spojí s původním organickým podílem, vysuší se (MgSO_4) a zahuštěním za sníženého tlaku se získá 4-(3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-(2,3,4,6-tetra-O-pivaloyl- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl)butanová kyselina (13) (1,49 g, 97 %) ve formě čirého oleje. IR (NaCl): 1737, 1132 cm^{-1} .

Stupeň 3: Kyselina 13 (16,0 g, 23,8 mmol) se smísí s thionylchloridem (50 ml), směs se míchá 36 hodin při teplotě místnosti a zahuštěním za sníženého tlaku se získá chlorid kyseliny 14 (16,3 g, 99 %) který se použije bez dalšího čištění. IR (NaCl): 2974, 1797, 1740, 1135 cm^{-1} .

Stupeň 4: K roztoku chloridu kyseliny 14 (2,8 g, 3,26 mmol) v dichlormethanu (5 ml) se při 0 $^{\circ}\text{C}$ přidá 4,4'-trimethyldipiperidin (0,4 g, 1,9 mmol) v dichlormethanu (5 ml). Přidá se triethylamin (0,61 ml, 4,4 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (35 mg, 10 mol %) a směs se míchá 1 hodinu při teplotě místnosti a pak se smíchá s vodou (20 ml). Organické podíly se promyjí nasyceným chloridem sodným (20 ml), vysuší se (MgSO_4) a zahustí se za sníženého tlaku. Přечиštěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 , ethylacetat:hexan 2:1) se získá bis-amid 15 (1,1 g, 18 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,40–7,45 (m, 4H), 6,98–7,30 (m, 10H), 5,25–5,42 (m, 6H), 4,09–4,19 (m, 4H), 3,50–3,96 (m, 8H), 2,62–2,69 (m, 4H), 2,28–2,36 (m, 4H), 1,90–2,02 (m, 4H), 1,60–1,74 (m, 6H), 1,35–1,50 (m, 2H), 1,24 (s, 18H), 1,11 (s, 36H), 1,08–1,28 (m, 26H). IR (NaCl): 1739 cm^{-1} .

23.03.98

Stupeň 5: Bis-amid 15 (1,0 g, 0,54 mmol) se rozpustí v THF (3 ml) a zpracuje se s vodným hydroxidem sodným (0,40 g, 10 mmol, ve 3 ml vody). Tato směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Pak se THF odstraní za sníženého tlaku, zbytek se okyselí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 2 a přečištěním HPLC na reversní fázi se získá N,N'-bis-[4-(3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyloxy)fenyl)-butan-1-oyl]-4,4'-trimethyldipiperidin (17) (30 mg, 5 %) ve formě bílé pevné látky, t.t.: 119-121 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 7,32-7,40 (m, 6H), 7,20-7,27 (m, 4H), 7,10-7,14 (m, 4H), 5,26 (br s, 2H), 4,36 (br d, $J=11$ Hz, 2H), 4,05 (br s, 8H), 3,77 (br d, $J=11$ Hz, 2H), 3,50-3,70 (m, 8H), 3,40-3,52 (m, 5H), 3,31-3,40 (m, 2H), 2,92 (br t, $J=14$ Hz, 2H), 2,55-2,62 (m, 4H), 2,42-2,53 (m, 3H), 2,27-2,34 (m, 4H), 1,73-1,82 (m, 4H), 1,57-1,67 (m, 4H), 1,36-1,47 (m, 2H), 1,22-1,33 (m, 2H), 1,11-1,20 (m, 4H), 0,80-1,02 (m, 4H). IR (KBr): 3415, 1713, 1609 cm^{-1} . MS(FAB): 1150(M^+ + Na). Analýza: vypočteno pro $\text{C}_{61}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{18}$. 1,4 TFA: 59,54 % C, 6,22 % H, 2,18 % N. Nalezeno: 59,65 % C, 6,56 % H, 2,23 % N.

Příklad 5

Di-6-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)-fenyl]hexylether.

Stupeň 1: K bezvodému dichlormethanu (10ml) se přidá při -78 °C oxalylchlorid (1,65 ml, 2M v dichlormethanu, 3,30 mmol). Pak se po kapkách, během několika minut přidá dimethylsulfoxid (0,56 ml, 7,26 mmol) a vzniklý roztok se míchá 10 minut. Po kapkách se přidá ethyl-6-hydroxyhexanoat (0,50 ml, 3,07 mmol) a za třicet minut se přidá po kapkách triethylamin (2,10 ml, 15,1 mmol). Odstraní se chladicí lázeň



a za 15 minut se přidá voda (10 ml). Směs se míchá 10 minut, vrstvy se rozdělí a vodná vrstva se extrahuje dichlormethanem. Organické vrstvy se spojí a vysuší (MgSO_4) a pak se rozpouštědlo odstraní ve vakuu. Chromatografií na silikagelu (hexany:ethylacetat 2:1) se získá čistý produkt (0,44 g, 91 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 9,75 (1H), 4,10 (2H), 2,45 (2H), 2,30 (2H), 1,65 (4H), 1,24 (3H).

Stupeň 2: Triethylsilan (0,89 ml, 5,57 mmol) a triethylsilyltrifluormethansulfonat (63 ml, 0,28 mmol) se rozpustí v bezvodém dichlormethanu (6 ml) při 0 °C a přidá se roztok 5-karboethoxypentanal (0,44 g, 2,78 mmol) v dichlormethanu (3 ml). Odstraní se chladicí lázeň a reakční směs se míchá 80 minut při teplotě místnosti. Pak se rozpouštědlo odstraní ve vakuu a přečištěním zbytku chromatografií na silikagelu (hexany:ethylacetat 6:1) se získá produkt (0,31 g, 74 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 4,10 (4H), 3,37 (4H), 2,28 (4H), 1,60 (8H), 1,36 (4H), 1,24 (6H).

Stupeň 3: Di-5-karboethoxypentylether (0,16 g, 0,53 mmol) se rozpustí v methanolu (1 ml) a přidá se 1N hydroxid sodný (1,05 ml, 1,05 mmol). Vzniklý roztok se míchá 3 hodiny při teplotě místnosti. Methanol se odstraní za sníženého tlaku a zbylý roztok se okyselí (koncentrovaná HCl) a extrahuje se dvěma podíly diethyletheru. Extrakty se spojí, vysuší se (MgSO_4) a zahustí se za sníženého tlaku. Tento zbytek se znovu dvakrát zahustí z acetonitrilu a získá se produkt ve formě bílé pevné látky (0,16 g, kvantitativně). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 3,40 (4H), 2,36 (4H), 1,60 (8H), 1,42 (4H).

Stupeň 4: Di-5-karboxypentylether (0,15 g, 0,53 mmol) a DMF (1 kapka) se rozpustí v bezvodém dichlormethanu (2,5 ml) a vzniklý roztok se ochladí na 0 °C. Pomalu se přidá roztok

23.03.98

oxalylchloridu (0,59 ml 2M v dichlormethanu, 1,18 mmol). Reakční směs se míchá 5 minut při 0 °C, pak se chladicí lázeň odstraní a v míchání se pokračuje 20 minut při teplotě místnosti. Roztok se pak ochladí na 0 °C a přidá se roztok ethylesteru 3-(2-methoxyfenyl)fenyloctové kyseliny (0,29 g, 1,07 mmol) v dichlormethanu (1 ml). Ve třech dávkách po jednominutových intervalech se pak přidá chlorid hlinitý (0,17 g, 0,17 g, 0,08 g, celkem 3,15 mmol). Roztok se pak míchá pět minut, potom se vlije na led a extrahuje se dvěma podíly ethylacetatu. Organické vrstvy se spojí, promyjí se vodou, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného. Získaný roztok se vysuší (MgSO_4) a zahustí se za sníženého tlaku. Chromatografií na silikagelu (gradient 4:1 až 1:1 hexany:ethylacetat) se získá produkt ve formě žlutého oleje (0,34 g, 85 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,91 (4H), 7,41 (6H), 7,28 (2H), 6,99 (2H), 4,14 (4H), 3,86 (6H), 3,66 (4H), 3,40 (4H), 2,94 (4H), 2,16 (4H), 1,75 (4H), 1,59 (4H), 1,43 (4H), 1,26 (6H).

Stupeň 5: Di-6-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-methoxyfenyl]-6-oxohexylether (0,34 g, 0,45 mmol) se rozpustí v bezvodém dichlormethanu (2,5 ml) a vzniklý roztok se ochladí na 0 °C. Přidá se kyselina trifluoroctová (0,23 ml, 3,0 mmol), potom triethylsilan (0,29 ml, 1,8 mmol) a etherat trifluoridu boru (0,33 ml, 2,7 mmol). Pak se odstraní chladicí lázeň a reakční směs se míchá 1 hodinu při teplotě místnosti. Přidá se dichlormethan a získaná směs se extrahuje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou. Organická vrstva se vysuší (MgSO_4) a zahustí se za sníženého tlaku. Chromatografií na silikagelu (Hexan:ethylacetat 6:1) se získá produkt ve formě čirého oleje (0,23 g, 71 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,42 (4H), 7,35 (2H), 7,25 (2H), 7,09 (4H), 6,87 (2H), 4,16 (4H), 3,77 (6H), 3,65 (4H), 3,37 (4H), 2,57 (4H), 1,57 (10H), 1,35

23.03.98

(8H), 1,25 (6H).

Stupeň 6: Di-6-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-methoxy-fenyl]hexylether (0,23 g, 0,32 mmol) se rozpustí v suchém dichlormethanu (1,6 ml) a roztok se ochladí na 0 °C. Po kapkách se přidá roztok tribromidu boru (1M v dichlormethanu, 1,40 mmol) a chladicí lázeň se odstraní. Po dvaceti minutách se roztok opět ochladí na 0 °C a po kapkách se přidá absolutní ethanol (1 ml). Reakční směs se pak vlije na led a extrahuje se ethylacetatem. Organická vrstva se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší se (MgSO₄) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Chromatografií na silikagelu (hexany:ethylacetat 2:1 až 1:1) se získá produkt (0,11 g, 50 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7,42 (8H), 7,04 (4H), 6,88 (2H), 5,14 (2H), 4,16 (4H), 3,67 (4H), 3,38 (4H), 2,57 (4H), 1,85 (4H), 1,62 (6H), 1,40 (6H), 1,27 (6H).

Stupeň 7: 2,3,4,6-tetra-O-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl-fluorid (0,52 g, 1,00 mmol) a di-6-[3-karboethoxymethylfenyl)-hydroxyfenyl]hexylether (0,23 g, 0,33 mmol) se rozpustí v suchém dichlormethanu (2 ml) a roztok se ochladí na 0 °C. Pomalu se přidá etherat trifluoridu boru (0,38 ml, 3,10 mmol) a reakční směs se míchá 90 minut. Pak se reakční směs zředí ethylacetatem a promyje dvěma podíly vody, potom 1N NaOH, vodou, a nasyceným roztokem chloridu sodného. Výsledný roztok se vysuší (MgSO₄) a zahustí se za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku chromatografií na silikagelu (hexany:ethylacetat 15:1) se získá produkt (0,45 g, 82 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7,45 (7H), 7,15 (7H), 5,32 (8H), 4,14 (4H), 3,86 (4H), 3,72 (4H), 3,54 (2H), 3,40 (4H), 2,59 (4H), 1,85 (4H), 1,62 (4H), 1,46 (4H), 1,36 (4H), 1,26 (24H), 1,15 (18H), 1,10 (36H).

Stupeň 8: Di-6-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-(2,3,4,6-

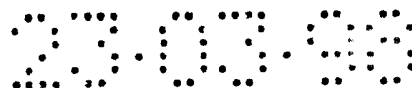
23.03.99

tetra-O-pivaloyl- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]hexylether (0,45 g, 0,27 mmol) se rozpustí v bezvodém tetrahydrofuranu (0,9 ml) a methanolu (1,8 ml). Přidá se methoxid sodný (49 mg, 0,84 mmol) a reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Přidá se další podíl methoxidu sodného (50 mg, 0,93 mmol) a po čtyřech hodinách třetí podíl (112 mg, 2,07 mmol). Reakce se nechá probíhat další čtyři hodiny, potom se směs zfiltruje, oddělená pevná látka se pak promyje směsí tetrahydrofuranu a methanolu v poměru 2:1. Pak se pevná látka rozpustí ve vodě (1 ml) a přidává se hydroxid sodný až do dosažení hodnoty pH 14. Tento roztok se pak míchá čtyři hodiny a potom se zneutralizuje předem promytou iontoměničovou pryskyřicí Dowex 50 (v H^+ formě). Pryskyřice se odfiltruje a filtrát se lyofilizuje. Produkt se pak vysuší ve vakuu nad P_2O_5 a získá se di-6-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]hexyletheru (0,21 g, 78 %). 1H NMR (400 MHz, CD_3CN/D_2O): 7,46 (2H), 7,34 (2H), 7,16 (10H), 5,31 (2H), 3,79 (2H), 3,66 (2H), 3,57 (4H), 3,42 (5H), 3,28 (2H), 2,56 (4H), 1,80 (4H), 1,60 (4H), 1,36 (6H).

Příklad 6

S,S-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyloxy)-3-fenylprop-1-yl]-1,3-dithiopropán

Stupeň 1: Část A: Ethylester 3-(2-methoxyfenyl)fenyl-octové kyseliny (5,04 g, 18,66 mmol) a 3-brompropionylchlorid (1,88 ml, 18,66 mmol) se smísí s dichlorethanem (30 ml). Tato směs se ochladí v lázni led-voda a zpracuje s chloridem hlinitým (7,6 g, 57 mmol). Po 15 minutách se reakční směs smísí s vodou s ledem (100 ml) a organické podíly se oddělí. Vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 5 ml), organické podíly se spojí, vysuší se ($MgSO_4$) a zahustí se za sníženého



tlaku. Zbytek se použije v dalším stupni bez dalšího čištění.

Část B: Produkt ze stupně A (8,5 g, 19 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (40 ml) a ochladí se v lázni led-voda. Přidá se kyselina trifluoroctová (5,9 ml, 76 mmol), triethylsilan (6,1 ml, 38 mmol) a potom etherat trifluoridu boru (9,4 ml, 76 mmol) a chladicí lázeň se odstraní. Tato směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, pak se ochladí v ledové lázni a přidá se studená voda k ukončení reakce (100 ml). Organické podíly se oddělí, vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 10 ml), organické podíly se spojí, promyjí se nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml), vysuší se (MgSO_4) a zahuštěním za sníženého tlaku se získá ethylester 3-(2-methoxyfenyl-5-(3-brompropyl)fenyloctové kyseliny (6,53 g, 90 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,41–7,45 (m, 2H), 7,36 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7,25–7,28 (m, 1H), 7,12–7,16 (m, 2H), 6,90 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 4,15 (q, $J=7,0$ Hz, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,67 (s, 2H), 3,41 (t, $J=6,6$ Hz, 2H), 2,75 (t, $J=7,0$ Hz, 2H), 2,15 (m, 2H), 1,26 (t, $J=7,3$ Hz, 3H), IR (NaCl): 1736 cm^{-1} .

Stupeň 2: Roztok 1,3-propandithiolu (0,109 g, 0,94 mmol) v THF (4,5 ml) se odplyní pod dusíkem a ochladí se v lázni led-voda. Přidá se hydrid sodný (86,5 mg, 2,1 mmol) a směs se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti. Přidá se roztok bromidu ze stupně 1 (0,83 g, 2,12 mmol) v THF (1,0 ml) a směs se míchá přes noc při teplotě zpětného toku. Pak se reakční směs rozdělí mezi vodu a ethylacetat (20 ml v poměru 1:1), organické podíly se oddělí, promyjí se nasyceným chloridem sodným (20 ml), vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Zbytek přečištěním rychlou chromatografií (SiO_2 , gradientová eluce hexan až hexan/ethylacetat 3:1) poskytne S,S-bis-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-(methoxy)-3-fenylprop-1-yl]-1,3-dithiopropán (166,2 mg, 24 %). ^1H NMR

23.03.98

(400 MHz, CDCl_3): 7,39–7,45 (m, 4H), 7,32–7,38 (m, 2H), 7,21–7,28 (m, 2H), 7,08–7,15 (m, 4H), 6,85–6,92 (m, 2H), 4,14 (q, $J=7,0$ Hz, 4H), 3,77 (s, 6H), 3,65 (s, 4H), 2,80–2,95 (m, 2H), 2,77 (t, $J=7,3$ Hz, 2H), 2,68 (t, $J=8,0$ Hz, 4H), 2,60 (t, $J=7,0$ Hz, 2H), 2,52 (t, $J=7,0$ Hz, 2H), 2,04–2,16 (m, 2H), 1,81–1,93 (m, 4H), 1,25 (t, $J=7,0$ Hz, 6H). IR (NaCl): 1731 cm^{-1} .

Stupeň 3: Roztok bis-thioetheru ze stupně 2 (70,7 mg, 0,1 mmol) v dichlormethanu se ochladí v lázni suchý led-aceton a zpracuje se tribromidem boru (0,8 ml 1M roztoku v dichlormethanu, 0,8 mmol) a směs se nechá stát přes noc při -10 °C. Pak se reakční směs smísí s vodou (10 ml) a směs se extrahuje dichlormethanem (3 x 2 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO_4) a zahuštěním za sníženého tlaku se získá S,S-bis-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-(hydroxy)-3-fenylprop-1-yl]-1,3-dithiopropán (68 mg, 100 %). ^1NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,43 (t, $J=7,7$ Hz, 2H), 7,34–7,39 (m, 4H), 7,30 (br d, $J=7,3$ Hz, 2H), 7,03–7,08 (m, 4H), 6,87 (br d, $J=8,8$ Hz, 2H), 4,96–5,30 (br s, 2H), 4,15 (q, $J=7,0$ Hz, 4H), 3,66 (s, 4H), 2,66 (t, $J=7,3$ Hz, 4H), 2,60 (t, $J=7,0$ Hz, 2H), 2,52 (t, $J=7,0$ Hz, 4H), 1,80–1,92 (m, 6H), 1,26 (t, $J=7,3$ Hz, 6H), 1,21–1,27 (m, 2H). IR (NaCl): 3420, 1726 cm^{-1} .

Stupeň 4: Fenol (0,47 g, 0,68 mmol) a pentaacetat α -D-mannosy (0,8 g, 2,0 mmol) se smísí s dichlorethanem (8 ml) a směs se zpracuje s etheratem trifluoridu boru (1,0 ml, 8,0 mmol). Reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti a pak se reakce ukončí přidávkou vody (10 ml). Organické podíly se oddělí a vodná vrstva se extrahuje dichlormethanem (3 x 2 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 , gradientová eluce hexan/ethylacetat 3:1

23.03.99

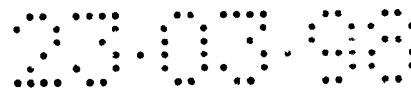
až 1:1) se získá S,S-bis-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-3-fenylprop-1-yl]-1,3-dithiopropán (0,331 g, 36 %) IR (NaCl): 1752 cm^{-1} .

Stupeň 5: Per-acetat (0,64 g, 0,47 mmol) se rozpustí v acetonitrilu (5 ml) a zpracuje s roztokem hydroxidu sodného (5,0 ml 2N roztoku, 10 mmol) a pak se míchá při teplotě místnosti přes noc. Směs se okyselí koncentrovanou HCl na pH 2 a těkavé látky se odstraní za sníženého tlaku. Část vodného zbytku se přečistí chromatografií na reverzní fázi a získá se tak S,S-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyloxy)-3-fenylprop-1-yl]-1,3-dithiopropán jako bílá pevná látka o t.t.: 96-100 $^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 7,31-7,39 (m, 6H), 7,20-7,27 (m, 4H), 7,11-7,15 (m, 4H), 5,26 (s, 2H), 3,30-3,75 (m, 28H), 2,64 (t, $J=7,7$ Hz, 4H), 2,57 (t, $J=7,0$ Hz, 4H), 2,45-2,52 (m, 4H), 1,75-1,84 (m, 4H), 1,66-1,74 (m, 2H). IR (KBr): 3430, 1711 cm^{-1} .

Příklad 7

1,6-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyloxy)-fenyl]-1,6-bis-oxohexan.

Stupeň 1: Ethylester 3-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl)octové kyseliny (0,56 g, 0,96 mmol) a adipoylchlorid (0,068 ml, 0,47 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (5ml), ochladí se v lázni led-voda a zpracují se se chloridem hlinitým (2,56 g, 19,2 mmol). Po 1,5 hodině se reakční směs smísí s ledovou vodou (25 ml) a míchá se 15 minut. Organické podíly se vyizolují a vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 2 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO_4) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 ,



hexan/ethylacetat 1:1) se získá 1,6-bis-[3-(3-karboethoxy-methylfenyl)-4-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-fenyl]-1,6-bis-oxohexan (0,43 g, 35 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 8,00 (d, $J=2,2$ Hz, 2H), 7,93 (dd, $J=8,6$, 2,2 Hz, 2H), 7,42-7,48 (m, 6H), 7,31-7,35 (m, 2H), 7,25-7,29 (m, 2H), 5,60 (d, $J=0,2$ Hz, 2H), 5,31-5,34 (m, 2H), 5,28 (d, $J=9,1$ Hz, 2H), 5,23-5,28 (m, 2H), 4,21 (dd, $J=12,3$, 5,1 Hz, 2H), 4,15 (q, $J=7,4$ Hz, 4H), 3,98 (dd, $J=12,4$, 2,2 Hz, 2H), 3,79-3,85 (m, 2H), 3,73 (s, 4H), 3,00-3,06 (m, 4H), 2,17 (s, 6H), 2,03 (s, 6H), 2,01 (s, 6H), 1,98 (s, 6H), 1,81-1,85 (m, 4H), 1,26 (t, $J=7,5$ Hz, 6H). IR (NaCl): 1747, 1680 cm^{-1} .

Stupeň 2: Per-acetat (0,43 g, 0,33 mmol) se rozpustí v acetonitrilu (4 ml) a roztok se míchá s 2N hydroxidem sodným (1,8 ml, 3,6 mmol). Po 18 hodinách při teplotě místnosti se reakční směs zneutralizuje iontoměničovou pryskyřicí Dowex 50W v kyselé formě a těkavé složky se odstraní za sníženého tlaku. Přечиštěním části zbytku HPLC na reverzní fázi se získá 1,6-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyloxy)-fenyl]-1,6-bis-oxohexan ve formě bílé pevné látky o t.t.: 127-129 $^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7,98 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,90 (s, 2H), 7,35-7,48 (m, 8H), 7,27 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 5,53 (s, 2H), 3,71 (s, 2H), 3,66 (s, 4H), 3,60 (d, $J=11,4$ Hz, 2H), 3,42-3,51 (m, 6H), 3,28-3,35 (m, 2H), 3,07-3,15 (m, 4H), 1,67-1,73 (m, 4H), IR (KBr): 3430, 1716, 1672 cm^{-1} . Analýza: vypočteno pro $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{O}_{18} \cdot 0,6 \text{ TFA}$: 59,10 % C, 5,32 % H. Nalezeno: 58,92 % C, 5,68 % H.

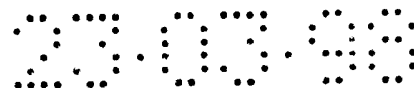
Příklad 8

1,3,5-tris-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)fenylmethyl]benzen.



Stupeň 1: 1,3,5-benzentrikarbonyltrichlorid (1,0 g, 3,8 mmol) se rozpustí v 1,2-dichlorethanu (20 ml). Přidá se chlorid hlinitý (2,6 g, 18,8 mmol) a potom methylester 3-(2-methoxyfenyl)fenyloctové kyseliny (4,8 g, 18,8 mmol) a směs se zahřívá přes noc při 65 °C. Po ochlazení v ledové lázni se pomalu přidá ledová voda (20 ml). Organické podíly se vyizolují a vodný podíl se extrahuje methylenchloridem (3 x 5 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO₄) a zahustí se za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO₂, gradientová eluce hexan až hexan/ethylacetat 1:1) se získá triketon 33 (f=1), (1,05 g, 30 %). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8,38 (d, J=1,5Hz, 3H), 7,93 (m, 3H), 7,80-7,83 (m, 3H), 7,45 (m, 6H), 7,38 (t, J=7,3 Hz, 3H), 7,21-7,29 (m, 3H), 6,95 (dd, J=8,76, 1,44 Hz, 3H), 3,88 (s, 9H), 3,67 (s, 6H), 3,66 (s, 9H) ppm. IR (NaCl): 1734, 1654 cm⁻¹.

Triketon 33 (3,13 g, 3,4 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (16 ml), ochladí se v ledové lázni a zpracuje se s triethylsilanem (3,8 ml, 23,7 mmol), kyselinou trifluorooctovou (2,6 ml, 33,8 mmol) a diethyletheratem trifluoridu boru (4,3 ml, 33,8 mmol). Směs se míchá při teplotě místnosti 1 hodinu a pak se smísí s vodou (25 ml). Organické podíly se vyizolují a vodný podíl se extrahuje methylenchloridem (3 x 5 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO₄) a pak se zahustí za sníženého tlaku. Rychlou chromatografií zbytku na silikagelu s použitím hexan:ethylacetat 3:1 a zahuštěním se získá 1,3,5-tris-[3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-4-(2-methoxy)fenylmethyl]benzen (0,88 g, 28 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7,38-7,43 (m, 6H), 7,33 (t, J=7,68 Hz, 3H), 7,23 (s, 3H), 7,14 (d, J=2,2 Hz, 3H), 7,08 (dd, J=8,08, 1,84 Hz, 3H), 6,90 (s, 3H), 6,85 (d, J=8,4 Hz, 3H), 3,89 (s, 6H), 3,76 (s, 9H), 3,68 (s, 9H), 3,66 (s, 6H) ppm. IR (NaCl): 1738 cm⁻¹.



Stupeň 3: Část A: 1,3,5-tris-[3-(3-karbomethoxymethyl-fenyl)-4-(2-methoxy)fenylmethyl]benzen (0,88 g, 1,0 mmol) se rozpustí v dichlormethanu (5 ml) a zchladí v lázni suchý led/aceton. Potom se pomalu přidá tribromid boru (0,7 ml, 7,0 mmol) a směs se míchá 2 hodiny při 0 °C a pak se smíchá s vodou s ledem (10 ml). Organické podíly se vyizolují a vodný podíl se extrahuje methylenchloridem (3 x 5 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO_4) a zahuštěním ve vakuu se získá 0,82 g surového produktu.

Část B: Zbytek získaný v části A se smísí s methanolem (20 ml) a přidá se kyselina sírová (1 ml). Tato směs se zahřívá při teplotě zpětného toku přes noc a pak se zahustí za sníženého tlaku. Zbytek se smísí s dichlormethanem (20 ml) a nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml). Organická fáze se oddělí, vysuší se (MgSO_4) a zahustí se za sníženého tlaku. Rychlou chromatografií zbytku přes silikagel směsí hexan:ethylacetat 1:1 a následným zahuštěním se získá 1,3,5-tris-[3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-4-(2-hydroxy)-fenylmethyl]benzenu (0,63 g, 75 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7,20–7,50 (m, 12H), 7,0 (d, $J=2,2$ Hz, 2H), 6,98 (s, 2H), 6,95 (dd, $J=8,08$, 2,2 Hz, 2H), 6,83 (s, 3H), 6,77 (d, $J=8,44$, 3H), 3,85 (s, 6H), 3,69 (s, 9H), 3,66 (s, 6H) ppm. IR (NaCl): 3429, 1737 cm^{-1} .

Stupeň 4: Trifenol (0,62 g, 0,7 mmol) se rozpustí v 1,2-dichlorethanu (4 ml), přidá se pentaacetat α -D-mannosy (1,4 g, 3,7 mmol) a potom se pomalu přidá etherat trifluoridu boru (1,6 ml, 13,3 mmol). Tato směs se míchá přes noc při teplotě místnosti a pak se smísí s vodou (10 ml). Organický podíl se oddělí a vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 2 ml). Organické frakce se spojí, vysuší se (MgSO_4) a

23.03.98

zahustí se za sníženého tlaku. Přečištěním zbytku rychlou chromatografií (SiO₂, gradientová eluce, hexan až 2:1 ethylacetat:hexan) se získá

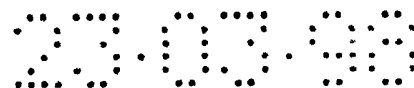
1,3,5-tris-[3-(3-karbomethoxymethylfenyl)-4-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl)- α -D-mannopyranosyloxy)fenylmethyl]benzenu (0,9 g, 67 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 6,98–7,50 (m, 21H), 6,86 (s, 3H), 5,26 (m, 3H), 3,90–3,93 (m, 6H), 3,89 (s, 6H), 3,71 (s, 6H), 3,66 (s, 9H), 1,94–2,13 (m, 36H) ppm. IR (NaCl): 1745 cm⁻¹.

Stupeň 5: Per-acetat (0,88 g, 0,48 mmol) se rozpustí v acetonitrilu (2 ml) a zpracuje se s monohydratem hydroxidu lithného (0,4 g, 9,6 mmol) ve vodě (2 ml). Směs se míchá při teplotě místnosti přes noc a potom se okyselí kyselinou chlorovodíkovou na pH 2. Tato směs se zahustí za sníženého tlaku a přečištěním zbytku HPLC (reverzní fáze C-18, gradientová eluce 20–80% acetonitrilem ve vodě, detekce při 254 nm) se získá 1,3,5-tris-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)fenylmethyl]benzenu (0,35 g, 57 %) ve formě bílé pevné látky o t.t.: 155–158 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 7,27–7,34 (m, 9H), 7,17–7,22 (m, 9H), 7,08–7,10 (dd, J=8,44, 1,70 Hz, 3H), 7,01 (s, 3H), 5,24 (s, 3H), 3,85 (s, 6H), 3,33–3,64 (m, 24H) ppm. IR (KBr): 3431, 1710 cm⁻¹. Analýza: vypočteno pro C₆₉H₇₂O₂₄·1,0 TFA: 60,94 % C, 5,26 % H. Nalezeno: 60,85 % C, 5,23 % H.

Příklad 9

1,3,5-tris-[4-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]-4-oxo-2-thiobutyl]benzen.

Stupeň 1: Ethylester 3-(2-(2-,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl)fenyloctové kyseliny (0,32 g, 0,547



mmol) a broacetyl bromid (0,06 ml, 0,689 mmol) se rozpustí v dichlorethanu (3 ml) a ochladí v lázni suchý led/acetón. Tato směs se zpracuje chloridem hlinitým (1,45 g, 10,9 mmol) a uvedená lázeň se nahradí lázní led-voda. Po 15 minutách se reakční směs smísí s vodou (25 ml) a míchá se 15 minut. Organické podíly se oddělí a vodný podíl se extrahuje dichlormethanem (3 x 2 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO_4) a pak se zahuštěním za sníženého tlaku získá 0,387 g produktu, který se použije bez dalšího čištění. ^1NMR (400 MHz, CDCl_3): 8,03 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 7,95 (dd, $J=8,8$, 2,5 Hz, 1H), 7,41–7,47 (m, 3H), 7,35 (m, 1H), 7,31 (d, $J=8,8$ Hz, 1H), 5,62 (d, $J=1,8$ Hz, 1H), 5,21–5,34 (m, 3H), 4,42 (s, 2H), 4,10–4,25 (m, 5H), 3,99 (dd, $J=12,1$, 2,2 Hz, 1H), 3,80–3,85 (m, 1H), 3,74 (s, 2H), 2,18 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,26 (t, $J=8,0$ Hz, 3H). IR (NaCl): 1746, 1220 cm^{-1} .

Stupeň 2: 1,3,5-tris-(merkaptomethyl)benzen (102 mg, 0,47 mmol) v THF (1 ml) se zpracuje s hydridem sodným (59,8 mg, 1,49 mmol) a tato směs se míchá 30 minut při teplotě místnosti. Přidá se roztok α -bromketonu ze stupně 1 (1,02 g, 1,44 mmol) v THF (2,0 ml) a směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Reakční směs se smísí s vodou (10 ml) a extrahuje ethylacetatem (3 x 5 ml). Organické podíly se spojí, vysuší se (MgSO_4) a zahustí se za sníženého tlaku. Přечиštěním zbytku rychlou chromatografií (SiO_2 , gradientová eluce, hexan/ethylacetat 3:1 až 1:1) se získá 1,3,5-tris-[4-[3-(3-karboethoxymethylfenyl)-4-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]-4-oxo-2-thiobutyl]benzenu (0,59 g, 60 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7,98 (d, $J=2,5$ Hz, 3H), 7,89 (dd, $J=8,8$, 2,5 Hz, 3H), 7,40–7,46 (m, 6H), 7,25–7,35 (m, 12H), 5,61 (s, 3H), 5,22–5,33 (m, 9H), 4,10–4,25 (m, 10H), 3,97 (dd, $J=12,1$, 2,2 Hz, 3H), 3,78–3,84 (m, 3H), 3,72 (s, 6H), 3,69 (s,

23.03.99

3H), 3,64 (s, 3H), 2,16 (s, 9H), 2,02 (s, 9H), 2,01 (s, 9H), 1,97 (s, 9H), 1,25 (t, $J=8,0$ Hz, 9H). IR (NaCl): 1747, 1219 cm^{-1} .

Stupeň 3. Triester per-acetatu ze stupně 2 (0,59 g, 0,28 mmol) se zpracuje s roztokem čerstvě připraveného methoxidu sodného (93 mg, 4,04 mmol ve 3 ml methanolu) a směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Vytvořená sraženina se oddělí vakuovou filtrací a promyje se několikrát směsí THF/methanol 2:1 a vysušením ve vakuu se získá 0,38 g bílé pevné látky. Tato pevná látka se rozpustí ve vodě (12 ml), k úpravě pH na 14 se přidá hydroxid sodný 2N a směs se míchá 4 hodiny při teplotě místnosti. Pak se reakční směs okyselí iontoměničovou pryskyřicí v kyselé formě Dowex 50W, zfiltruje se a těkavé podíly se odstraní za sníženého tlaku. Podíl vodného zbytku se přečistí chromatografií na reverzní fázi a získá se 1,3,5-tris-[4-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]-4-oxo-2-thiobutyl]benzenu ve formě bílé pevné látky o t.t.: 140–143 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 7,95 (dd, $J=8,8, 2,5$ Hz, 3H), 7,89 (d, $J=2,2$ Hz, 3H), 7,32–7,45 (m, 12H), 7,26 (d, $J=7,3$ Hz, 3H), 7,16–7,20 (m, 3H), 5,54 (s, 3H), 5,05 (br s, 3H), 4,85 (br s, 3H), 4,70 (br s, 3H), 4,50 (br s, 3H), 3,88–3,92 (m, 6H), 3,58–3,73 (m, 18H), 3,40–3,49 (m, 6H), 3,30–3,40 (m, 6H plus H_2O). IR (KBr): 3429, 1708, 1669 cm^{-1} . Analýza: vypočteno pro $\text{C}_{75}\text{H}_{78}\text{O}_{27}\text{S}_3 \cdot 1,8 \text{ TFA}$: 55,12 % C, 4,79 % H. Nalezeno: 55,14 % C, 5,20 % H.

Příklad 10

Stanovení vazby

Stanoví se schopnost inhibice vazby E-, P- a nebo L-selektinu k sialyl-Lewis^X.

23.03.98

E-selektinové stanovení vazby zahrnuje hodnocení buněk HL 60 které exprivují sialyl-Lewis^x a Lewis ve vztahu k čištěným E-selektinovým, P-selektinovým a L-selektinovým rekombinantním proteinům (stanovení buňka-protein). Podobné stanovení vazby které využívá čištěné glykolipidy a čištěný L-selektinový rekombinantní protein (glykolipid-protein) se použije k hodnocení L-selektinové vazby.

Stanovení buňka-protein

E-selektin, P-selektin a L-selektin se exprivují v rekombinantní rozpustné formě jako fúsní proteiny mající aminotermiální lektin, EGF, a "repeaty" (CR) podobné "repeatům" regulujícím komplement 1 a 2 navázaný na pantový region a konstantní regiony těžkých řetězců 1 a 2 myších IgG_{2A}cDNA. Všechny selektinové fúsní kazety byly generovány pomocí PCR z E-selektin cDNA získané od R & D Systems (Minneapolis, MN) a z P-selektin a L-selektin cDNA které byly PCR klonovány z celkové RNA extrahované z lidské placenty. Myší IgG cDNA se klonuje z PCR amplifikované cDNA generované z RNA extrahované z hybridní buněčné linie 402C10. Všechny fúsní kazety se exprivují z bakulovirových vektorů za použití způsobu BakPAK a SF21 buněk od Clonetech.

Rekombinantní fúsní proteiny se purifikují ze supernatantů bakulovirem infikovaných kultur imunosrážením za použití DynaluTM, magnetických perliček, potažených kozím anti-myším IgG. Srovnávací perličky byly generovány ze supernatantů kultur neinfikovaných SF21. Po imunosrážení, perličky inkubované s kulturami srovnávacích supernatantů neváží buňky HL60 které exprivují sialyl-Lewis^x a jsou negativní kontrolou. Perličky inkubované ze supernatantů kultur E-, L- nebo P-

23.03.98

selektinu neváží buňky HL60.

HL60 buňky (10^7 buněk) se fluorescenčně označí kalceinem AMC-3099 (Molecular Probes) v RPMI 1640 s 10% fetálního telecího sera (FCS). Magnetické perličky (7 μ l, 4 x 10^6 perliček/ml) se inkubují paralelně v jamkách flexibilní 96 jamkové mikrotitrační plotny společně se 7 μ l sloučeniny o různých koncentracích a 7 μ l HL60 buněk značených kalceinem. Plotny se inkubují deset minut při teplotě místnosti. Pak se plotna umístí na magnetický seprátor a inkubuje se ještě dvě minuty. Při umístění ploten na separátoru se nenavázané buňky HL60 odstraní a jamky se promyjí dvakrát salinickým fosfátovým pufrem (PBS) k odstranění případně zbývajících nenavázaných buněk. Buňky zbývajících na perličkách se zhodnotí mikroskopicky a pak se rozloží přidavkem 50 ml 1% roztoku NP40 v PBS. Vazba se pak kvantifikuje fluorimetricky za použití fluorimetru Cytofluor 2350 Millipore. Stanoví se křivky dávka-odezva a koncentrace sloučeniny vyvolávající 50% inhibici navázání buněk (IC_{50}).

Sloučeniny uvedené v následující tabulce jsou ty sloučeniny, které se ukázaly být v tomto příkladě jako zvláště výhodné.

23.03.99

Tabulka výsledků in vitro selektin-stanovení

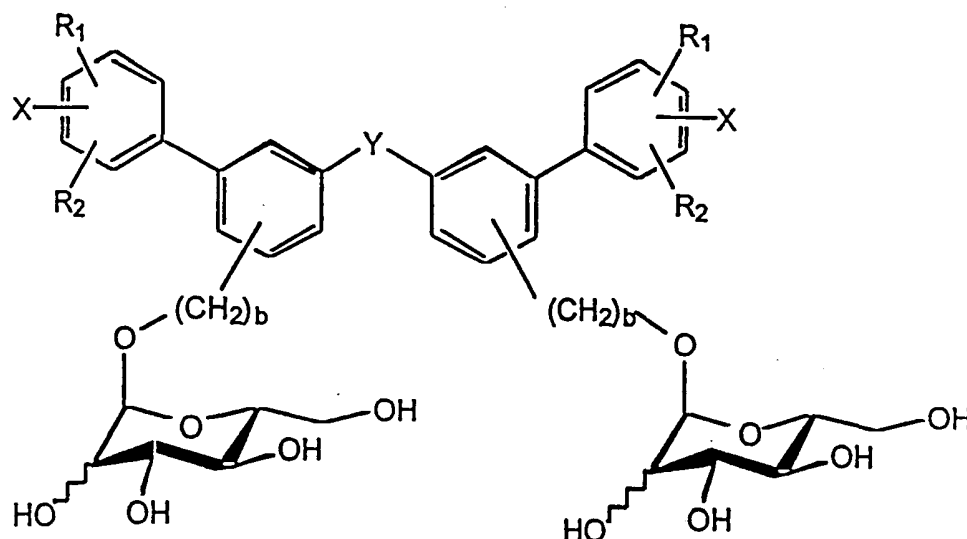
Sloučenina	n =	E-selektin	P-selektin	L-selektin
	nebo	IC ₅₀ (mM)	IC ₅₀ (mM)	IC ₅₀ (mM)
	m/p	nebo % inhib./nebo % inhib.	nebo % inhib./nebo % inhib.	nebo % inhib./nebo % inhib.
	slouč.	(mM)	(mM)	(mM)

A-4	4	5.0	2.5	2.0
A-5	5	0.4	0.3	0.3
A-6	6	0.5	0.07	0.56
A-7	7	0.5	0.4	0.75
A-9	9	1.0	1.0	1.0
B-m	m	0/1	0.22	3.0
B-p	p	2.0	2.0	3.0
C		2.5	0.7	0/2
D		29/2	0.5	5.0
E	6	3.27	0.54	1.4
F	4	1.0	1.0	3.0
G		1.5	1.0	0/3
H		0.7	0.2	0.5
J		4.0	0/3	2.0

23.03.98

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina vzorce :



(II)

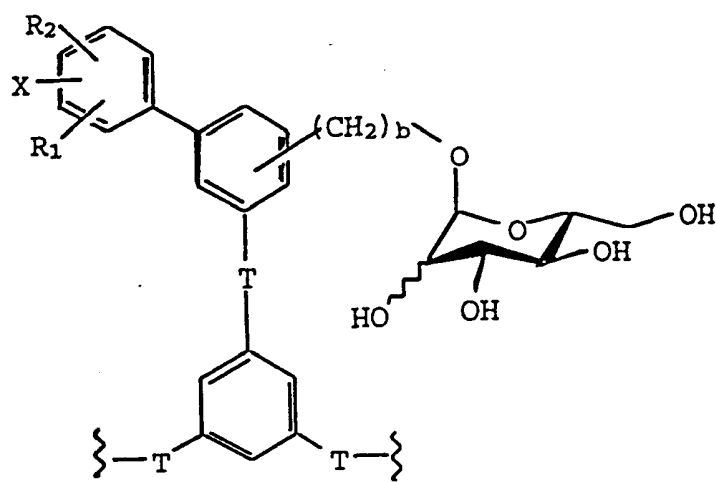
kde X je vybrán ze skupiny, zahrnující
 $-\text{CN}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CONHOH}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$,
 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_m\text{CONHOH}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CONHNH}_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{COZ}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{Z}$,
 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$,
 $-\text{CH}(\text{OZ})(\text{CO}_2\text{H})$, $-\text{CH}(\text{Z})(\text{CO}_2\text{H})$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{PO}_3\text{D}_1\text{D}_2$,
 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CONH}(\text{CHR}_3)\text{CO}_2\text{H}$, (1-H-tetrazolyl-5-alkyl-) a
 $-\text{OH}$;

Pro divalentní struktury je Y $-(\text{CH}_2)_f-$,
 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$, $-(\text{CH}_2)_f\text{O}(\text{CH}_2)_f-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{O}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$
 $-(\text{CH}_2)_f\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_f\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_g-$,
 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_g\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_f\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_g\text{CO}-$, $-(\text{CH}_2)_f\text{V}(\text{CH}_2)_f-$
 $-(\text{CH}_2)_f\text{COVCO}(\text{CH}_2)_f-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{COVCO}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$,

23.03.98

$-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{V}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$, $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_f\text{NHCO}-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f\text{W}(\text{CH}_2)_f\text{CO}-$,
 $-(\text{CH}_2)_f\text{WSW}(\text{CH}_2)_f-$,
 $-(\text{CH}_2)_f\text{CONH}(\text{CH}_2)_f\text{NHCO}(\text{CH}_2)_f-$, $-(\text{CH}_2)_f\text{COW}(\text{CH}_2)_f\text{WCO}(\text{CH}_2)_f$ nebo
 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_f\text{W}(\text{CH}_2)_f\text{CH}_2-$, kde V je $-\text{N}[(\text{CH}_2)_q]_2\text{N}-$ a q je nezávisle
 2 až 4 a W je aryl nebo heteroaryl;

Pro trivalentní struktury je Y



a T je vybrán ze skupiny, zahrnující $-(\text{CH}_2)_f-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_f-$, $-(\text{CH}_2)_g\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_f-$ a $-\text{CO}(\text{CH}_2)_g\text{S}(\text{O})_b(\text{CH}_2)_f-$, kde karbonylová skupina je umístěna ve styku s bifenylovou jednotkou;

R₁ a R₂ jsou nezávisle vybrány ze skupiny, zahrnující vodík, alkyl, halogen, $-\text{OZ}$, $-\text{NO}_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$ a $-\text{NHZ}$;

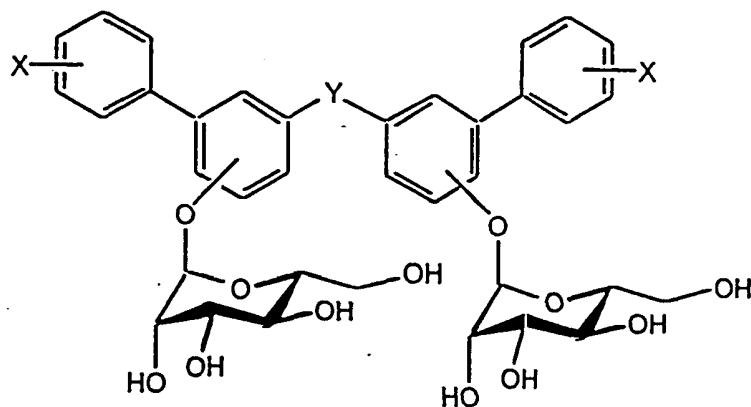
R₃ je vybrán ze skupiny, zahrnující vodík, alkyl, aralkyl, hydroxyalkyl, aminoalkyl, alkylkarboxylovou kyselinu a alkylkarboxamid;

f je 1 až 16, g je 0 až 6, n je 0 až 6, m je 1 až 6, p je 0 až 6, b je 0 až 2, Z je alkyl, aryl nebo aralkyl, D₁ a D₂ nezávisle znamenají vodík nebo alkyl, a jejich farmaceuticky

23.03.98

přijatelné soli, estery, amidy a proléčiva.

2. Sloučenina vzorce



(III)

kde X je $-\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ nebo $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ a Y je $-(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{W}(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{WOW}(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, nebo $-(\text{CH}_2)_n\text{COW}(\text{CH}_2)_n\text{WCO}(\text{CH}_2)_n-$ kde W je aryl nebo heteroaryl a n 0 až 6, a jejich farmaceuticky přijatelné soli, estery, amidy a proléčiva.

3. Sloučenina podle nároku 2 kde Y znamená $-(\text{CH}_2)_f-$ nebo $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_f\text{W}(\text{CH}_2)_f\text{CH}_2-$.

4. Sloučenina podle nároku 2 kde X znamená $3-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ a Y znamená $(\text{CH}_2)_f-$ nebo $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_f\text{W}(\text{CH}_2)_f\text{CH}_2$.

5. Sloučenina vybraná z:

1,7-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]heptan,

23.03.98

1,6-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]hexan,

1,5-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]pentan,

1,4-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]butan,

N,N'-bis-[4-(3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]butan-1-oyl]-4,4'-trimethyldipiperidin,

S,S'-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenylprop-1-yl]-1,3-dithiopropän,

1,7-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]-1,7-bis-oxoheptan,

1,6-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]-1,6-bis-oxohexan,

1,5-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]-1,5-bis-oxopentan,

1,4-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]-1,4-bis-oxobutan,

1,3,5-tris-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyl-oxy)fenylmethyl]benzen, a

1,3,5-tris-[4-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(α -D-mannopyranosyl-oxy)fenyl]-4-oxo-2-thiobutyl]benzen.

23.03.98

6. 1,6-bis-[3-(3-karboxymethylfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]hexan.

7. Farmaceutická kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že obsahuje sloučeninu podle nároku 1 a farmaceuticky
přijatelný nosič.

8. Způsob inhibice vazby E-selektinu, P-selektinu nebo
L-selektinu k sLe^x nebo k sLe^a v y z n a č u j í c í s e t í m
že zahrnuje podání účinného množství sloučeniny podle nároku 1
pacientovi.

9. Způsob inhibice vazby E-selektinu, P-selektinu nebo
L-selektinu k sLe^x nebo k sLe^a v y z n a č u j í c í s e t í m
že zahrnuje podání účinného množství 1,6-bis-[3-(3-karboxy-
methylyfenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)fenyl]hexanu
pacientovi.

Nárok 3b