

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

303 544

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07H 15/203 (2006.01)
A61K 31/7034 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-777**
 (22) Přihlášeno: **21.09.2001**
 (30) Právo přednosti: **29.09.2000 JP 2000/301523**
 (40) Zveřejněno: **16.07.2003**
(Věstník č. 7/2003)
 (47) Uděleno: **17.10.2012**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **28.11.2012**
(Věstník č. 48/2012)
 (86) PCT číslo: **PCT/JP2001/008239**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/028872**

(56) Relevantní dokumenty:
 CZ 2002-3023 A3; EP 0 598 359 A1.

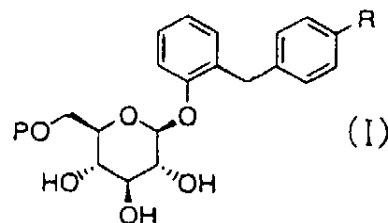
(73) Majitel patentu:
 KISSEI PHARMACEUTICAL CO., LTD., Matsumoto-shi, JP

(72) Původce:
 Fujikura Hideki, Matsumoto-shi, JP
 Fushimi Nobuhiko, Matsumoto-shi, JP
 Nishimura Toshihiro, Minamiazumi-gun, JP
 Tatani Kazuya, Matsumoto-shi, JP
 Isaji Masayuki, Shiojiri-shi, JP

(74) Zástupce:
 JUDr. Jan Matějka, Národní 32, Praha, 11000

(54) Název vynálezu:
Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát a farmaceutická kompozice s jeho obsahem

(57) Anotace:
 Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát obecného vzorce I, kde P je acyl, alkoxy-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl nebo alkoxy-substituovaný alkoxykarbonyl; a R je alkyl, alkoxy, alkylthio, alkoxy-substituovaný alkyl, alkoxy-substituovaný alkoxy nebo alkoxy-substituovaný alkylthio; přičemž alkyly nebo alkoxyly mají 1 až 6 C, acyly mají 2 až 7 C; alkyly a alkoxyly jsou přímé nebo rozvětvené a alkoxykarbonyly mohou být navíc cyklické a acyly jsou přímé rozvětvené nebo cyklické. Tento derivát je inhibitorem humánního SGLT2, a jako takového ho lze použít pro léčení chorob spojených s hyperglykemií, jako jsou diabetes nebo diabetické komplikace a obezita. Farmaceutická kompozice s obsahem tohoto derivátu.



CZ 303544 B6

Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát a farmaceutická kompozice s jeho obsahem

Oblast techniky

Vynález se týká dále popsaných glukopyranosyloxybenzylbenzenových derivátů, které jsou inhibitory humánního SGLT2, a jako takových jich lze použít pro léčení chorob spojených s hyperglykemií, jako jsou diabetes nebo diabetické komplikace a obezita. Dále se vynález také týká farmaceutických kompozic s obsahem těchto derivátů.

Dosavadní stav techniky

Diabetes je jednou z chorob souvisejících s životním stylem, zejména se změnami stravovacích návyků a s nedostatkem pohybu. U pacientů trpících diabetes je tedy předepisována dieta a tělesné cvičení. Navíc, pokud je obtížné toto dodržovat, je současně aplikována léčba léčiv. V současné době se jako antidiabetika používají biguanidy, sulfonylmočoviny a činidla pro redukci inzulinové rezistence. Nicméně biguanidy a sulfonylmočoviny vykazují příležitostně nežádoucí účinky, jakými jsou například acidóza z nahromaděné kyseliny mléčné, respektive hypoglykemie. V případě použití činidel pro redukci inzulinové rezistence lze pozorovat nežádoucí účinky, jakým je například edém, a rovněž je třeba počítat s pokročilou obezitou. Pro vyřešení těchto problémů je tedy žádoucí vyvinout antidiabetika, která mají nový mechanismus účinku.

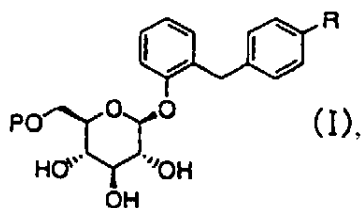
V posledních letech došlo k pokroku ve vývoji nového typu antidiabetik, která podporují urinální vylučování glukózy a snižují hladinu glukózy v krvi tím, že brání reabsorpci přebytečné glukózy v ledvinách (J. Clin. Invest., sv. 79, str. 1510 až 1515 (1987)). Kromě toho bylo zaznamenáno, že SGLT2 (Na⁺/glukóza kotransportér 2) je přítomen v S1 segmentu ledvinové proximální trubice a podílí se zejména na reabsorpci glukózy získané glomerulární filtrací (J. Clin. Invest., sv. 93, str. 397 až 404 (1994)). Z výše uvedeného vyplývá, že inhibice aktivity lidského SGLT2 brání reabsorpci nadbytečné glukózy v ledvinách, následně podporuje vylučování přebytečné glukózy v moči, a tak normalizuje hladinu glukózy v krvi. Je tedy žádoucí rychle vyvinout antidiabetika, která by vykazovala silnou inhibiční aktivitu v lidském SGLT2 a nový mechanismus účinku. Navíc se předpokládá, že vzhledem k tomu, že tato činidla podporují vylučování přebytečné glukózy v moči a následně snižují akumulaci glukózy v těle, mají preventivní vliv na obezitu.

Podstata vynálezu

Cílem usilovných studií bylo nalezení sloučenin majících inhibiční aktivitu v lidském SGLT2. Výsledkem těchto studií bylo zjištění, že sloučeniny výše uvedeného obecného vzorce I se převádějí *in vivo* na své aktivní formy, tj. na deriváty glukopyranosyloxybenzylbenzenu výše uvedeného obecného vzorce II, a vykazují vynikající inhibiční aktivitu u lidského SGLT2, přičemž toto zjištění tvoří podstatu předloženého vynálezu.

Vynález poskytuje glukopyranosyloxybenzylbenzenové deriváty, které vykazují inhibiční aktivitu u lidského SGLT2 *in vivo* a vynikající hypoglykemický účinek tím, že vylučují přebytečnou glukózu v moči na základě toho, že zabráňují reabsorpci glukózy v ledvinách a farmaceutické kompozice obsahující tyto deriváty.

Předmětem vynálezu podle základního provedení i) je glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát obecného vzorce I



kde

5 P představuje acyl, alkoxy-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl nebo alkoxy-substituovaný alkoxykarbonyl; a

R představuje alkyl, alkoxy, alkylthio, alkoxy-substituovaný alkyl, alkoxy-substituovaný alkoxy nebo alkoxy-substituovaný alkylthio;

10

příčemž

kterékoliv alkylové nebo alkoxylové skupiny nebo zbytky obsahují 1 až 6 atomů uhlíku;

15

kterékoliv acylové skupiny nebo zbytky obsahují 2 až 7 atomů uhlíku;

kterékoliv alkylové skupiny nebo zbytky mohou mít přímý nebo rozvětvený řetězec;

20

kterékoliv alkoxylové skupiny nebo zbytky mohou mít přímý nebo rozvětvený řetězec, kromě alkoxylových zbytků alkoxykarbonylových skupin, které mohou mít přímý, rozvětvený nebo cyklický řetězec; a

kterékoliv acylové skupiny nebo zbytky mohou mít přímý, rozvětvený nebo cyklický řetězec.

25

Přednostní provedení glukopyranosyloxybenzylbenzenového derivátu obecného vzorce I zahrnují zejména

30

ii) derivát obecného vzorce I podle provedení i), kde R představuje alkyl nebo alkoxy a P představuje acyl, alkoxy-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl nebo alkoxy-substituovaný alkoxykarbonyl, kde kterékoliv alkylové, alkoxylové a acylové skupiny nebo zbytky odpovídají definicím uvedeným v provedení i);

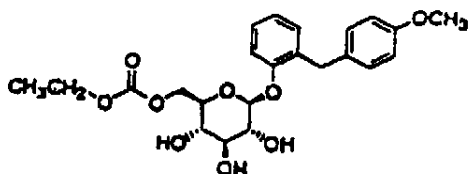
35

iii) derivát obecného vzorce I podle provedení i), kde R odpovídá definici uvedené v provedení i) a P představuje acyl nebo alkoxykarbonyl, kde kterékoliv alkylové, alkoxylové a acylové skupiny nebo zbytky odpovídají definicím uvedeným v provedení i);

40

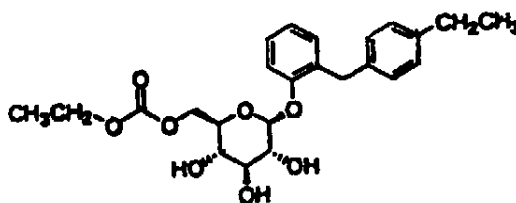
iv) derivát obecného vzorce I podle provedení ii) nebo iii), kde R odpovídá definici uvedené v provedení ii) a P odpovídá definici uvedené v provedení iii), přičemž kterékoliv alkylové, alkoxylové a acylové skupiny nebo zbytky odpovídají definicím uvedeným v provedení i);

v) derivát podle provedení iv) vzorce



a

vi) derivát podle provedení iv) vzorce



5 Předmětem vynálezu je dále také (provedení vynálezu vii)) farmaceutická kompozice, která obsahuje jako účinnou složku glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát podle kteréhokoliv z provedení i) až vi).

10 V přednostním provedení viii) má tato farmaceutická kompozice formu vhodnou pro perorální podávání.

Předmětem vynálezu je také farmaceutická kompozice podle provedení vii) nebo viii) pro použití

- jako inhibitor humánního SGLT2 (provedení vynálezu ix)); nebo
- 15 – pro prevenci nebo léčení choroby spojené s hyperglykemií (provedení vynálezu x));

Chorobou spojenou s hyperglykemií je přitom zejména diabetes nebo diabetické komplikace (provedení vynálezu xi)); nebo obezita (provedení vynálezu xii)).

20 Předmětem vynálezu je i použití glukopyranosyloxybenzylbenzenového derivátu podle kteréhokoliv z provedení i) až vi) pro výrobu farmaceutické kompozice pro prevenci nebo léčení choroby spojené s hyperglykemií.

25 Chorobou spojenou s hyperglykemií je přitom zejména diabetes nebo diabetické komplikace (provedení vynálezu xiv)); nebo obezita (provedení vynálezu xv)).

Konečně je předmětem vynálezu také glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát podle kteréhokoliv z provedení i) až vi) pro použití pro prevenci nebo léčení choroby spojené s hyperglykemií.

30 V dalším popisu je vynález příležitostně objasňován v širším kontextu než odpovídá rozsahu, který je skutečně předmětem tohoto vynálezu. Výslovně se proto uvádí, že do rozsahu vynálezu spadají jen aspekty explicitně uvedené výše, a jen ty jsou také předmětem připojených patentových nároků. Následující popis má jen ilustrativní význam.

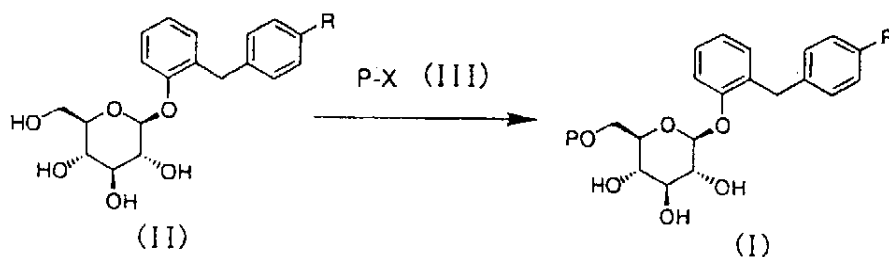
35 V derivátech obecného vzorce I je skupina P skupinou proléčiva. Výraz „proléčivo“ přitom znamená sloučeninu, která se *in vivo* převede na derivát glukopyranosyloxybenzylbenzenu dále uvedeného obecného vzorce II, v němž je místo skupiny P přítomen atom vodíku. Posledně uvedený derivát je vlastní účinnou formou.

40 Výraz „alkylová skupina“ v rámci vynálezu znamená alkylovou skupinu s přímým nebo větveným řetězcem mající 1 až 6 atomů uhlíku, jakou je například methylová, ethylová, propylová, isopropylová, butylová, isobutylová, sek-butylová, terc-butylová, pentylová, isopentylová, neopentylová, terc-pentylová, hexylová skupina apod.; výraz „alkoxykupina“ znamená alkoxykupinu s přímým nebo větveným řetězcem majícím 1 až 6 atomů uhlíku, jakou jsou například methoxykupina, ethoxykupina, propoxykupina, isopropoxykupina, butoxykupina, isobutoxykupina, sek-butoxykupina, terc-butoxykupina, pentyloxykupina, isopentyloxykupina, neopentyloxykupina, terc-pentyloxykupina, hexyloxykupina apod.; a výraz „alkylthioskupina“ znamená alkylthioskupinu s přímým nebo větveným řetězcem mající 1 až 6 atomů uhlíku, jakými jsou například methylthioskupina, ethylthioskupina, propylthioskupina, isopropylthioskupina,

butylthioskupina, isobutylthioskupina, sek-butylthioskupina, terc-butylthioskupina, pentylthioskupina, isopentylthioskupina, neopentylthioskupina, terc-pentylthioskupina, hexylthioskupina apod. Výraz „alkoxyskupinou substituovaná alkylová skupina“ znamená výše uvedenou alkylovou skupinu substituovanou výše uvedenou alkoxyskupinou; výraz „alkoxyskupinou substituovaná (alkoxy)skupina“ znamená výše uvedenou alkoxyskupinu substituovanou výše uvedenou alkoxyskupinou; a výraz „alkoxyskupinou substituovaná alkylthioskupina“ znamená výše uvedenou alkylthioskupinu substituovanou výše uvedenou alkoxyskupinou. Výraz „acylová skupina“ znamená acylovou skupinu s přímým nebo větveným řetězcem nebo cyklickou acylovou skupinu mající 2 až 7 atomů uhlíku, jakou je například acetylová, propionyllová, butyrylová, isobutyrylová, pivaloylová, hexanoylová a cyklohexylkarbonylová skupina; a výraz „alkoxyskupinou substituovaná acylová skupina“ znamená výše uvedenou acylovou skupinu substituovanou výše uvedenou alkoxyskupinou. Výraz „alkoxykarbonylová skupina“ znamená alkoxykarbonylovou skupinu s přímým nebo větveným řetězcem nebo cyklickou alkoxykarbonylovou skupinu mající 2 až 7 atomů uhlíku, jakou je například methoxykarbonylová, ethoxykarbonylová, isopropoxykarbonylová, isobutyloxykarbonylová a cyklohexyloxykarbonylová skupina; výraz „alkoxykarbonylovou skupinou substituovaná acylová skupina“ znamená výše uvedenou acylovou skupinu substituovanou výše uvedenou alkoxykarbonylovou skupinou, jako je například 3-(ethoxykarbonyl)-propionyllová skupina; a výraz „alkoxyskupinou substituovaná alkoxykarbonylová skupina“ znamená výše uvedenou alkoxykarbonylovou skupinu substituovanou výše uvedenou alkoxyskupinou, jakou je například 2-methoxyethoxykarbonylová skupina.

U substituentu R je výhodná shora definovaná alkylová skupina a alkoxyskupina, výhodnější je potom alkylová skupina s přímým nebo větveným řetězcem mající 1 až 4 atomy uhlíku a alkoxykupina s přímým nebo větveným řetězcem mající 1 až 3 atomy uhlíku a nejvýhodnější je ethylová skupina a methoxyskupina. V případě substituentu P je výhodná acylová skupina a alkoxykarbonylová skupina definovaná výše. Jako acylová skupina je výhodná acylová skupina s přímým nebo větveným řetězcem mající 4 až 6 atomů uhlíku a ještě výhodnější je butyrylová skupina a hexanoylová skupina. Jako alkoxykarbonylová skupina definovaná výše je výhodná alkoxykarbonylová skupina s přímým nebo větveným řetězcem mající 2 až 5 atomů uhlíku, přičemž ještě výhodnější je methoxykarbonylová skupina a ethoxykarbonylová skupina.

Sloučeniny podle vynálezu lze připravit zavedením chránicí skupiny P hydroxyskupiny do příslušného hydroxylového derivátu glukopyranosyloxybenzylbenzenu obecného vzorce II, což se provádí běžným způsobem. Sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu lze například připravit za použití derivátu glukopyranosyloxybenzylbenzenu dále uvedeného obecného vzorce II a za použití následujícím postupu:



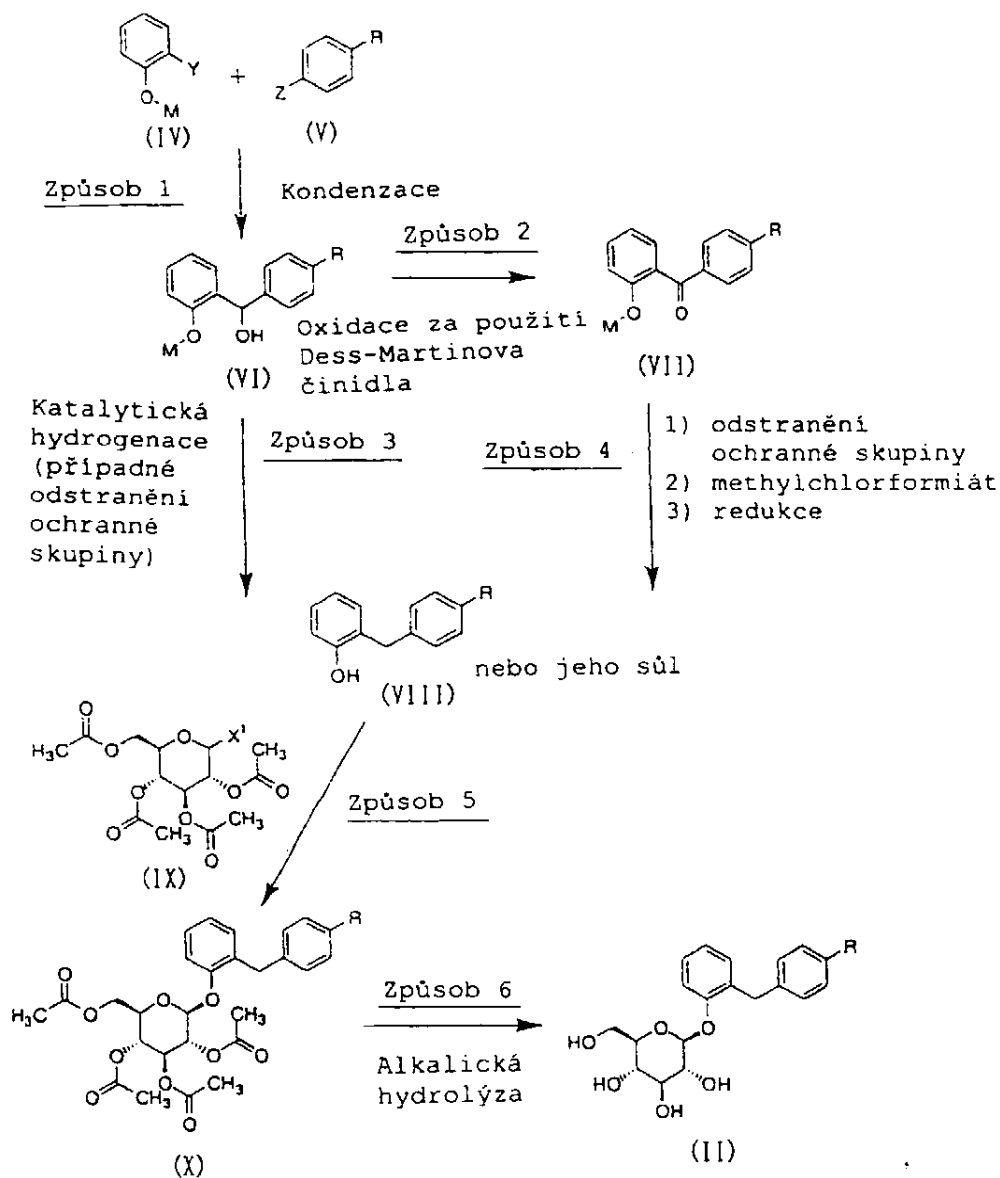
kde X znamená odstupující skupinu, jakou je například atom bromu a atom chloru; a R a P mají stejný význam jako ve výše uvedené definici.

Proléčivo vše uvedeného obecného vzorce I lze připravit opatřením hydroxyskupiny derivátu glukopyranosyloxybenzylbenzenu výše uvedeného obecného vzorce II ochranou skupinou tak, že se uvede do reakce s ochranným reakčním činidlem výše uvedeného obecného vzorce III v přítomnosti báze, jakou jsou například pyridin, triethylamin, N,N-diisopropylethylamin, pikolin, lutidin, kollidin, chinuklidin, 1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin nebo 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan v inertním rozpouštědle nebo za absence rozpouštědla. Jako rozpouštědlo lze použít dichlor-

methan, acetonitril, ethylacetát, diisopropylether, chloroform, tetrahydrofuran, 1,2-dimethoxyethan, 1,4-dioxan, aceton, terc-butanol, směs těchto rozpouštědel apod. Reakční teplota se zpravidla pohybuje od -40°C do refluxní teploty a reakční doba se pohybuje od 30 min do 2 dnů, v závislosti na použitém výchozím materiálu, rozpouštědle a reakční teplotě.

5

Například sloučeniny výše uvedeného obecného vzorce II podle vynálezu, které se použijí jako výchozí materiál u výše zmíněného způsobu výroby, lze připravit následujícím postupem:



10

kde M znamená ochrannou skupinu pro hydroxyskupinu;

15

X¹ znamená odstupující skupinu, jakou je například trichloracetoimidoyloxyskupina, acetoxy-skupina, atom bromu nebo atom fluoru; jeden z Y a Z znamená MgBr, MgCl, MgI nebo atom lithia, zatímco druhý znamená formylovou skupinu; a R má stejný význam jako ve výše uvedené definici.

Způsob 1

5 Sloučeninu výše uvedeného obecného vzorce VI lze připravit kondenzací benzaldehydového derivátu výše uvedeného obecného vzorce IV s Grignardovým reakčním činidlem nebo lithným reakčním činidlem výše uvedeného obecného vzorce V, nebo kondenzací Grignardova reakčního činidla nebo lithného reakčního činidla výše uvedeného obecného vzorce IV s benzaldehydovým derivátem výše uvedeného obecného vzorce V v inertním rozpouštědle. Jako rozpouštědlo lze
10 použít tetrahydrofuran, diethylether, směsi těchto rozpouštědel apod. Reakční teplota se zpravidla pohybuje od -78°C do refluxní teploty a reakční doba se zpravidla pohybuje od 10 min do 1 dne, v závislosti na použitém výchozím materiálu, rozpouštědle a reakční teplotě.

Způsob 2

15 Sloučeninu výše uvedeného obecného vzorce VII lze připravit podrobením sloučeniny výše uvedeného obecného vzorce VI oxidaci za použití Dess–Martinova reakčního činidla v inertním rozpouštědle. Jako rozpouštědlo lze použít dichlormethan, chloroform, acetonitril, směsi těchto rozpouštědel apod. Reakční teplota se zpravidla pohybuje od 0°C do refluxní teploty a reakční doba se zpravidla pohybuje od 1 h do 1 dne, v závislosti na použitém výchozím materiálu, rozpouštědle a reakční teplotě.
20

Způsob 3

25 Sloučeninu výše uvedeného obecného vzorce VIII lze připravit podrobením sloučeniny výše uvedeného obecného vzorce VI katalytické hydrogenaci za použití katalyzátoru na bázi palladia, jakým je například palladium na práškovém uhlíku, v přítomnosti nebo absence kyseliny, jakou je například kyselina chlorovodíková, v inertním rozpouštědle, a odstraněním ochranné skupiny, které se provádí obvyklým způsobem, pokud to daná situace vyžaduje. Při katalytické hydrogenaci se jako rozpouštědlo použije methanol, ethanol, tetrahydrofuran, ethylacetát, kyselina octová,
30 isopropanol, směsi těchto rozpouštědel apod. Reakční teplota se zpravidla pohybuje od teploty místnosti do refluxní teploty a reakční doba se zpravidla pohybuje od 30 min do 1 dne, v závislosti na použitém výchozím materiálu, rozpouštědle a reakční teplotě. Sloučenina výše uvedeného obecného vzorce VIII může být obvyklým způsobem převedena na sůl, jakou jsou například sodná sůl nebo draselná sůl.
35

Způsob 4

Sloučeninu výše uvedeného obecného vzorce VIII lze připravit odstraněním ochranné skupiny M na sloučenině výše uvedeného obecného vzorce VII, které se provádí běžným způsobem, kondenzací výsledné sloučeniny s methylenchlorformiátem v přítomnosti báze, jakou je například triethylamin, diisopropylethylamin nebo 4-(N,N-dimethylamino)pyridin v inertním rozpouštědle a podrobením výsledné uhličitánové sloučeniny redukci za použití redukčního činidla, jakým je například borohydrid sodný. Při kondenzační reakci lze jako rozpouštědlo použít tetrahydrofuran, dichlormethan, acetonitril, ethylacetát, diethylether, směsi těchto rozpouštědel apod. Reakční teplota se zpravidla pohybuje od 0°C do refluxní teploty a reakční doba se zpravidla pohybuje od 30 min do 1 dne, v závislosti na použitém výchozím materiálu, rozpouštědle a reakční teplotě. Při redukční reakci lze jako rozpouštědlo použít směs tetrahydrofuranu a vody apod. Reakční teplota se zpravidla pohybuje od 0°C do refluxní teploty a reakční doba se zpravidla pohybuje od 1 h do 1 dne, v závislosti na použitém výchozím materiálu, rozpouštědle a reakční teplotě. Sloučeninu
40 výše uvedeného obecného vzorce VIII lze obvyklým způsobem převést na její sůl, jakou jsou například sodná sůl nebo draselná sůl.
50

Způsob 5

Glukosid výše uvedeného obecného vzorce X lze připravit podrobením benzylfenolového derivátu výše uvedeného obecného vzorce VIII nebo jeho soli glykosidací za použití glykosylového donoru výše uvedeného obecného vzorce IX, jakým je například 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-O-trichloracetimidoyl- α -D-glukopyranóza, 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- β -D-glukopyranóza, 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glukopyranosylbromid a 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosylfluorid, v přítomnosti aktivního reakčního činidla, jakým je například komplex fluoridu boritého a diethyletheru, trifluormethansulfonát stříbrný, chlorid cínitý nebo trimethylsilyl-trifluormethansulfonát, v inertním rozpouštědle. Jako rozpouštědlo lze použít dichlormethan, toluen, acetonitril, nitromethan, ethylacetát, diethylether, chloroform, směsi rozpouštědel apod. Reakční teplota se zpravidla pohybuje od -30°C do refluxní teploty a reakční doba se zpravidla pohybuje od 10 min do 1 dne, v závislosti na použitém výchozím materiálu, rozpouštědle a reakční teplotě.

Způsob 6

Derivát glukopyranosyloxybenzylbenzenu výše uvedeného obecného vzorce II lze připravit podrobením glukosidu výše uvedeného obecného vzorce X alkalické hydrolýze, při které dojde k odstranění ochranných skupin hydroxyskupin. Jako rozpouštědlo lze použít vodu, methanol, ethanol, tetrahydrofuran, směsi těchto rozpouštědel apod. a jako alkalické materiály lze použít hydroxid sodný, methoxid sodný, ethoxid sodný apod. Teplota zpracování se zpravidla pohybuje od 0°C do refluxní teploty a doba zpracování se zpravidla pohybuje od 30 min do 6 h, v závislosti na použitém výchozím materiálu, rozpouštědle a teplotě zpracování.

Sloučeniny podle vynálezu získané výše popsanými způsoby přípravy lze izolovat a purifikovat konvenčními separačními prostředky, jakými jsou například frakční rekrystalizace, purifikace za použití chromatografie, extrakce rozpouštědlem a extrakce v pevné fázi.

Proléčiva výše uvedeného obecného vzorce I podle vynálezu zahrnují své hydráty a solváty s farmaceuticky přijatelnými rozpouštědly, jakým je například ethanol.

Proléčivo výše uvedeného obecného vzorce I podle vynálezu lze *in vivo* převést na derivát glukopyranosyloxybenzylbenzenu výše uvedeného obecného vzorce II, což je jeho účinná forma, která může vykazovat vynikající inhibiční aktivitu u lidského SGLT2. Kromě toho mají proléčiva výše uvedeného obecného vzorce I podle vynálezu zlepšenou orální absorpci a farmaceutické kompozice obsahující jako účinnou složku toto proléčivo mají vysokou použitelnost jako orální formulace. Proléčiva podle vynálezu jsou tedy mimořádně vhodná jako činidla pro prevenci nebo léčbu choroby související s hyperglykemií, jakou je například diabetes, diabetické komplikace, obezita apod.

Pokud se farmaceutické kompozice podle vynálezu použijí při praktické léčbě, potom se použijí různé dávkové formy. Ilustrativními příklady dávkových forem jsou prášky, granule, jemné granule, suché sirupy, tablety, kapsle, injekce, roztoky, masti, čípky, zábaly apod. a lze je podávat orálně nebo parenterálně.

Tyto farmaceutické kompozice lze připravit smísením s nebo naředěním a rozpuštěním s vhodnými farmaceutickými aditivy, jakými jsou například excipienty, desintegrátory, pojiva, maziva, ředidla, pufry, isotonika, antiseptika, zvlhčující činidla, emulgátory, dispergační činidla, stabilizační činidla, činidla podporující rozpouštění apod., a formulací směsi ve farmaceutickém průmyslu běžně používanými metodami.

Pokud se farmaceutické kompozice podle vynálezu použijí při praktické léčbě, potom se dávka sloučeniny podle vynálezu jako účinná složka vhodně předepíše v závislosti na věku, pohlaví,

tělesné hmotnosti a stupni příznaků a typu léčby konkrétního pacienta tak, aby ležela přibližně v rozmezí od 0,1 do 1000 mg na den na dospělého člověka v případě orálního podání a přibližně v rozmezí od 0,01 do 300 mg na den na dospělého člověka v případě parenterálního podání, přičemž denní dávka může být rozdělena na několik dílčích dávek podávaných během dne.

Následující kontrolní příklady, příklady a testovací příklady provedení vynálezu mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezuji rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými patentovými nároky.

Příklady provedení vynálezu

Kontrolní příklad 1

2-(4-Isobutylbenzyl)fenol

Grignardovo činidlo se připravilo z 2-benzyloxy-1-brombenzenem (0,20 g), hořčíkem (0,026 g), katalytického množství jedu a tetrahydrofuranu (1 ml) obvyklým způsobem. Získané Grignardovo činidlo se přidalo do roztoku 4-isobutylbenzaldehydu (0,16 g) v tetrahydrofuranu (2 ml) a směs se 30 min míchala při teplotě místnosti. Reakční směs se purifikovala sloupcovou chromatografií na aminopropylsilikagelu (eluční činidlo: tetrahydrofuran) a poskytla difenylmethanolovou sloučeninu (0,23 g). Získaná difenylmethanolová sloučenina se rozpustila v ethanolu (3 ml) a koncentrované kyselině chlorovodíkové (0,1 ml). Do roztoku se přidalo katalytického množství 10% palladia na práškovém uhlí a směs se míchala přes noc pod vodíkovou atmosférou při teplotě místnosti. Katalyzátor se odstranil filtrací a filtrát se zahustil za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou chromatografií na silikagelu (eluční soustava: dichlormethan/hexan = 1:1) a poskytl 2-(4-isobutylbenzyl)fenol (0,10 g).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ mg/l: 0,89 (6H, d, $J = 6,6$ Hz), 1,75 – 1,90 (1H, m), 2,43 (2H, d, $J = 7,2$ Hz), 3,97 (2H, s), 4,66 (1H, s), 6,75 – 6,85 (1H, m), 6,85 – 6,95 (1H, m), 7,00 – 7,20 (6H, m).

Kontrolní příklad 2

2-(4-Isopropoxybenzyl)fenol

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu 1 za použití 4-isopropoxybenzaldehydu namísto 4-isobutylbenzaldehydu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ mg/l: 1,31 (6H, d, $J = 6,1$ Hz), 3,93 (2H, s), 4,50 (1H, heptet, $J = 6,1$ Hz), 4,72 (1H, s), 6,75 – 6,85 (3H, m), 6,85 – 6,95 (1H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

Kontrolní příklad 3

2-(4-Ethoxybenzyl)fenol

Grignardovo činidlo se připravilo z 1-brom-4-ethoxybenzenem (1,5 g), hořčíkem (0,19 g), katalytického množství jedu a tetrahydrofuranu (2 ml) obvyklým způsobem. Do získaného roztoku Grignardova činidla se po kapkách přidal roztok 2-benzyloxybenzaldehydu (1,1 g) v tetrahydrofuranu (15 ml) a směs se 30 min míchala při teplotě místnosti. Do reakční směsi se přidal nasycený vodný roztok chloridu amonného (10 ml) a voda (20 ml) a směs se extrahovala ethylacetátem (100 ml). Extrakt se propláchnul vodou (20 ml) a solankou (20 ml) a sušil nad bezvodým síranem sodným. Potom se rozpouštědlo odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou

chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: hexan/ethylacetát = 5:1) a poskytl difenylmethanolovou sloučeninu (1,7 g). Získaná difenylmethanolová sloučenina (1,7 g) se rozpustila v ethanolu (25 ml). Do roztoku se přidala koncentrovaná kyselina chlorovodíková (0,42 ml) a katalytické množství 10% palladia na práškovém uhlíku a směs se 18 h míchala pod vodíkovou atmosférou při teplotě místnosti. Katalyzátor se odstranil filtrací a filtrát se zahustil za sníženého tlaku. Do zbytku se přidala ethylacetát (100 ml) a směs se propláchla nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (30 ml) a solankou (30 ml). Organická vrstva se sušila nad bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: hexan/ethylacetát = 8:1) a poskytl 2-(4-ethoxybenzyl)fenol (0,85 g).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ mg/l: 1,39 (3H, t, $J = 7,1$ Hz), 3,93 (2H, s), 4,00 (2H, q, $J = 7,1$ Hz), 4,72 (1H, s), 6,75 – 6,85 (3H, m), 6,85 – 6,95 (1H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

Kontrolní příklad 4

2-(4-Ethylthiobenzyl)fenol

Grignardovo činidlo se připravilo z 1-brom-4-ethylthiobenzenu (1,1 g), hořčíku (0,12 g), katalytického množství jodu a tetrahydrofuranu (5 ml) obvyklým způsobem. Do získaného roztoku Grignardova činidla se přidala roztok 2-(methoxymethoxy)benzaldehydu (0,56 g) v tetrahydrofuranu (12 ml) a směs se 10 min míchala při 65 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti se do reakční směsi přidala nasycený vodný roztok chloridu amonného (5 ml) a voda (20 ml) a směs se extrahovala ethylacetátem (80 ml). Extrakt se propláchnul vodou (20 ml) a solankou (20 ml), sušil nad bezvodým síranem sodným, načež se rozpouštědlo odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: hexan/ethylacetát = 4:1) a poskytl difenylmethanolovou sloučeninu (0,91 g). Získaná difenylmethanolová sloučenina (0,90 g) se rozpustila v dichlormethanu (15 ml). Do roztoku se přidalo Dess–Martinovo činidlo (1,1,1-tris(acetyloxy)-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3-(1H)-on) (1,5 g) a směs se 26 h míchala při 25 °C. Do reakční směsi se přidala diethylether (75 ml) a 1 mol/l vodného roztoku hydroxidu sodného (30 ml), směs se bouřlivě míchala a organická vrstva se separovala. Organická vrstva se propláchla 1 mol/l vodného roztoku hydroxidu sodného (30 ml), vodou (30 ml, 3krát) a solankou (30 ml), sušila nad bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo se odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: hexan/ethylacetát = 15:1 až 9:1) a poskytl ketonovou sloučeninu (0,82 g). Směs získané ketonové sloučeniny (0,81 g), monohydrátu kyseliny p-toluensulfonové (0,10 g) a methanolu (14 ml) se 4 hodiny míchala při 60 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti se reakční směs zahustila za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: hexan/ethylacetát = 15:1) a poskytl sloučeninu zbavenou ochranné skupiny (0,69 g). Získaná sloučenina zbavená ochranné skupiny (0,68 g) se rozpustila v tetrahydrofuranu (11 ml), triethylaminu (0,41 ml), do roztoku se přidala methylchlorformiát (0,22 ml) a směs se 1 h míchala při 25 °C. Dále se do reakční směsi přidala triethylamin (0,11 ml) a methylchlorformiát (0,061 ml) a směs se 30 min míchala. Reakční směs se přefiltrovala a filtrát se zahustil za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustil v tetrahydrofuranu (14 ml) a vodě (7 ml), do roztoku se přidala borohydrid sodný (0,40 g) a směs se 7 h míchala při 25 °C. Do reakční směsi se po kapkách přidala 1 mol/l kyseliny chlorovodíkové (15 ml) a směs se extrahovala ethylacetátem (75 ml). Extrakt se propláchl vodou (20 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (20 ml) a solankou (20 ml), sušil nad bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo se odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: hexan/ethylacetát = 8:1) a poskytl 2-(4-ethylthiobenzyl)fenol (0,62 g).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ mg/l: 1,29 (3H, t, $J = 7,3$ Hz), 2,90 (2H, q, $J = 7,3$ Hz), 3,96 (2H, s), 4,62 (1H, s), 6,75 – 6,80 (1H, m), 6,85 – 6,95 (1H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m), 7,20 – 7,30 (2H, m).

Kontrolní příklad 5

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glukopyranosid

5

Do roztoku 2-(4-methoxybenzyl)fenolu (46 mg) a 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-O-trichloroaceto-
imidoyl-α-D-glukopyranózy (0,13 g) v dichlormethanu (2 ml) se přidal komplex fluoridu
boritého a diethyletheru (0,033 ml) a směs se 1 h míchala při teplotě místnosti. Reakční směs se
purifikovala sloupcovou chromatografií na aminopropylsilikagelu (eluční činidlo: dichlormethan)
a poskytla 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glukopyranosid (0,11 g).

10

¹H-NMR (CDCl₃) δ mg/l: 1,91 (3H, s), 2,03 (3H, s), 2,05 (3H, s), 2,08 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,80
– 3,95 (3H, m), 4,17 (1H, dd, J = 2,5, 12,2 Hz), 4,29 (1H, dd, J = 5,5, 12,2 Hz), 5,11 (1H, d,
J = 7,5 Hz), 5,10 – 5,25 (1H, m), 5,25 – 5,40 (2H, m), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,95 – 7,10 (5H, m),
7,10 – 7,25 (1H, m).

15

Kontrolní příklad 6

2-(4-Methylbenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glukopyranosid

20

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu
5 za použití 2-(4-methylbenzyl)fenolu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenolu.

25

¹H-NMR (CDCl₃) δ mg/l: 1,89 (3H, s), 2,03 (3H, s), 2,05 (3H, s), 2,07 (3H, s), 2,30 (3H, s),
3,80 – 3,95 (3H, m), 4,17 (1H, dd, J = 2,5, 12,3 Hz), 4,28 (1H, dd, J = 5,5, 12,3 Hz), 5,11 (1H, d,
J = 7,5 Hz), 5,10 – 5,25 (1H, m), 5,25 – 5,40 (2H, m), 6,90 – 7,20 (8H, m).

30

Kontrolní příklad 7

2-(4-Ethylbenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glukopyranosid

35

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu
5 za použití 2-(4-ethylbenzyl)fenolu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenolu.

40

¹H-NMR (CDCl₃) δ mg/l: 1,20 (3H, t, J = 7,6 Hz), 1,87 (3H, s), 2,03 (3H, s), 2,05 (3H, s), 2,08
(3H, s), 2,60 (2H, q, J = 7,6 Hz), 3,80 – 4,00 (3H, m), 4,18 (1H, dd, J = 2,3, 12,2 Hz), 4,28 (1H,
dd, J = 5,4, 12,2 Hz), 5,11 (1H, d, J = 7,5 Hz), 5,10 – 5,25 (1H, m), 5,25 – 5,40 (2H, m), 6,90 –
7,25 (8H, m).

40

Kontrolní příklad 8

2-(4-Isobutylbenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glukopyranosid

45

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu
5 za použití 2-(4-isobutylbenzyl)fenolu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenolu.

50

¹H-NMR (CDCl₃) δ mg/l: 0,88 (6H, d, J = 6,6 Hz), 1,75 – 1,90 (1H, m), 1,87 (3H, s), 2,03 (3H,
s), 2,05 (3H, s), 2,08 (3H, s), 2,42 (2H, d, J = 7,2 Hz), 3,80 – 3,95 (3H, m), 4,18 (1H, dd, J = 2,4,
12,3 Hz), 4,29 (1H, dd, J = 5,5, 12,3 Hz), 5,11 (1H, d, J = 7,6 Hz), 5,10 – 5,25 (1H, m), 5,25 –
5,40 (2H, m), 6,90 – 7,25 (8H, m).

Kontrolní příklad 9

2-(4-Ethoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosid

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu 5 za použití 2-(4-ethoxybenzyl)fenolu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenolu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ mg/l: 1,39 (3H, t, $J = 7,0$ Hz), 1,91 (3H, s), 2,03 (3H, s), 2,05 (3H, s), 2,07 (3H, s), 3,80 – 3,95 (3H, m), 3,99 (2H, q, $J = 7,0$ Hz), 4,18 (1H, dd, $J = 2,5, 12,3$ Hz), 4,28 (1H, dd, $J = 5,6, 12,3$ Hz), 5,10 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 5,15 – 5,25 (1H, m), 5,25 – 5,40 (2H, m), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,95 – 7,10 (5H, m), 7,10 – 7,20 (1H, m).

Kontrolní příklad 10

2-(4-Isopropoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosid

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu 5 za použití 2-(4-isopropoxybenzyl)fenolu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenolu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ mg/l: 1,30 (6H, d, $J = 6,0$ Hz), 1,90 (3H, s), 2,03 (3H, s), 2,05 (3H, s), 2,08 (3H, s), 3,80 – 3,90 (3H, m), 4,18 (1H, dd, $J = 2,3, 12,3$ Hz), 4,28 (1H, dd, $J = 5,5, 12,3$ Hz), 4,48 (1H, hepten, $J = 6,0$ Hz), 5,10 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 5,10 – 5,25 (1H, m), 5,25 – 5,40 (2H, m), 6,70 – 6,85 (2H, m), 6,90 – 7,10 (5H, m), 7,10 – 7,20 (1H, m).

Kontrolní příklad 11

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid

Methoxid sodný (28% methanolvý roztok; 0,12 ml) se přidal do roztoku 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosidu (0,11 g) v methanolu (4 ml) a směs se 30 min míchala při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: dichlormethan/methanol = 10:1) a poskytl 2-(4-methoxybenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid (65 mg).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 3,35 – 3,55 (4H, m), 3,69 (1H, dd, $J = 5,1, 12,1$ Hz), 3,73 (3H, s), 3,80 – 4,00 (2H, m), 4,03 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,91 (1H, d, $J = 7,4$ Hz), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 6,95 (1H, m), 6,95 – 7,10 (1H, m), 7,10 – 7,20 (4H, m).

Kontrolní příklad 12

2-(4-Methylbenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu 11 za použití 2-(4-methylbenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosidu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosidu.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 2,27 (3H, s), 3,35 – 3,55 (4H, m), 3,69 (1H, dd, $J = 5,2, 12,0$ Hz), 3,80 – 3,90 (1H, m), 3,94 (1H, d, $J = 15,0$ Hz), 4,05 (1H, d, $J = 15,0$ Hz), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,85 – 6,95 (1H, m), 6,95 – 7,20 (7H, m).

Kontrolní příklad 13

2-(4-Ethylbenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid

5

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu 11 za použití 2-(4-ethylbenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosidu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosidu.

10 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 1,15 – 1,25 (3H, m), 2,50 – 2,65 (2H, m), 3,35 – 3,55 (4H, m), 3,65 – 3,75 (1H, m), 3,80 – 4,00 (2H, m), 4,06 (1H, d, $J = 14,9$ Hz), 4,85 – 5,00 (1H, m), 6,85 – 7,00 (1H, m), 7,00 – 7,20 (7H, m).

15 Kontrolní příklad 14

2-(4-Isobutylbenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid

20 Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu 11 za použití 2-(4-isobutylbenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosidu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosidu.

25 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 0,80 – 0,95 (6H, m), 1,70 – 1,90 (1H, m), 2,41 (2H, d, $J = 7,1$ Hz), 3,30 – 3,55 (4H, m), 3,60 – 3,75 (1H, m), 3,80 – 3,95 (1H, m), 3,95 (1H, d, $J = 15,0$ Hz), 4,06 (1H, d, $J = 15,0$ Hz), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,80 – 7,20 (8H, m).

Kontrolní příklad 15

30 2-(4-Ethoxybenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid

Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu 11 za použití 2-(4-ethoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosidu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosidu.

35

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 1,35 (3H, t, $J = 6,8$ Hz), 3,35 – 3,55 (4H, m), 3,60 – 3,75 (1H, m), 3,80 – 4,10 (5H, m), 4,90 (1H, d, $J = 7,1$ Hz), 6,70 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 6,95 (1H, m), 7,00 – 7,20 (5H, m).

40

Kontrolní příklad 16

2-(4-Isopropoxybenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid

45 Titulní sloučenina se připravila způsobem podobným způsobu popsanému v kontrolním příkladu 11 za použití 2-(4-isopropoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosidu namísto 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosidu.

50 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 1,27 (6H, d, $J = 6,0$ Hz), 3,35 – 3,55 (4H, m), 3,69 (1H, dd, $J = 5,4, 12,1$ Hz), 3,88 (1H, dd, $J = 2,0, 12,1$ Hz), 3,91 (1H, d, $J = 15,0$ Hz), 4,02 (1H, d, $J = 15,0$ Hz), 4,51 (1H, heptet, $J = 6,0$ Hz), 4,91 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 6,70 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 6,95 (1H, m), 7,00 – 7,10 (1H, m), 7,10 – 7,20 (4H, m).

Kontrolní příklad 17

2-(4-Ethylthiobenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid

5 Do roztoku 2-(4-ethylthiobenzyl)fenolu (0,51 g) a 1,2,3,6-penta-*O*-acetyl- β -D-glukopyranósy (2,4 g) v toluenu (6,3 ml) a dichlormethanu (2,7 ml) se přidal komplex fluoridu boritého a diethyletheru (0,78 ml) a směs se 9 h míchala při teplotě místnosti. Do reakční směsi se přidal ethylacetát (70 ml) a nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného (25 ml) a organická
10 vrstva se separovala. Organická vrstva se propláchla solankou (25 ml), sušila nad bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo se odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustil v methanolu (10,5 ml), do roztoku se přidal methoxid sodný (28% methanolvý roztok; 0,08 ml) a směs se 18 h míchala při 25 °C. Do reakční směsi se přidal ethylacetát (75 ml) a voda (20 ml) a organická
15 vrstva se separovala. Organická vrstva se propláchla solankou (20 ml), sušila nad bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo se odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval sloupcovou chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: dichlormethan/methanol = 10:1). Rozpouštědlo se odstranilo za sníženého tlaku, do zbytku se přidal diethylether a výsledná sraženina se jímala filtra-
trací. Získaná bezbarvá pevná látka se propláchla diethyletherem a po vysušení za sníženého tlaku poskytla 2-(4-ethylthiobenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid (0,51 g).

20 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 1,24 (3H, t, $J = 7,3$ Hz), 2,28 – 2,88 (2H, q, $J = 7,3$ Hz), 3,35 – 3,55 (4H, m), 3,69 (1H, dd, $J = 5,0, 12,2$ Hz), 3,88 (1H, dd, $J = 2,0, 12,2$ Hz), 3,95 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,08 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,91 (1H, d, $J = 7,3$ Hz), 6,85 – 7,00 (1H, m), 7,00 – 7,10 (1H, m), 7,10 – 7,30 (6H, m).

25

Příklad 1

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-*O*-ethoxykarbonyl- β -D-glukopyranosid

30 Do roztoku 2-(4-methoxybenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosidu (0,075 g) ve 2,4,6-trimethylpyridinu (2 ml) se přidal při teplotě místnosti ethylchlorformiát (0,04 ml). Po 16 h míchání směsi při teplotě místnosti se do reakční směsi přidal nasycený vodný roztok kyseliny citrónové a směs se extrahovala ethylacetátem. Extrakt se propláchl vodou a vysušil nad bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědlo odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval preparativní chromato-
35 grafii na tenké vrstvě na silikagelu (eluční činidlo: dichlormethan/methanol = 10:1) a poskytl amorfni 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-6-*O*-ethoxykarbonyl- β -D-glukopyranosid (0,032 g).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 1,23 (3H, t, $J = 7,1$ Hz), 3,30 – 3,65 (4H, m), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,02 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,05 – 4,20 (2H, m), 4,29 (1H, dd, $J = 6,4, 11,7$ Hz),
40 4,45 (1H, dd, $J = 2,2, 11,7$ Hz), 4,89 (1H, d, $J = 7,4$ Hz), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 7,05 (2H, m), 7,05 – 7,2 (4H, m).

Příklad 2

45

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-*O*-ethoxykarbonyl- β -D-glukopyranosid

Titulní sloučenina se připravila podobným způsobem, jakým byl popsán v příkladu 1 za použití methylchlorformiátu namísto ethylchlorformiátu.

50

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 3,30 – 3,65 (4H, m), 3,71 (3H, s), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,01 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,30 (1H, dd, $J = 6,4, 11,7$ Hz), 4,45 (1H, dd, $J = 2,1, 11,7$ Hz), 4,89 (1H, d, $J = 7,4$ Hz), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 7,05 (2H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

Příklad 3

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-O-[2-(methoxy)ethoxykarbonyl-β-D-glukopyranosid

Titulní sloučenina se připravila podobným způsobem, jakým byl popsán v příkladu 1 za použití 2-(methoxy)ethylchlorformiátu namísto ethylchlorformiátu.

¹H-NMR (CD₃OD) δ mg/l: 3,30 – 3,65 (9H, m), 3,74 (3H, s), 3,92 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,02 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,10 – 4,25 (2H, m), 4,30 (1H, dd, J = 6,3, 11,7 Hz), 4,47 (1H, dd, J = 2,1, 11,7 Hz), 4,89 (1H, d, J = 7,4 Hz), 6,70 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 7,05 (2H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

Příklad 4

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-O-hexanoyl-β-D-glukopyranosid

Do roztoku 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-β-D-glukopyranosidu (0,10 g) v 2,4,6-trimethylpyridinu (2 ml) se při 0 °C přidal hexanoylchlorid (0,072 g) a směs se 3 h míchala. Do reakční směsi se přidal 10% vodný roztok kyseliny citrónové a směs se extrahovala ethylacetátem. Organická vrstva se propláchlá 10% vodným roztokem kyseliny citrónové a solankou. Organická vrstva se vysušila nad bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědlo odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval preparativní chromatografií na tenké vrstvě na silikagelu (eluční činidlo: dichlormethan/methanol = 10:1) a poskytl 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-6-O-hexanoyl-β-D-glukopyranosid (0,030 g).

¹H-NMR (CD₃OD) δ mg/l: 0,80 – 0,95 (3H, m), 1,20 – 1,35 (4H, m), 1,50 – 1,6 (2H, m), 2,25 – 2,35 (2H, m), 3,30 – 3,65 (4H, m), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,01 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,22 (1H, dd, J = 6,7, 11,8 Hz), 4,42 (1H, dd, J = 2,2, 11,8 Hz), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 7,05 (2H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

Příklad 5

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-O-propionyl-β-D-glukopyranosid

Titulní sloučenina se připravila podobným způsobem, jakým byl popsán v příkladu 4 za použití propionylchloridu namísto hexanoylchloridu.

¹H-NMR (CD₃OD) δ mg/l: 1,08 (3H, t, J = 7,6 Hz), 2,25 – 2,40 (2H, m), 3,30 – 3,55 (3H, m), 3,55 – 3,65 (1H, m), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,01 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,23 (1H, dd, J = 6,7, 11,8 Hz), 4,40 (1H, dd, J = 2,1, 11,8 Hz), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 7,05 (2H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

Příklad 6

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-O-butyryl-β-D-glukopyranosid

Titulní sloučenina se připravila podobným způsobem, jakým byl popsán v příkladu 4 za použití butyrylchloridu namísto hexanoylchloridu.

¹H-NMR (CD₃OD) δ mg/l: 0,90 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,50 – 1,70 (2H, m), 2,20 – 2,35 (2H, m), 3,30 – 3,65 (4H, m), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,01 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,22 (1H,

dd, $J = 6,7, 11,8$ Hz), 4,42 (1H, dd, $J = 2,2, 11,8$ Hz), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 7,05 (2H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

5 Příklad 7

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-*O*-acetyl- β -D-glukopyranosid

10 Titulní sloučenina se připravila podobným způsobem, jakým byl popsán v příkladu 4 za použití acetylchloridu namísto hexanoylchloridu.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 2,02 (3H, s), 3,30 – 3,65 (4H, m), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,01 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,24 (1H, dd, $J = 6,5, 11,9$ Hz), 4,38 (1H, dd, $J = 2,2, 11,9$ Hz), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 7,05 (2H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

15

Příklad 8

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-*O*-isobutyryl- β -D-glukopyranosid

20

Titulní sloučenina se připravila podobným způsobem, jakým byl popsán v příkladu 4 za použití isobutyrylchloridu namísto hexanoylchloridu.

25 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 1,11 (3H, t, $J = 7,0$ Hz), 1,12 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 2,45 – 2,60 (1H, m), 3,30 – 3,65 (4H, m), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,00 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,19 (1H, dd, $J = 6,9, 11,8$ Hz), 4,43 (1H, dd, $J = 2,1, 11,8$ Hz), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,75 – 6,85 (2H, m), 6,85 – 7,05 (2H, m), 7,05 – 7,20 (4H, m).

30 Příklad 9

2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-*O*-ethylsukcinyln- β -D-glukopyranosid

35 Titulní sloučenina se připravila podobným způsobem, jakým byl popsán v příkladu 4 za použití ethylsukcinylnchloridu namísto hexanoylchloridu.

40 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ mg/l: 1,19 (3H, t, $J = 7,1$ Hz), 2,50 – 2,70 (4H, m), 3,30 – 3,65 (4H, m), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,02 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,03 (2H, q, $J = 7,1$ Hz), 4,22 (1H, dd, $J = 6,7, 11,8$ Hz), 4,44 (1H, dd, $J = 2,1, 11,8$ Hz), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,75 – 7,25 (8H, m).

Příklad 10

45 2-(4-Methoxybenzyl)fenyl-6-*O*-isopropoxykarbonyl- β -D-glukopyranosid

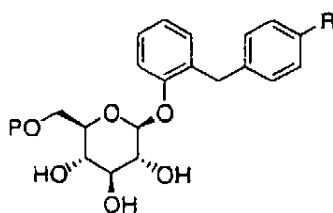
50 Do roztoku isopropanolu (0,12 g) v 2,4,6-trimethylpyridinu (2 ml) se při 0 °C přidal trifosgen (0,022 g) a směs se 1 h míchala. Potom se do reakční směsi se přidal 2-(4-methoxybenzyl)fenyl- β -D-glukopyranosid (0,075 g) a směs se při teplotě místnosti míchala přes noc. Do reakční směsi se přidal 10% vodný roztok kyseliny citrónové a směs se extrahovala ethylacetátem. Organická vrstva se propláchla 10% vodným roztokem kyseliny citrónové a vodou, sušila nad bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědlo se odstranilo za sníženého tlaku. Zbytek se purifikoval preparativní chromatografií na tenké vrstvě na silikagelu (eluční činidlo: dichlormethan/methanol =

10:1) a poskytl 2-(4-methoxybenzyl)-fenyl-6-O-isopropoxykarbonyl- β -D-glukopyranosid (0,024 g).

¹H-NMR (CD₃OD) δ mg/l: 1,21 (3H, d, J = 6,3 Hz), 1,23 (3H, d, J = 6,3 Hz), 3,30 – 3,6 (4H, m), 3,74 (3H, s), 3,93 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,02 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,28 (1H, dd, J = 6,4, 11,7 Hz), 4,43 (1H, dd, J = 2,2, 11,7 Hz), 4,70 – 4,85 (1H, m), 4,85 – 4,95 (1H, m), 6,75 – 7,20 (8H, m).

Příklad 11 až 22

Sloučeniny uvedené v následující tabulce 1 se připravily podobným způsobem, jaký byl popsán v příkladu 1 nebo 2 za použití sloučeniny získané v kontrolních příkladech 12 až 17.



Tabulka 1

Příklad	R	P
11	Methyl	Ethoxykarbonyl
12	Methyl	Methoxykarbonyl
13	Ethyl	Ethoxykarbonyl
14	Ethyl	Methoxykarbonyl
15	Isobutyl	Ethoxykarbonyl
16	Isobutyl	Methoxykarbonyl
17	Ethoxy	Ethoxykarbonyl
18	Ethoxy	Methoxykarbonyl
19	Isopropyl	Ethoxykarbonyl
20	Isopropyl	Methoxykarbonyl
21	Ethylthio	Ethoxykarbonyl
22	Ethylthio	Methoxykarbonyl

Testovací příklad 1

Test inhibičního účinku na aktivitu lidského SGLT2

1) Konstrukce plasmidového vektoru exprimujícího lidský SGLT2

Příprava cDNA knihovny pro PCR amplifikaci se prováděla reverzní transkripcí celkové RNA získané z lidské ledviny (Ori gene) s oligo dT jako primerem, za použití SUPERSSCRIPT

Preamplification System (Gibco-BRL: LIFE TECHNOLOGIES). DNA Fragment kódující lidský SGLT2 se amplifikoval Pfu DNA polymerázu (Stratagene) používající PCR reakcí, ve které se jako templát použila výše popsaná cDNA knihovna lidských ledvin a jako primery se použily následující oligonukleotidy 0702F a 0712R prezentované jako sekvenční číslo 1, respektive 2. Amplifikovaný DNA fragment se ligoval do pCR-Blunt (Invitrogen), tj. do vektoru pro klonování, za použití standardní metody po daný kit. Kompetentní buňka *Escherichia coli* HB101 (Toyobo) se transformovala za použití obvyklé metody a následná selekce transformantů se prováděla na LB agarovém médiu obsahujícím 50 µg/ml kanamycinu. Po extrakci plasmidové DNA a po její purifikaci z jednoho z transformantů se provedla amplifikace DNA fragmentu kódujícího lidský SGLT2. Pomocí Pfu DNA polymerázu (Stratagene) používající PCR reakce, ve které se jako primery použily následující oligonukleotidy 0714F a 0715R prezentované jako sekvenční číslo 3, respektive 4. Amplifikovaný DNA fragment se digeroval restrikcí enzyzy Xho I a Hind III a následně purifikoval Wizard Purification System (Promega). Tento purifikovaný DNA fragment se inzertoval v odpovídajících násobných klonovacích místech pcDNA3.1 (-) Myc/His-B (Invitrogen), tj. vektoru pro expresi fúzního proteinu. Kompetentní buňka *Escherichia coli* HB101 (Toyobo) se transformovala obvyklou metodou a následná selekce transformantu se prováděla na LB agarovém médiu obsahujícím 100 µg/ml ampicillinu. Po extrakci plasmidové DNA a po její purifikaci z tohoto transformantu se analyzovala sekvence bázi DNA fragmentu inzertovaného na násobná klonovací místa pcDNA3.1 (-) Myc/His-B. Tento klon měl jednobazickou substituci (ATC, které kódují isoleucin-433, byly nahrazeny GTC), v porovnání s lidským SGLT2, který zaznamenal Wells a kol. (Am. J. Physiol., sv. 263, str. 459 až 465 (1992)). Následně se získal klon, ve kterém valin nahradil isoleucin-433. Tento plasmidový vektor exprimující lidský SGLT2, ve kterém je peptid prezentovaný jako sekvenční číslo 5 navázán na karboxylový koncový alaninový zbytek, byl označen jako KL29.

Sekvenční číslo 1	ATGGAGGAGCACACAGAGGC
Sekvenční číslo 2	GGCATAGAAGCCCCAGAGGA
Sekvenční číslo 3	AACCTCGAGATGGAGGAGCACACAGAGGC
Sekvenční číslo 4	AACAAGCTTGGCATAGAAGCCCCAGAGGA
Sekvenční číslo 5	KLGPPEQKLISEEDLNSAVDHHHHH

2) Příprava buněk přechodně exprimujících lidský SGLT2

KL29, tj. plasmid kódující lidský SGLT2, se transfektoval do COS-7 buněk (RIKEN CELL BANK RCB0539) elektroporací. Elektroporace se prováděla pomocí GENE PULSER II (Bio-Rad Laboratories) za následujících podmínek: 0,290 kV, 975 µF, 2x 10⁶ buněk COS-7 a 20 µg KL29 v 500 µl OPTI-MEM I média (Gibco-BRL: LIFE TECHNOLOGIES) v 0,4cm typu kyvety. Po přenosu genu se buňky sklídily odstředováním a resuspendovaly pomocí OPTI-MEM I média (1 µl/kyveta). Do každé jamky 96jamkové plotny se umístilo 125 µl této buněčné suspenze. Po celonoční kultivaci při 37 °C za 5% CO₂ se do každé jamky přidalo 125 µl DMEM média, které obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra (Sanko Jyunyaku), 100 jednotek/ml natrium penicillinu G (Gibco-BRL: LIFE TECHNOLOGIES) a 100 µg/ml streptomycin sulfátu (Gibco-BRL: LIFE TECHNOLOGIES). Po kultivaci, která trvala do následujícího dne, se tyto buňky použily pro měření inhibiční aktivity proti absorpci methyl-α-D-glukopyranosidu.

3) Měření inhibiční aktivity proti absorpci methyl-α-D-glukopyranosidu

Potom, co se testovací sloučenina rozpustila v dimethylsulfoxidu a naředila absorpčním pufrům (hodnota pH 7,4, pufr obsahoval 140 mM chloridu sodného, 2 mM chloridu draselného, 1 mM chloridu vápenatého, 10 mM kyseliny 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonové a 5 mM tris(hydroxymethyl)aminomethanu), přičemž každé naředění se použilo jako testovací

vzorek pro měření inhibiční aktivity. Po odstranění média z COS-7 buněk přechodně exprimujících lidský SGLT2 se do každé jamky přidalo 200 μ l pufru pro předběžné ošetření (hodnota pH 7,4, pufr obsahoval 140 mM cholinchloridu, 2 mM chloridu draselného, 1 mM chloridu vápenatého, 1 mM chloridu hořečnatého, 10 mM kyseliny 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonové a 5 mM tris(hydroxymethyl)aminomethanu) a buňky se 10 min inkubovaly při 37 °C. Po odstranění pufru pro předběžné ošetření se opět přidalo 200 μ l stejného pufru a buňky se 10 min inkubovaly při 37 °C. Pufr pro měření se připravil přidáním 7 μ l methyl- α -D-(U-14C)-glukopyranosidu (Amersham Pharmacia Biotech) do 525 μ l připraveného testovacího vzorku. Pro kontrolní účely se připravil i pufr pro měření bez testované sloučeniny. Podobným způsobem se pro odhad základní absorpce při absenci testované sloučeniny a sodíku připravil pufr pro měření základní absorpce, který obsahoval namísto chloridu sodného 140 mM cholinchloridu. Po odstranění pufru pro předběžné ošetření se do každé jamky přidalo 75 μ l pufru pro měření a buňky se 2 h inkubovaly při 37 °C. Po odstranění pufru pro měření se do každé jamky přidalo a bezprostředně potom odstranilo 200 μ l proplachovaného pufru (hodnota pH 7,4, pufr obsahoval 140 mM cholinchloridu, 2 mM chloridu draselného, 1 mM chloridu vápenatého, 1 mM chloridu hořečnatého, 10 mM methyl- α -D-glukopyranosidu, 10 mM kyseliny 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonové a 5 mM tris(hydroxymethyl)aminomethanu). Po dvou dalších propláchnutích se buňky solubilizovaly přidáním 75 μ l 0,2N roztoku hydroxidu sodného do každé jamky. Potom se buněčné lyzáty přemístily do PicoPlate (Packard) a přidalo se 150 μ l MicroScint-40 (Packard), načež se pomocí mikroplotného scintilačního čítače TopCount (Packard) změřila radioaktivita. Rozdíl v absorpci se získal jako 100% hodnota odečtem radioaktivity při základní absorpci od radioaktivity při kontrolním měření a následně se z křivky koncentrace-inhibice vypočetly metodou nejmenších čtverců koncentrace, při kterých se dosáhlo 50% inhibice absorpce (hodnota IC₅₀). Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 2.

Tabulka 2

Testovaná sloučenina	IC ₅₀ hodnota (nM)
Kontrolní příklad 11	350
Kontrolní příklad 12	450
Kontrolní příklad 13	140
Kontrolní příklad 14	500
Kontrolní příklad 15	330
Kontrolní příklad 16	370
Kontrolní příklad 17	110

Testovací příklad 2

Test orální absorbovatelnosti

1) Příprava vzorků pro měření koncentrace účinné látky po intravenózní injekci do ocasní žíly

Jako testovací zvířata se použily SD krysy (CLEA JAPAN, INC., samečci, 5 týdnů starí, 140 až 170 g), které se nechaly přes noc hladovět. 60 mg Testované sloučeniny se suspendovalo nebo rozpustilo v 1,8 ml ethanolu a následně se rozpustilo přidáním 7,2 ml polyethylenglykolu 400 a 9 ml solného roztoku za vzniku 3,3 mg/ml roztoku. Zjistila se tělesná hmotnost krys, načež se roztok testované sloučeniny intravenózně injektoval do ocasní žíly krys, které nebyly anestetiko-

vány, v dávce 3 ml/kg (10 mg/kg). Pro intravenózní injekci do ocasní žíly se použila injekční jehla 26 G a 1ml injekční stříkačka. Časy pro odběr krve byly 2, 5, 10, 20, 30, 60 a 120 min po aplikaci intravenózní injekce do ocasní žíly. Krev se odstředila a plasma se použila jako vzorek pro měření koncentrace účinné látky v krvi.

5

2) Příprava vzorků pro měření koncentrace účinné látky po orálním podání

Jako testovací zvířata se použily SD krysy (CLEA JAPAN, INC., samečci, 5 týdnů staří, 140 až 170 g), které se nechaly přes noc hladovět. Testovaná sloučenina se suspendovala nebo rozpustila v 0,5% roztoku natrium-karboxymethylcelulózy v koncentraci 1 mg/ml účinné formy. Po zjištění tělesné hmotnosti krys se krysám orálně podala výše popsaná kapalina obsahující testovanou sloučeninou v dávce 10 ml/kg (10 mg/kg aktivní formy). Orální podání se provádělo pomocí žaludeční sondy a 2,5ml injekční stříkačky. Vzorky krve se odebíraly 15, 30, 60, 120 a 240 min po orálním podání. Krev se odstředila a plasma se použila jako vzorek pro měření koncentrace účinné látky v krvi.

15

3) Měření koncentrace účinné látky

Do 0,1 ml plasmy získané ve výše uvedených odstavcích 1) a 2), se jako vnitřní standard přidal 1 µg 2-(4-ethoxybenzyl)fenyl-β-D-glukopyranosidu popsaného v kontrolním příkladu 15, načež se přidáním 1 ml methanolu provedla deproteinizace. Po odstředění se methanolvá fáze pod proudem dusíku odpařila do sucha. Zbytek se rozpustil ve 300 µl mobilní fáze a do HPLC se vstříklo 30 µl alikvotního podílu tohoto roztoku. Koncentrace účinné látky v plasmě se analyzovala HPLC metodou za níže uvedených podmínek.

25

Kolona: Inertsil ODS-2 (4,6 x 250 mm);

mobilní fáze: acetonitril/10 mM fosfátového pufru (hodnota pH 3,0) = 25:75 (obj./obj.);

teplota kolony: 50 °C;

průtok: 1,0 ml/min;

30 vlnová délka pro měření: UV 232 nm.

Po přidání 1 µg 2-(4-ethoxybenzyl)fenyl-β-D-glukopyranosidu popsaného v kontrolním příkladu 15 jako vnitřního standardu a jednotlivých koncentrací (1,0, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05 a 0,02 µg) 2-(4-methoxybenzyl)fenyl-β-D-glukopyranosidu popsaného v kontrolním příkladu 11 do 0,1 ml čisté plasmy se provedla výše popsaná operace a následně se připravila standardní křivka.

35

Plocha pod křivkou koncentrace v plasmě/čas pro intravenózní injekci do ocasní žíly a pro orální podání testované sloučeniny se stanovila pomocí WinNonlin Standard vyrobeného společností Pharsight Corporation z koncentrací v plasmě, v každém okamžiku, získaných z HPLC, načež se za použití následující rovnice vypočetla biologická dostupnost (%). Výsledky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce 3.

40

biologická dostupnost (%) =

45
$$\frac{\text{plocha pod křivkou koncentrace v plasmě/čas pro orální podání}}{\text{plocha pod křivkou koncentrace v plasmě/čas pro intravenózní injekci do ocasní žíly}} \times 100$$

Tabulka 3

Testovaná sloučenina	Biologická dostupnost (%)
Příklad 1	46
Příklad 4	61
Kontrolní příklad 11	15

5

Testovací příklad 3

Test účinku usnadňujícího urinální vylučování glukózy

10

Jako testovací zvířata se použily SD krysy (SLC. Inc., samečci, 8 týdnů staří, 270 až 320 g), které nebyly na lačno. Testovaná sloučenina se suspendovala v 0,5% roztoku karboxymethylu a připravila se 0,3, 1 a 3 mg/ml suspenze. Po zjištění tělesné hmotnosti krys se testovaná suspenze orálně podala v dávce 10 ml/kg (3, 10 a 30 mg/kg). Pro kontrolní účely se orálně podal v dávce 10 ml/kg samotný 0,5% roztok natriumkarboxymethylcelulózy. Orální podání se provádělo pomocí žaludeční sondy a 2,5ml injekční stříkačky. Počet zvířat v jedné skupině byl 5 nebo 6. Odběr moči se prováděl v metabolické kleci po ukončení orálního podání. Odběr moči se provedl 24 h po orálním podání. Po ukončení odběru moči se objem moči zaznamenal a změnila se koncentrace glukózy v moči. Koncentrace glukózy se měřila pomocí kitu pro laboratorní test: Glucose B-Test WAKO (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Množství glukózy vylučované v moči během 24 h na 200 g tělesné hmotnosti se vypočetlo z objemu moči, koncentrace glukózy v moči a tělesné hmotnosti. Výsledky shrnuje následující tabulka 4.

25 Tabulka 4

Testovaná sloučenina	Dávka (mg/kg)	Množství glukózy vylučované v moči (mg/24 h·200 g tělesné hmotnosti)
Příklad 1	3	52
	10	239
	30	513

30 Testovací příklad 4

Test akutní toxicity

Čtyři týdny staří samečci ICR myši (CLEA JAPAN, INC. 22 až 28 g, 5 zvířat v každé skupině) se nechali 4 h hladovět, načež se jim orálně podala v dávce 10 ml/kg (600 mg/kg) 60 mg/ml suspenze testované sloučeniny v 0,5% roztoku karboxymethylcelulózy. Do 24 h po podání nebylo pozorováno žádné úmrtí, viz následující tabulka 5.

35

Tabulka 5

Testovaná sloučenina	Počet úmrtí
Příklad 1	0/5

5

Průmyslová využitelnost

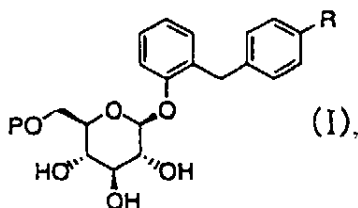
Deriváty glukopyranosyloxybenzylbenzenu výše uvedeného obecného vzorce I podle vynálezu mají zlepšenou orální absorpci a mohou vykazovat po orálním podání vynikající inhibiční účinnost u lidského SGLT2 *in vivo* převedením na své aktivní formy, tj. na deriváty glukopyranosyloxybenzylbenzenu výše uvedeného obecného vzorce II. Vynález může poskytovat činidla pro prevenci nebo léčbu choroby související s hyperglykemií, jakými jsou například diabetes, diabetické komplikace, obezita apod., která jsou rovněž vhodná jako orální formulace.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20

1. Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát obecného vzorce I



25

kde

P představuje acyl, alkoxy-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl nebo alkoxy-substituovaný alkoxykarbonyl; a

30

R představuje alkyl, alkoxy, alkylthio, alkoxy-substituovaný alkyl, alkoxy-substituovaný alkoxy nebo alkoxy-substituovaný alkylthio;

kde

35

kterékoliv alkylové nebo alkoxylové skupiny nebo zbytky obsahují 1 až 6 atomů uhlíku;

kterékoliv acylové skupiny nebo zbytky obsahují 2 až 7 atomů uhlíku;

40

kterékoliv alkylové skupiny nebo zbytky mohou mít přímý nebo rozvětvený řetězec;

kterékoliv alkoxylové skupiny nebo zbytky mohou mít přímý nebo rozvětvený řetězec, kromě alkoxylových zbytků alkoxykarbonylových skupin, které mohou mít přímý, rozvětvený nebo cyklický řetězec; a

45

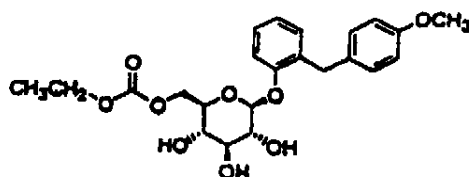
kterékoliv acylové skupiny nebo zbytky mohou mít přímý, rozvětvený nebo cyklický řetězec.

2. Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát obecného vzorce I podle nároku 1, kde R představuje alkyl nebo alkoxy a P představuje acyl, alkoxy-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl-substituovaný acyl, alkoxykarbonyl nebo alkoxy-substituovaný alkoxykarbonyl, kde kterékoliv alkylové, alkoxylové a acylové skupiny nebo zbytky odpovídají definicím uvedeným v nároku 1.

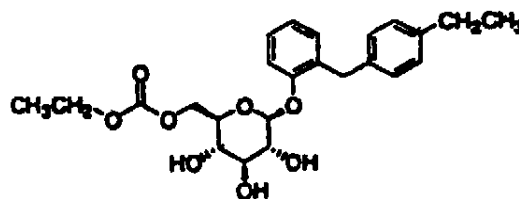
3. Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát obecného vzorce I podle nároku 1, kde R odpovídá definici uvedené v nároku 1 a P představuje acyl nebo alkoxykarbonyl, kde kterékoliv alkylové, alkoxylové a acylové skupiny nebo zbytky odpovídají definicím uvedeným v nároku 1.

4. Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát obecného vzorce I podle nároku 2 nebo 3, kde R odpovídá definici uvedené v nároku 2 a P odpovídá definici uvedené v nároku 3, přičemž kterékoliv alkylové, alkoxylové a acylové skupiny nebo zbytky odpovídají definicím uvedeným v nároku 1.

5. Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát podle nároku 4 vzorce



6. Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát podle nároku 4 vzorce



7. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje jako účinnou složku glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6.

8. Farmaceutická kompozice podle nároku 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že je ve formě vhodné pro perorální podávání.

9. Farmaceutická kompozice podle nároku 7 nebo 8 pro použití jako inhibitor humánního SGLT2.

10. Farmaceutická kompozice podle nároku 9 pro použití pro prevenci nebo léčení choroby spojené s hyperglykemií.

11. Farmaceutická kompozice podle nároku 10, kde chorobou spojenou s hyperglykemií je diabetes nebo diabetické komplikace.

12. Farmaceutická kompozice podle nároku 10, kde chorobou spojenou s hyperglykemií je obezita.

13. Použití glukopyranosyloxybenzylbenzenového derivátu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro výrobu farmaceutické kompozice pro prevenci nebo léčení choroby spojené s hyperglykemií.

14. Použití podle nároku 13, kde chorobou spojenou s hyperglykemií je diabetes nebo diabetické komplikace.

15. Použití podle nároku 13, kde chorobou spojenou s hyperglykemií je obezita.

5

16. Glukopyranosyloxybenzylbenzenový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro použití pro prevenci nebo léčení choroby spojené s hyperglykemií.

10

Konec dokumentu
