

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 305 460

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

**C07C 67/08** (2006.01)

**C07C 69/716** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-330**  
(22) Přihlášeno: **06.05.2013**  
(40) Zveřejněno: **19.11.2014**  
(Věstník č. 47/2014)  
(47) Uděleno: **26.08.2015**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **07.10.2015**  
(Věstník č. 40/2015)

(56) Relevantní dokumenty:

US 5 807 555 A; WO 2006/016143 A; US 5 614 537 A; US 5 324 725 A; WO 2011/050210 A; EP 1 887 081 A; EP 0 303 523 A.

(73) Majitel patentu:

Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:

Ing. Pavel Klein, Ph.D., Dolní Dobrouč, CZ

Mgr. Martin Pravda, Ph.D., Choceň, CZ

Mgr. Radovan Buffa, Ph.D., 06601 Humenné, SK

Mgr. Ilona Matějková, Ústí nad Orlicí, CZ

doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ

(74) Zástupce:

KANIA\*SEDLÁK\*SMOLA, Mgr. Martina

Dvořáková, Mendlovo nám. 1a, 603 00 Brno

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy esteru 2-oxoglutarátu,  
přípravek obsahující ester 2-oxoglutarát a  
jeho použití**

(57) Anotace:

Způsob přípravy esteru 2-oxoglutarátu v tavenině 2-oxoglutarové kyseliny reakcí s alkoholem R<sup>3</sup>OH.

CZ 305460 B6

## Způsob přípravy esteru 2-oxoglutarátu, přípravek obsahující ester 2-oxoglutarát a jeho použití

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy esteru 2-oxoglutarátu, přípravku, který obsahuje esteru 2-oxoglutarátu a jeho použití pro podporu biosyntézy kolagenu.

10

### Dosavadní stav techniky

Pro biosyntézu kolagenu je nezbytný prolin. Z prolinu pak post-translačně, působením prolyl-4-hydroxylázy vzniká hydroxyprolin nezbytný pro vznik trojšroubovice kolagenu a pro jeho mechanické vlastnosti. Neúplná hydroxylace prolinových reziduí X-Pro-Gly v opakujících se aminokyselinových motivech vede k chybám při syntéze kolagenové trojšroubovice (Myllyharju, 2003). Pro hydroxylaci prolinu je, spolu s  $\text{Fe}^{2+}$  ionty a vitamínem C, nezbytný meziprodukt Krebssova cyklu 2-oxoglutarát, který je substrátem právě pro prolyl-4-hydroxylázu. Přítomnost uvedených látek je tak pro biosyntézu kolagenu klíčová.

20

Použití nativního 2-oxoglutarátu jako prostředku pro stimulaci biosyntézy kolagenu je známo, přičemž pozitivní účinek látky byl experimentálně prokázán *in vitro* na kultuře fibroblastů a *in vivo*, na bezsrstých myškách dlouhodobě ozařovaných UVB. Zevní aplikace 1% 2-oxoglutarátu společně s propylenglykolem a etanolem vedla u pokusných zvířat k redukci následků aktinického stárnutí kůže, včetně potlačení tvorby vrásek (Son et al., 2007). Biologické dostupnosti a účinnosti transdermální penetrace 2-oxoglutarátu je zde dosaženo použitím propylenglykol-ethanolového nosiče, který naruší přirozenou funkci bariéry kůže tím, že naruší její povrchové struktury, což je nevýhodné. Korejský patent KR 1219294 popisuje kosmetickou kompozici účinnou při vyhlazení vrásek obsahující nemodifikovaný 2-oxoglutarát a případně  $\alpha$ -lipoovou kyselinu.

30

Nedostatkem tohoto řešení je použití nemodifikované molekuly, která pro svůj hydrofilní charakter obtížně překonává biologické bariéry a musí být kombinována s látkami (např. propylenglykol a ethanol), které prostup nemodifikované molekuly usnadňují a zvyšují tak její biologickou dostupnost. Tyto látky však fungují tak, že porušují přirozenou ochrannou funkci biologických bariér, což je nežádoucí. Navíc buňky na externí přídavek nemodifikovaného 2-oxoglutarátu reagují pouze mírným a statisticky nesignifikantním zvýšením produkce kolagenu.

35

Esterifikovaný 2-oxoglutarát je látka již známá a je popsán jako účinek na kontrolu pseudohypoxie v buňkách (MacKenzie et al.; 2007). Využití monoesterů 2-oxoglutarátu pro prevenci pseudohypoxie buněk je uvedeno v US2009/005437 (WO2006/016143). Je známo, že 2-oxokarboxylové kyseliny jsou obecně extrémně nestabilní, tudíž všechny dosud známé postupy přípravy esterů 2-oxoglutarové kyseliny popsané v literatuře byly provedeny bez zásadního zahřívání, dokonce v některých případech za chlazení (WO2006/016143).

40

45

### Podstata vynálezu

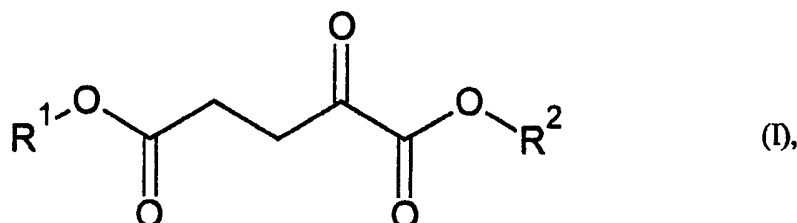
K hydrofobizaci molekuly, pomocí níž se molekula stane pro buňky biologicky dostupnější bez potřeby používat další pomocné látky je podle tohoto vynálezu využito esterifikace alespoň jedno karboxylu 2-oxoglutarátu alkoholem. Ester je jako transportní forma za fyziologických podmínek dostatečně stabilní k tomu, aby došlo ke snadnému prostupu molekuly přes fyziologické bariéry. Po přestupu do intracelulárních prostor je však rychle hydrolyzován přítomnými enzymy za vzniku biologicky aktivního 2-oxoglutarátu a biokompatibilních alkoholů.

50

Navíc ve srovnání s účinkem prostého 2-oxoglutarátu byl překvapivě zjištěn signifikantní prokolagenní účinek esterů 2-oxoglutarátu u buněk exponovaných oxidačnímu stresu vlivem například stáří, zánětu, působením UV záření, působením škodlivých chemických látek atd. Takovýto účinek je srovnatelný s účinky růstových hormonů.

5

Nedostatky dosavadního stavu techniky řeší ester 2-oxoglutarátu obecného vzorce I



10 kde

R1 a R2 jsou stejné nebo různé a jsou nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující vodík, C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> alkenyl, C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub> cykloalkyl, C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub> cykloalkenyl, C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alkylaryl nebo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alkylheteroaryl, ve kterém R1 a R2 volitelně obsahují jeden nebo více stejných nebo různých heteroatomů vybraných ze skupiny zahrnující N, O, S; a přičemž R1 a R2 nejsou současně vodík; nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli;

15

pro použití v medicíně, veterinární medicíně, kosmetice, biotechnologických aplikacích nebo v tkáňovém inženýrství pro stimulaci biosyntézy kolagenu, zvláště u buněk exponovaných oxidačnímu stresu.

20

Ester 2-oxoglutarát definovaný výše se použije pro výrobu zdravotnického prostředku, léčivého přípravku, veterinárního přípravku, veterinárního technického prostředku, veterinárního léčivého přípravku nebo přípravku sloužícího jako součást médií pro kultivaci a uchovávání buněk, pro tkáňové inženýrství nebo pro biotechnologické aplikace pro stimulaci biosyntézy kolagenu.

25

Přípravky uvedené výše se mohou použít pro stimulaci biosyntézy kolagenu *in vivo* v pojivových tkáních i v biotechnologických aplikacích a v buněčném a tkáňovém inženýrství.

30

Množství esteru 2-oxoglutarátu definovaného výše v přípravku podle vynálezu je v rozmezí 0,01 % hmotn. až 10 % hmotn. na celkovou hmotnost přípravku. Dále přípravek podle vynálezu obsahuje fyziologicky přijatelné pomocné látky vybrané ze skupiny zahrnující akryláty/C10-C30 alkylakrylát zesítěný polymer, pantenol, glycerin, metylparaben, estery mastných kyselin olivového oleje a sorbitanu/cetearyl alkoholu, sorbitan monolaurát, olivový olej, glycerylmonostearát, skvalen, butylparaben, makadamový olej, kyselinu hyaluronovou, její deriváty a soli, alantoin, polyakrylát sodný, cetearylalkohol, kokosové máslo, isododekan, hydroxypropylmethylcelulózu, sodnou sůl karboxymethylcelulózy, xylitol, manitol, erythritol, vazelína, tekutý parafin, propylen-glykol, stearomakrogol 100, stearomakrogol 1050, cetylalkohol, lehký tekutý parafin, propylparaben, kakaový olej, střední nasycené triacylglyceroly, benzylalkohol, sorbitany a polysorbáty, avokádové máslo, cetareth-20, cetyl alkohol, bambucké máslo, sorbitan stearát, span 20, 60, 80 stearovou kyselinu, stearyl palmitát, xanthanovou gumu, 1,3-butanediol, mandlový olej, aloe vera, dimethikon, izopropylmyristát, polyethylenglykoly (např. PEG-100 stearát, PEG 400), olej z hroznových jader nebo izohexadekan, které se běžně používají pro přípravky především v oblasti kosmetiky, medicíny, veteriny, tkáňového inženýrství a při biotechnologických aplikacích.

45

Přípravek podle vynálezu je ve formě roztoku, emulze, suspenze, gelu, masti, krému nebo obvazového materiálu.

Přípravek podle vynálezu se s výhodou použije pro stimulaci biosyntézy kolagenu u buněk exponovaných oxidačnímu stresu obsahující kolagen.

5 Oxidační stres je nerovnováha mezi tvorbou reaktivního kyslíku (jinak též volných radikálů), který vzniká jako vedlejší produkt okysličování a látkové výměny, a schopností organismu rychle odbourávat a detoxikovat reaktivní meziprodukty. Podílí se na mnoha nemocech, jako je například ateroskleróza, Parkinsonova nemoc, srdeční selhání nebo infarkt myokardu. Dlouhodobý oxidační stres je mimo jiné příčinou například stárnutí kůže, jejíž buňky se vyznačují zvýšenou chybou v post-translační modifikaci kolagenu. K takovéto chybě však také může dojít u kterýchkoliv buněk obsahujících kolagen například působením UV zářením, zánětem a dalšími škodlivými látkami, jak je uvedeno výše.

15 Přípravek podle vynálezu je vybrán ze skupiny zahrnující zdravotnický prostředek, léčivý přípravek, veterinární přípravek, veterinární technický prostředek, veterinární léčivý přípravek nebo přípravek sloužící jako součást médií pro kultivaci a uchovávání buněk, pro tkáňové inženýrství a pro biotechnologické aplikace.

20 Ester 2-oxoglutarát definovaný výše se s výhodou připraví způsobem, jehož podstatou je, že kyselina 2-oxoglutarová reaguje s alkoholem obecného vzorce  $R_3-OH$ , kde  $R_3$  je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující  $C_1-C_{30}$  alkyl,  $C_2-C_{30}$  alkenyl,  $C_4-C_{30}$  cykloalkyl,  $C_4-C_{30}$  cykloalkenyl,  $C_1-C_{30}$  alkylaryl nebo  $C_1-C_{30}$  alkylheteroaryl volitelně obsahující jeden nebo více stejných nebo různých heteroatomů vybraných ze skupiny zahrnující N, O, S; nad teplotou tání kyseliny 2-oxoglutarové, s výhodou při teplotách 113,6 °C až 125 °C, výhodněji při 120 °C.

25 Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu esterifikační reakce probíhá 0,5 až 2 hodiny, s výhodou 1 hodinu. Výhodné množství alkoholu v reakční směsi je v rozsahu 2 až 3 molární ekvivalenty vzhledem k molárnímu množství 2-oxoglutarové kyseliny, výhodněji 2,4 molárního ekvivalentu vzhledem k molárnímu množství 2-oxoglutarové kyseliny.

30 Způsob přípravy esteru 2-oxoglutarátu podle tohoto vynálezu je na rozdíl od postupů dosud známých zcela odlišný. Jelikož není nutná přítomnost rozpouštědel, katalyzátorů, a ani aktivčních činidel, vzniklá směs se nemusí nijak izolovat nebo čistit, což značně usnadňuje samotnou přípravu a snižuje cenu připraveného materiálu. Jako aktivní látka pro přípravu přípravku podle vynálezu se používá přímo hrubá reakční směs.

35 Účinnost podpory produkce kolagenu byla sledována jednak u buněk juvenilních dárců, jednak u buněk dárců senescentních. Buňky senescentních dárců (věk nad 50 let) sloužily jako model buněk exponovaných oxidačnímu stresu, u nichž je všeobecně známá zvýšená chybavost post-translační modifikace kolagenu.

40

#### Objasnění výkresů

45 Obr. 1 znázorňuje viabilitu buněk linie T3T v přítomnosti 5 různých šarží hexyl-2-oxoglutarátu (šarže OG50 až OG54 připravené podle příkladu 1) o koncentraci 50 – 500  $\mu g$  / ml. Pro měření viability buněk byl použit test s neutrální červení.

50 Obr. 2 znázorňuje viabilitu buněk linie T3T v přítomnosti 2-fenyletyl-2-oxoglutarátu (šarže OG47 připravená podle příkladu 2) o koncentraci 50 až 500  $\mu g$  / ml. Kontrola bylo samotné rozpouštědlo (dimetylsulfoxid; DMSO). Pro měření viability buněk byl použit test s neutrální červení.

Obr. 3 znázorňuje vliv hexylesteru 2-oxoglutarátu připraveného podle příkladu 1 na *in vitro* produkci kolagenu lidskými kožními fibroblasty (NHDF) z dětských dárců a z dárců starších 50 let.

55

Obr. 4 znázorňuje vliv 2-fenyletyl esteru 2-oxoglutarátu připraveného podle příkladu 2 na *in vitro* produkci kolagenu lidskými kožními fibroblasty (NHDF).

Obr. 5 znázorňuje vliv 2-fenyletyl esteru 2-oxoglutarátu připraveného podle příkladu 2 na *in vitro* produkci kolagenu lidskými gingválními fibroblasty (HGF).

#### Příklady uskutečnění vynálezu

Následující příklady provedení podle vynálezu mají být chápány jako ilustrativní, aniž by jakkoli omezovaly rozsah vynálezu a požadované ochrany.

SE = stupeň esterifikace =  $nE/nK$ , popisuje kolik esterových skupin připadá průměrně na jednu molekulu výchozí kyseliny 2-oxoglutarové

$nE$  = molární množství všech esterových vodíků ( $\text{alkyl-CH}_2\text{-O-CO-}$ ) vyjádřeno integrálem signálů v  $^1\text{H}$  NMR spektru v intervalu 4,0 až 4,5 ppm

$nK$  = molární množství všech alfa-keto vodíků ( $\text{-O-CO-CH-CH}_2\text{-}$ ) vyjádřeno integrálem signálů v  $^1\text{H}$  NMR spektru v intervalu 3,0 až 3,3 ppm

$^1\text{H}$  NMR spektra měřené v deuterovaném chloroformu na přístroji s frekvencí 500 MHz, chemické posuny byly kalibrovány vůči vnitřnímu standardu deuterované 3-trimethylsilylpropanové kyseliny.

#### Příklad 1

Příprava hexylesterů 2-oxoglutarátu.

2-Oxoglutarová kyselina (1 g) byla roztavena při teplotě 115 °C. Potom byly pomalu přidány 2 ekvivalenty 1-hexanolu a směs byla míchána 2 h při teplotě 115 °C. Výsledný produkt (20 mg) byl pak rozpuštěn v deuterovaném trichlormethanu (0,8 ml) a analyzován pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie, SE = 1,4.

#### Příklad 2

Příprava 2-fenylesterů 2-oxoglutarátu.

2-Oxoglutarová kyselina (1g) byla roztavena při teplotě 115 °C. Potom byly pomalu přidány 2 ekvivalenty 2-fenylethylalkoholu a směs byla míchána 0,5 h při teplotě 125 °C. Výsledný produkt (20 mg) byl pak rozpuštěn v deuterovaném trichlormethanu (0,8 ml) a analyzován pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie, SE = 1,9.

#### Příklad 3

Příprava oktylesterů 2-oxoglutarátu.

2-Oxoglutarová kyselina (1g) byla roztavena při teplotě 115 °C. Potom byly pomalu přidány 2 ekvivalenty 1-oktanolu a směs byla míchána 1 h při teplotě 125 °C. Výsledný produkt (20 mg) byl pak rozpuštěn v deuterovaném trichlormethanu (0,8 ml) a analyzován pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie, SE = 1,5.

## Příklad 4

Příprava 3-(thiofen-2-yl)butyl esterů 2-oxoglutarátu.

2-Oxoglutarová kyselina (1g) byla roztavena při teplotě 115 °C. Potom byly pomalu přidány 3 ekvivalenty 4-(thiofen-2-yl)butan-1-olu a směs byla míchána 1 h při teplotě 120 °C. Výsledný produkt (20 mg) byl pak rozpuštěn v deuterovaném chloroformu (0,8 ml) a analyzován pomocí <sup>1</sup>H NMR spektroskopie, SE = 1,4.

## Příklad 5

Příprava 4-(1-methylpiperidinium-1-yl)-butyl esterů 2-oxoglutarátu.

2-Oxoglutarová kyselina (1g) byla roztavena při teplotě 115 °C. Potom byly pomalu přidány 2 ekvivalenty 4-(1-methylpiperidinium-1-yl)butan-1-olu a směs byla míchána 1 h při teplotě 120 °C. Výsledný produkt (20 mg) byl pak rozpuštěn v deuterovaném trichlormethanu (0,8 ml) a analyzován pomocí <sup>1</sup>H NMR spektroskopie, SE = 1,3.

## Příklad 6

Příprava okt-7-en-1-yl esterů 2-oxoglutarátu.

2-Oxoglutarová kyselina (1g) byla roztavena při teplotě 115 °C. Potom byly pomalu přidány 2,6 ekvivalenty okt-7-en-1-olu a směs byla míchána 1 h při teplotě 120 °C. Výsledný produkt (20 mg) byl pak rozpuštěn v deuterovaném trichlormethanu (0,8 ml) a analyzován pomocí <sup>1</sup>H NMR spektroskopie, SE = 1,6.

## Příklad 7

Příprava 4-(cyklohex-1-en-1-yl)butyl esterů 2-oxoglutarátu.

2-Oxoglutarová kyselina (1g) byla roztavena při teplotě 115 °C. Potom byly pomalu přidány 2,8 ekvivalenty 4-(cyklohex-1-en-1-yl)butan-1-olu a směs byla míchána 1 h při teplotě 120 °C. Výsledný produkt (20 mg) byl pak rozpuštěn v deuterovaném trichlormethanu (0,8 ml) a analyzován pomocí <sup>1</sup>H NMR spektroskopie, SE = 1,7.

## Příklad 8

Příprava 4-cyklohexylbutyl esterů 2-oxoglutarátu.

2-Oxoglutarová kyselina (1g) byla roztavena při teplotě 115 °C. Potom byly pomalu přidány 2,6 ekvivalenty 4-cyklohexylbutan-1-olu a směs byla míchána 1 h při teplotě 120 °C. Výsledný produkt (20 mg) byl pak rozpuštěn v deuterovaném chloroformu (0,8 ml) a analyzován pomocí <sup>1</sup>H NMR spektroskopie, SE = 1,5.

## Příklad 9

Byl připraven kosmetický přípravek smícháním jednotlivých složek uvedených níže

5

Složení kosmetického přípravku ve formě krému

|    |                                                                                               | hmotn./hmotn. (w/w) |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 10 | 1) triglyceridy kyseliny oktanové a dekanové kyseliny<br>(Triglyceride, MakingCosmetics, USA) | 12 %                |
|    | 2) glyceryl monostearát, PEG 100 stearát 5 %<br>(CreamMaker Blend, Making Cosmetics, USA)     |                     |
| 15 | 3) akrylát sodný, kopolymer akryloyldimethyl taurátu,<br>isohexadekan, polysorbát 80          | 2 %                 |
|    | (GelMaker EMU, Making Cosmetics, USA)                                                         |                     |
| 20 | 4) tokoferyl acetát                                                                           | 1 %                 |
|    | 5) glycerin                                                                                   | 4 %                 |
|    | 6) hexylester kyseliny 2-oxoglutarové                                                         | 5 %                 |
|    | 7) benzylalkohol, DHA                                                                         | 0,8 %               |
| 25 | 8) parfém                                                                                     | 0,2 %               |
|    | 9) destilovaná voda                                                                           | 75 %.               |

## Příklad 10

30

Byl připraven kosmetický přípravek smícháním jednotlivých složek uvedených níže

Složení kosmetického přípravku ve formě gelu

35

|    |                                                                                                                                                                    | hmotn./hmotn. (w/w) |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|    | 1) hyaluronát sodný                                                                                                                                                | 0,7 %               |
|    | 2) destilovaná voda                                                                                                                                                | 88,25 %             |
| 40 | 3) PEG-40 hydrogenovaný ricinový olej                                                                                                                              | 0,6 %               |
|    | 4) ethylalkohol 96%                                                                                                                                                | 2 %                 |
|    | 5) parfém                                                                                                                                                          | 0,05 %              |
|    | 6) 1,3-butandiol                                                                                                                                                   | 2 %                 |
| 45 | 7) laktát sodný, sodná sůl pyrrolidonuhličité kyseliny,<br>glycin, fruktóza, močovina, niacinamid, inositol,<br>benzoát sodný, kyselina mléčná<br>(Lactil, Evonik) | 3 %                 |

|     |                                                                            |         |
|-----|----------------------------------------------------------------------------|---------|
| 9)  | disodná sůl EDTA                                                           | 0,05 %  |
| 10) | D–panthenol                                                                | 0,03 %  |
| 11) | glycerin, kopolymer glyceryl akrylátu/kyseliny akrylové,<br>propylenglykol |         |
| 5   | (Lubrajel MS, Ashland)                                                     | 2 %     |
|     | hexylesterkyseliny 2–oxoglutarové v PEG400 (1%)                            | 1 %     |
|     | methylchlorisothiazolinon, methylisothiazolinon<br>(Isocil PC, Lonza AG)   | 0,05 %. |

10

## Příklad 11

Byl připraven kosmetický přípravek smícháním jednotlivých složek uvedených níže

15 Složení kosmetického přípravku ve formě krému

|    |                                                                                               | hmotn./hmotn. (w/w) |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 20 | 1) Steareth–2 (PEG–2 stearylether)                                                            | 2 %                 |
|    | 2) Steareth–21 (PEG–21 stearylether)                                                          | 2 %                 |
|    | 3) PPG–15 stearylether                                                                        | 9 %                 |
|    | 4) kyselina palmitová, kyselina stearová<br>(Cutina FS 45, Cognis)                            | 1,5 %               |
| 25 | 5) dimetikon (silikonový olej)                                                                | 0,5 %               |
|    | 6) isopropylmyristát                                                                          | 3 %                 |
|    | 7) triglyceridy kyseliny oktanové a kyseliny dekanové<br>(Triglyceride, MakingCosmetics, USA) | 2 %                 |
|    | 8) skvalen                                                                                    | 3 %                 |
| 30 | 9) cetylalkohol                                                                               | 2 %                 |
|    | 10) glycerylstearát                                                                           | 1 %                 |
|    | 11) hexylesterkyseliny 2–oxoglutarové                                                         | 10 %                |
|    | 12) glycerin                                                                                  | 4 %                 |
|    | 13) D–panthenol                                                                               | 0,5 %               |
| 35 | 14) destilovaná voda                                                                          | 59,25 %             |
|    | 15) methylchlorisothiazolinon, methylisothiazolinon<br>(Isocil PC, Lonza AG)                  | 0,05 %              |
|    | 16) parfém                                                                                    | 0,2 %.              |

40

## Příklad 12

## Test viability buněk

45 Na přiloženém Obr. 1 je uvedena viabilita buněk (fibroblasty linie 3T3) v přítomnosti hexylesteru 2–oxoglutarátu (50 až 500 µg / ml) připraveného dle Příkladu 1. Na přiloženém Obr. 2 je uvede-

na viabilitu buněk (fibroblasty linie 3T3) v přítomnosti 2-fenyletyl esteru 2-oxoglutarátu (50 až 500 µg/ml) připraveného podle Příkladu 2. Viabilita byla měřena standardní metodou s neutrální červení. Výsledky dokládají, že testované estery nejsou cytotoxické.

5

### Příklad 13

Srovnávací *in vitro* test účinků hexylesteru 2-oxoglutarátu (Obr. 3) a 2-fenylethyl (Obr. 4 a 5) na produkci celkového kolagenu

10

Na přiloženém Obr. 3 jsou uvedeny výsledky testu vlivu hexylesteru 2-oxoglutarátu (1000 µg/ml) připraveného dle příkladu 1 na *in vitro* produkci celkového kolagenu lidskými kožními fibroblasty (NHDF) získanými od lidských dárců (věk 50 až 65 let – senescentní buňky) a též (věk 8 až 11 let – juvenilní buňky). Na přiloženém Obr. 4 jsou uvedeny výsledky testu vlivu 2-fenyletyl esteru 2-oxoglutarátu (10 až 1000 µg / ml) připraveného dle příkladu 2 na *in vitro* produkci celkového kolagenu lidskými kožními fibroblasty (NHDF) získanými od lidských dárců (věk 50 až 65 let). Na přiloženém Obr. 5 jsou uvedeny výsledky testu vlivu 2-fenyletyl esteru 2-oxoglutarátu (10 – 1000 µg / ml) připraveného dle příkladu 2 na *in vitro* produkci celkového kolagenu lidskými gingiválními fibroblasty (HGF) získanými od lidských dárců (ženy, 50 až 60 let).

20

Pro sledování produkce kolagenu byly buňky nasazeny do 96jamkových kultivačních panelů v nasazovací hustotě 10 000 buněk/jamku a po dobu minimálně 12 h byly kultivovány v médiu (DMEM) s 10% fetálního bovinního séra. Poté bylo médium vyměněno za DMEM obsahující prolin (400 mg / l) a vitamin C (2-fosfo-L-askorbát trisodný; 480 mg/l). Po dalších 20 až 24 h bylo toto médium vyměněno za DMEM s testovanými látkami (expozice 24 h.). Celková produkce kolagenu byla zjišťována v médiu metodou specifického barvení kolagenu roztokem saturnové červení F3B200 v kyselině pikrové (Walsh et al., 1992; Heng et al. 2006).

25

Všechny experimenty na buněčných kulturách byly minimálně 3x opakovány za dodržení výše popsaných experimentálních podmínek. Získaná data byla statisticky vyhodnocena analýzou rozptylu, pro porovnání jednotlivých skupin (multiple range test) byl použit Schéffeho test. Výsledky dokládají, že hexylester 2-oxoglutarátu připravený dle příkladu 1 a 2-fenyletyl ester 2-oxoglutarátu připravený dle příkladu 2 signifikantně zvýšily celkovou produkci kolagenu lidskými dermálními fibroblasty. 2-Fenyletyl ester 2-oxoglutarátu připravený podle příkladu 2 signifikantně zvýšil celkovou produkci kolagenu lidskými gingiválními fibroblasty. Překvapivý účinek je patrný nejen ve srovnání s kontrolou (neovlivněné buňky), ale i ve srovnání s nemodifikovaným 2-oxoglutarátem.

35

Podle publikovaných experimentálních údajů (Son et al. 2007) se v případě senescentních buněk statisticky signifikantní prokolagenní účinek nemodifikovaného 2-oxoglutarátu nepotvrdil. Navíc jak je patrný z Obr. 3 účinek 2-oxoglutarátu a esteru 2-oxoglutarátu na produkci kolagenu u buněk juvenilních dárců statisticky srovnatelný.

40

### Použitá literatura

45

Heng EC, Huang Y, Black SA Jr., Trackman PC: CCN2, connective tissue growth factor, stimulates collagen deposition by gingival fibroblasts via module 3 and alpha6- and beta1 integrins. *J Cell Biochem.* 2006;**98**(2):409–20.

50

Vandenhoevel FA: Structure of membranes and role of lipids therein. *Adv Lipid Res.* 1971;**9**:161–248.

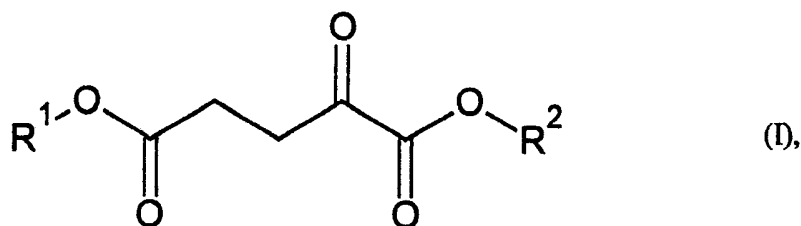
55

Myllyharju J: Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol.* 2003;**22**(1):15–24.

- Son ED, Choi GH, Kim H, Lee B, Chang IS, Hwang JS: Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice. *Biol Pharm Bull.* 2007;**30**(8):1395–9.
- MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, Watson DG, Gottlieb E: Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol.* 2007;**27**(9):3282–9.
- Benson, H. A. E., Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. In *Current Drug Delivery*, Bentham Science Publishers Ltd.: 2005; Vol. 2, pp 23–33.
- Rosenblat G, Perelman N, Katzir E, Gal-Or S, Jonas A, Nimni ME, Sorgente N, Neeman I: Acylated ascorbate stimulates collagen synthesis in cultured human foreskin fibroblasts at lower doses than does ascorbic acid. *Connect Tissue Res.* 1998;**37**(3–4):303–11.
- Walsh BJ, Thornton SC, Penny R, Breit SN: Microplate reader-based quantitation of collagens. *Anal Biochem.* 1992;**203**(2):187–90.
- Gottlieb E, Selak MA, Mackenzie ED, Watson DG: ALPHA-KETOGLUTARATES AND THEIR USE AS THERAPEUTIC AGENTS. WO/2006/016143, 2006.
- Son ED, Lee SH, Kim HK, Park CM, Hwang JS, Chang IS: ANTI-WRINKLE COSMETIC COMPOSITION CONTAINING ALPHA-KETOGLUTARATE, KR 20080011543 (A), 2008

## PATENTOVÉ NÁROKY

### 1. Způsob přípravy esteru 2-oxoglutarátu obecného vzorce I



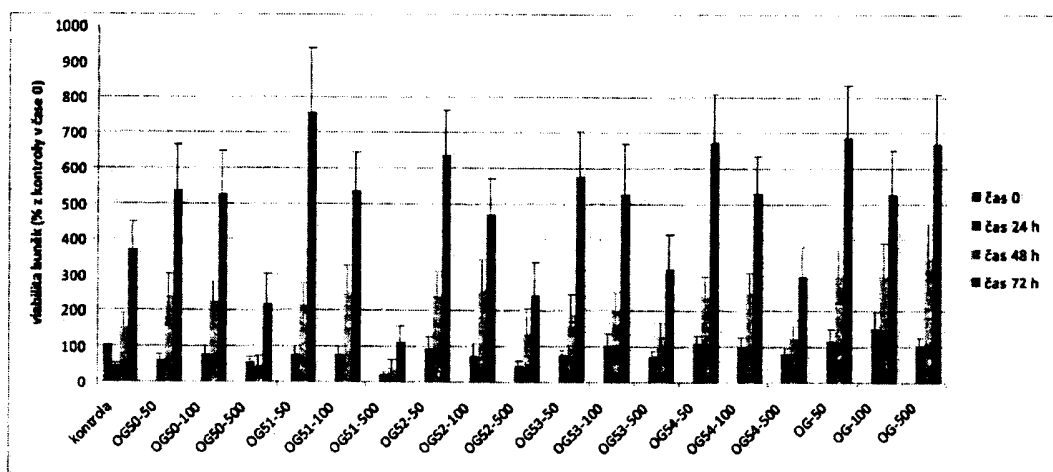
kde

- R1 a R2 jsou stejné nebo různé a jsou nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující vodík, C<sub>1</sub>–C<sub>30</sub> alkyl, C<sub>2</sub>–C<sub>30</sub> alkenyl, C<sub>4</sub>–C<sub>30</sub> cykloalkyl, C<sub>4</sub>–C<sub>30</sub> cykloalkenyl, C<sub>1</sub>–C<sub>30</sub> alkylaryl nebo C<sub>1</sub>–C<sub>30</sub> alkylheteroaryl, ve kterém R1 a R2 volitelně obsahují jeden nebo více stejných nebo různých heteroatomů vybraných ze skupiny zahrnující N, O, S; a přičemž R1 a R2 nejsou současně vodík; nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli,
- vyznačující se tím**, že reakce kyseliny 2-oxoglutarové probíhá s alkoholem podle obecného vzorce R<sup>3</sup>OH, kde R<sup>3</sup> je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující C<sub>1</sub>–C<sub>30</sub> alkyl, C<sub>2</sub>–C<sub>30</sub> alkenyl, C<sub>4</sub>–C<sub>30</sub> cykloalkyl, C<sub>4</sub>–C<sub>30</sub> cykloalkenyl, C<sub>1</sub>–C<sub>30</sub> alkylaryl nebo C<sub>1</sub>–C<sub>30</sub> alkylheteroaryl volitelně obsahující jeden nebo více stejných nebo různých heteroatomů vybraných ze skupiny zahrnující N, O, S; v tavenině 2-oxoglutarové kyseliny.

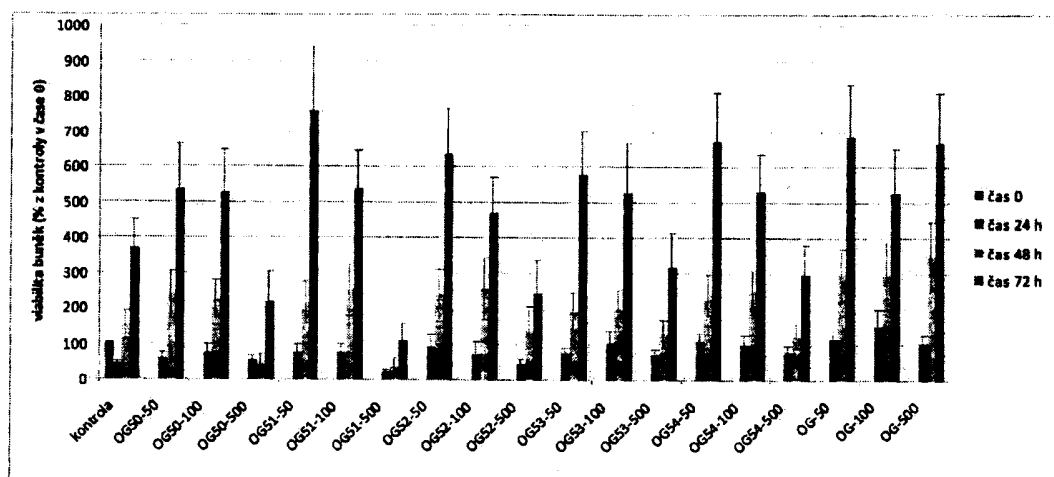
2. Způsob přípravy esteru 2-oxoglutarátu obecného vzorce I podle nároku 1, **v y z n a ě u j í -**  
**c í s e t í m**, že  $R^3$  je vybrán ze skupiny zahrnující hexyl, oktyl, fenylethyl.
- 5 3. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakce kyseliny 2-oxoglutarové probíhá s alkoholem při teplotách 113,6 °C až 125 °C.
4. Způsob podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakce probíhá při teplotě 120 °C.
- 10 5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakce kyseliny 2-oxoglutarové probíhá s alkoholem 0,5 až 2 hodiny.
6. Způsob podle nároku 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakce kyseliny 2-oxoglutarové probíhá s alkoholem 1 hodinu.
- 15 7. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že množství alkoholu v reakční směsi je v rozsahu 2 až 3 molární ekvivalenty vzhledem k molárnímu množství 2-oxoglutarové kyseliny.
- 20 8. Způsob podle nároku 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že množství alkoholu v reakční směsi je 2,4-molárního ekvivalentu vzhledem k molárnímu množství 2-oxoglutarové kyseliny.

25

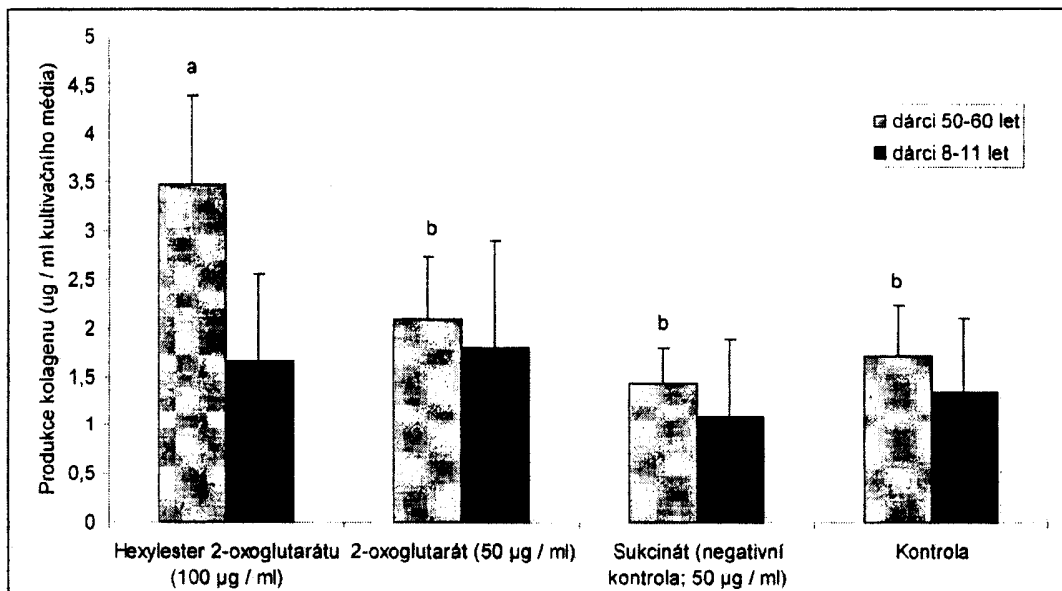
4 výkresy



Obr. 1

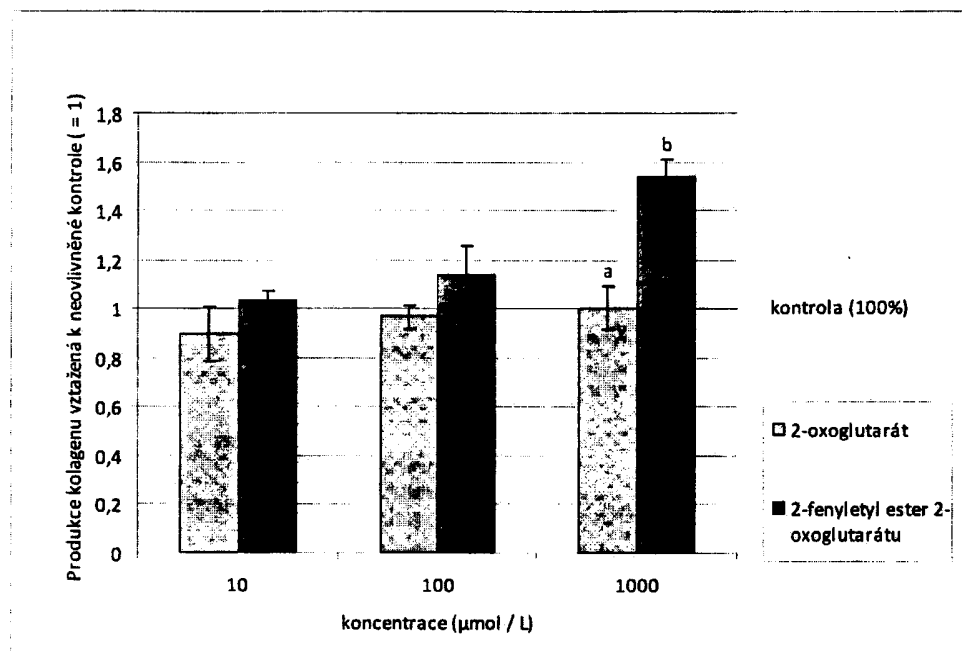


Obr. 2



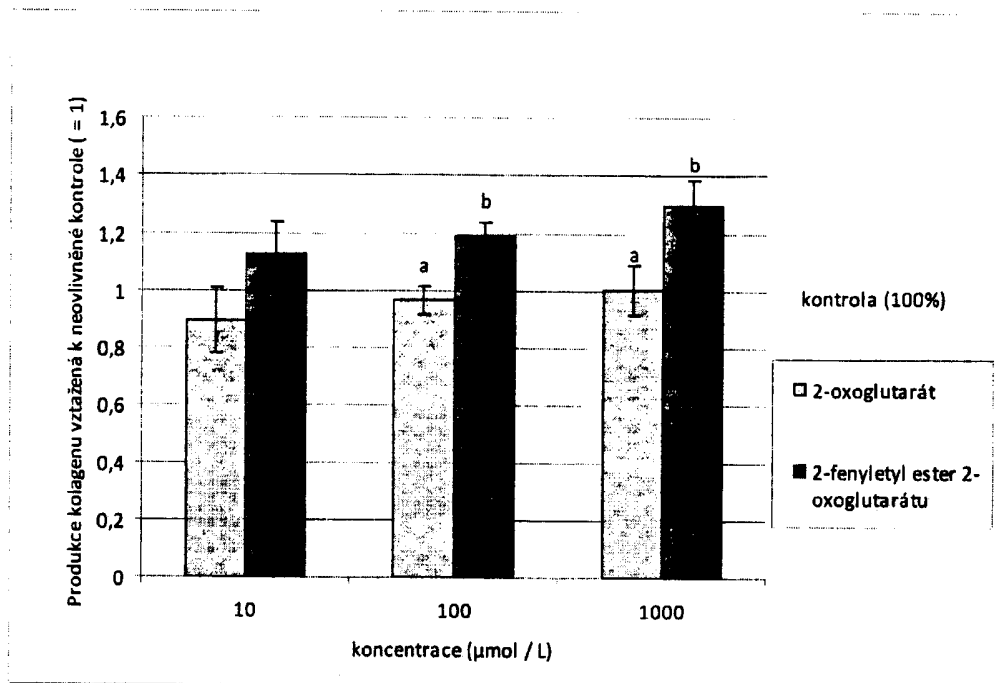
a,b :  $p < 0,01$ ; Sukcinát použit jako negativní kontrola

Obr. 3



a,b :  $p < 0,01$

Obr. 4



a,b :  $p < 0,01$

Obr. 5

---

Konec dokumentu

---