

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

300 722

(19)
ČESKÁ
REPUBLICA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2006-606**
(22) Přihlášeno: **27.09.2006**
(40) Zveřejněno: **22.10.2008**
(Věstník č. 43/2008)
(47) Uděleno: **15.06.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **22.07.2009**
(Věstník č. 29/2009)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/56 (2006.01)
C07J 63/00 (2006.01)
C07J 71/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 92/09553 A; US 6 403 816 B; WO 03/026603 A.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,
Praha, CZ

Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
I.Q.A., a. s., Praha, CZ

(72) Původce:

Šarek Jan RNDr. PhD., Praha, CZ

Hajdúch Marian Doc. MUDr. PhD., Olomouc, CZ

Svoboda Michal RNDr. CSc., Praha, CZ

Nováková Kateřina Ing., Kladno, CZ

(74) Zástupce:

Inventia s.r.o., Ing. Marta Gabrielová, patentový
zástupce, Na Bělidle 3, Praha 5, 15000

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy inkluzního komplexu
pentacyklických a tetracyklických terpenoidů a
farmaceutického prostředku obsahujícího tento
inkluzní komplex, inkluzní komplex
pentacyklického nebo tetracyklického
terpenoidu a farmaceutický prostředek
obsahující tento inkluzní komplex**

(57) Anotace:

Je popsán způsob přípravy inkluzních komplexů pentacyklických a tetracyklických terpenoidů, při němž se ve vodě nerozpustný pentacyklický nebo tetracyklický terpenoid mající volnou karboxylovou, hydroxylovou nebo amino funkční skupinu derivatizuje na této funkční skupině substituentem vybraným ze skupiny zahrnující substituenty obecného vzorce X^a pro navázání na hydroxyskupinu terpenoidu, kde X^a reprezentuje $-OC-R^1-COOH$, substituenty obecného vzorce X^a pro navázání na aminoskupinu terpenoidu, kde X^a je $-OC-R^1-COOH$, kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^b pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu, kde X^b reprezentuje $-(CH_2)_nN^+R^2_3Y^-$, kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^c pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu, kde X^c reprezentuje $-(CH_2)_n(R^3)^+Y^-$, substituenty obecného vzorce X^d pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu, kde X^d reprezentuje $-R^4-COOH$, glykosylové substituenty X^e pro navázání α - nebo β -glykosidickou vazbou na hydroxyskupinu terpenoidu, kde X^e je vybrán ze skupiny zahrnující glukosyl,

galaktosyl, arabinosyl, ramnosyl, laktosyl, cellobiosyl, maltosyl a jejich 2-deoxyanaloga, a následně se připravený derivát rozpustí v roztoku obsahujícím vodu a nativní nebo substituovaný γ -cyklodextrin za tvorby inkluzního komplexu s uvedeným cyklodextrinem, načež se inkluzní komplex s uvedeným cyklodextrinem izoluje z vodného roztoku, s výhodou lyofilizací. Popsána je i příprava farmaceutického prostředku obsahujícího tento inkluzní komplex. Dále je popsán inkluzní komplex derivatizovaného pentacyklického nebo tetracyklického terpenoidu a nativního nebo substituovaného γ -cyklodextrinu a dále farmaceutický prostředek obsahující tento inkluzní komplex.

CZ 300722 B6

Způsob přípravy inkluzního komplexu pentacyklických a tetracyklických terpenoidů a farmaceutického prostředku obsahujícího tento inkluzní komplex, inkluzní komplex pentacyklického nebo tetracyklického terpenoidu a farmaceutický prostředek obsahující tento inkluzní komplex

5

Oblast techniky

10 Vynález se týká způsobu přípravy rozpustných inkluzních komplexů pentacyklických a tetracyklických terpenoidů, které jsou samy o sobě ve vodě nerozpustné, způsobu přípravy farmaceutického prostředku obsahujícího tento inkluzní komplex, inkluzního komplexu pentacyklického nebo tetracyklického terpenoidu a farmaceutického prostředku obsahujícího tento inkluzní komplex.

15

Dosavadní stav techniky

20 Pentacyklické a tetracyklické terpenoidy představují skupinu přírodních látek – isoprenoidů s širokou paletou biologických aktivit (Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnička, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. Nat. Prod. Rep. 2006, 23, 394–411), díky kterým se stávají středem zájmu farmaceutického průmyslu. Avšak ani modifikované ani semisyntetické deriváty těchto přírodních látek většinou nemají optimální farmakologické vlastnosti. Mezi jejich nevýhody patří zejména nízká rozpustnost v médiích založených na vodné bázi a dále nevýhodné farmakokinetické ukazatele, jako např. nízká biologická dostupnost, krátký poločas vylučování a nedostatečná stabilita, které jsou naprosto nevhodné pro provádění *in vivo* testů na zvířatech, jakož i následné využití pro léčbu pacientů.

30 Pentacyklické a tetracyklické terpenoidy jsou jako sloučeniny s lipofilním rigidním skeletem, tvořeným 25 až 30 atomy uhlíku, ve vodě téměř nerozpustné, a to i když nesou polární funkční skupiny jako –OH, –COOH, =O, –NH₂ a další. Pro rozpouštění pro farmaceutické účely není možné využít rozpouštědel běžně používaných v chemické praxi, jako je chloroform, aceton, ethylacetát apod., z důvodu jejich inkompatibility s živými organismy. Z literatury je však známo, že pentacyklické triterpenoidní kyseliny vytvářejí v přítomnosti alkalických uhličitánů nebo hydrogenuhličitánů s cyklodextriny inkluzní sloučeniny, které jsou za přídavku vhodných aditiv rozpustné v médiích založených na vodné bázi (WO 92/09553). Je popsáno, že nejlepší rozpustnosti triterpenoidních kyselin lze dosáhnout použitím vyšších cyklodextrinů, jmenovitě β a γ, a jako aditiv je využíváno nižších alkoholů (methanol) nebo glykolů (propylenglykol, butandiol) (Uekama K., Hirayama F., Irie T.: Chem. Rev. 1998, 98, 2045–2076, Hedges A. R.: Chem. Rev. 1998, 98, 2035–2044). V používaných vehikulech dosahují triterpenoidní kyseliny rozpustnosti mezi 10 až 50 mg/ml (WO 92/09553). Inkluzní sloučeniny lze izolovat z jejich roztoků pomocí lyofilizace jako pevné látky ve formě prášků. Avšak takto lze rozpustit v médiích založených na vodné bázi pouze nativní triterpenoidní karboxylové kyseliny s volnou karboxylovou funkcí, nikoli jejich funkční deriváty nebo takové terpenoidy, které karboxylovou funkci nemají. Navíc ve farmaceutické praxi se často biologicky aktivní volné triterpenoidní kyseliny, které mají řadu nevýhodných farmakologických vlastností, např. obtížnou purifikovatelnost a nestabilitu, převádějí na deriváty, které přinášejí často pomalejší metabolizaci (zvýšení poločasu rozpadu), zvýšení stability nebo působí jako prodrug. Jedním typem takových derivátů jsou různé biologicky štěpitelné estery, jako např. morfolinoethylestery, acetoxymethylestery, heptylestery a další (Gewehr M., Kunz H.: Synthesis 1997, 1499; Urban M., Sarek J., Tislerova I., Dzubak P., Hajduch M.: Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 5527). WO 03/026606 popisuje kosmetickou formulaci, obsahující sericosid nebo směsi terpenoidů rostlinného původu obsahující sericosid a cyklodextrin. US 6 403 816 popisuje formulaci některých derivátů betulínové kyseliny s β-cyklodextriny s příměsí methanolu, kde dochází až za sonifikace k tvorbě čirého roztoku.

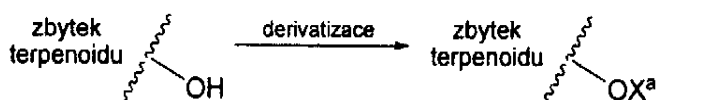
Deriváty karboxylových kyselin jsou však obecně ještě méně kompatibilní s vodnými vehikuly než jsou volné kyseliny. Pro využití derivátů karboxylových kyselin ve farmaceutické praxi je tedy nezbytné nalézt formulaci, která umožní jejich použití s vehikuly na vodné bázi.

- 5 Z výše uvedených důvodů je zřejmé, že pro další vývoj je nutné připravit takové deriváty nerozpustných biologicky aktivních pentacyklických a tetracyklických terpenoidů, které jsou rozpustné v médiích založených na vodné bázi, jsou biodostupné (nejlépe orálně dostupné), mají vhodný poločas vylučování a jsou stabilní neboli mají optimální farmakokinetické parametry.

10 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob přípravy inkluzních komplexů biologicky aktivních pentacyklických a tetracyklických terpenoidů, jehož podstata spočívá v tom, že se ve vodě nerozpustný terpenoid mající volnou karboxylovou, hydroxylovou nebo amino funkční skupinu derivatizuje na této funkční skupině substituentem vybraným ze skupiny zahrnující

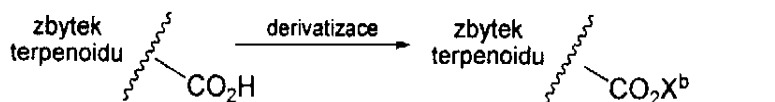
- 20 a) substituenty obecného vzorce X^a , kde X^a reprezentuje $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na hydroxyskupinu terpenoidu:



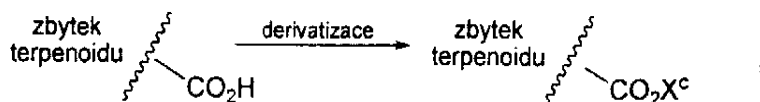
- 25 b) substituenty obecného vzorce X^a , kde X^a je $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na aminoskupinu terpenoidu:



- 30 c) kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^b , kde X^b reprezentuje $-(CH_2)_n N^+ R^2_3 Y^-$, kde n je 2–8, R^2 je lineární nebo větvený C_1 až C_8 alkyl, případně substituovaný $-OH$, $-NH_2$ nebo halogenem, a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu:

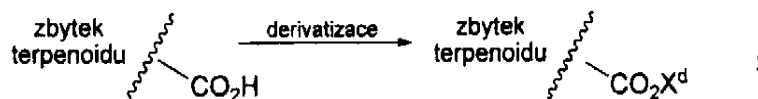


- 40 d) kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^c , kde X^c reprezentuje $-(CH_2)_n (R^3)^+ Y^-$, kde n je 2–8, $(R^3)^+$ je protonovaný dusíkatý heterocyklus obsahující 1 až 2 atomy N a 4 až 9 atomů C a obsahuje alespoň jeden aromatický cyklus a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu:



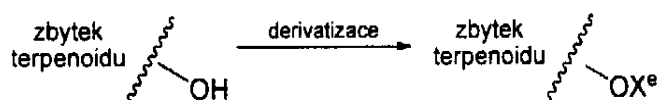
- e) substituenty obecného vzorce X^d , kde X^d reprezentuje $-R^4COOH$, kde R^4 je lineární či větvený C_1 až C_4 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_4 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu:

5



10

- f) glykosylové substituenty X^e kde X^e je vybrán ze skupiny zahrnující glukosyl, galaktosyl, arabinosyl, rhamnosyl, laktosyl, cellobiosyl, maltosyl a jejich 2-deoxyanaloga, pro navázání α nebo β glykosidickou vazbou na hydroxyskupinu terpenoidu:



15

reakcí se sloučeninou poskytující daný substituent a následně se připravený derivát rozpustí v roztoku obsahujícím vodu a nativní nebo substituovaný γ -cyklodextrin, načež se vzniklý inkluzní komplex s nativním nebo substituovaným γ -cyklodextrinem izoluje z vodného roztoku, s výhodou lyofilizací.

20

Ve výhodném provedení vynálezu se jako sloučenina poskytující substituční obecného vzorce X^a použije sloučenina vybraná ze skupiny zahrnující sloučeniny poskytující sukcinát, ftalát nebo glutarát.

25

Ve výhodném provedení vynálezu se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^b použije sloučenina poskytující cholinový ester, kde $n=2$, $R^2=CH_3$.

30

Ve výhodném provedení vynálezu se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^c použije sloučenina poskytující pyridiniovou sůl, kde $n=2$, $(R^3)^+PyH^+$, $Y^-=Br^-$.

Ve výhodném provedení vynálezu se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^d použije sloučenina poskytující glykolát, kde ${}^4R=CH_2$.

35

Ve výhodném provedení vynálezu se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^e použije sloučenina vybraná ze skupiny zahrnující sloučeniny poskytující glukosyl, galaktosyl, laktosyl a jejich 2-deoxyanaloga.

40

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy farmaceutického prostředku obsahujícího inkluzní komplex pentacyklického nebo tetracyklického terpenoidu s nativním nebo substituovaným γ -cyklodextrinem, jehož podstata spočívá v tom, že se ve vodě nerozpustný pentacyklický nebo tetracyklický terpenoid mající volnou karboxylovou, hydroxylovou nebo amino funkční skupinu derivatizuje na této funkční skupině substituentem vybraným ze skupiny zahrnující

45

- a) substituenty obecného vzorce X^a , kde X^a reprezentuje $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na hydroxyskupinu terpenoidu;

- b) substituenty obecného vzorce X^a kde X^a je $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či sub-

stituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na aminoskupinu terpenoidu;

- 5 c) kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^b , kde X^b reprezentuje $-(CH_2)_nN^+R^2_3Y^-$, kde n je 2–8, R^2 lineární nebo větvený C_1 až C_8 alkyl, případně substituovaný $-OH$, $-NH_2$ nebo halogenem, a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;
- 10 d) kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^c , kde X^c reprezentuje $-(CH_2)_n(R^3)^+Y^-$, kde n je 2–8, $(R^3)^+$ je protonovaný dusíkatý heterocyklus obsahující 1 až 2 atomy N a 4 až 9 atomů C a obsahuje alespoň jeden aromatický cyklus a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;
- 15 e) substituenty obecného vzorce X^d , kde X^d reprezentuje $-R^4-COOH$, kde R^4 je lineární či větvený C_1 až C_4 alkyl, lineární či větvený C_1 až C_4 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;
- 20 f) glykosylové substituenty X^e , kde X^e je vybrán ze skupiny zahrnující glukosyl, galaktosyl, arabinosyl, rhamnosyl, laktosyl, cellobiosyl, maltosyl a jejich 2–deoxyanaloga, pro navázání α - nebo β -glykosidickou vazbou na hydroxyskupinu terpenoidu;

reakcí se sloučeninou poskytující daný substituent a následně se připravený derivát rozpustí v roztoku obsahujícím vodu, nativní nebo substituovaný γ -cyklodextrin a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.

Pomocnými látkami mohou být biokompatibilní organická rozpouštědla, např. ethanol nebo propylenglykol, a látky usnadňující tvorbu inkluzních komplexů, jako např. alkalické uhličitany nebo hydrogenuhličitany.

Předmětem vynálezu je dále inkluzní komplex pentacyklického nebo tetracyklického terpenoidu s lipofilním rigidním skeletem, tvořeným 25 až 30 atomy uhlíku, obsahujícího alespoň jeden z následujících substituentů:

- 35 a) $-OX^a$, kde X^a $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkyl, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou,
- 40 b) $-NHX^a$, kde X^a je $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkyl, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou,
- 45 c) $-COOX^b$, kde X^b je $-(CH_2)_nN^+R^2_3Y^-$, kde n je 2–8, R^2 je lineární nebo větvený C_1 až C_8 alkyl, případně substituovaný $-OH$, $-NH_2$ nebo halogenem, a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát,
- 50 d) $-COOX^c$, kde X^c je $-(CH_2)_n(R^3)^+Y^-$, kde n je 2–8, $(R^3)^+$ je protonovaný dusíkatý heterocyklus obsahující 1 až 2 atomy N a 4 až 9 atomů C a obsahuje alespoň jeden aromatický cyklus a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát,
- e) $-COOX^d$, kde X^d reprezentuje $-R^4-COOH$, kde R^4 je lineární či větvený C_1 až C_4 alkyl, lineární či větvený C_1 až C_4 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou,

f) $-OX^e$, kde X^e je vázán α nebo β glykosidickou vazbou a je vybrán ze skupiny zahrnující glukosyl, galaktosyl, arabinosyl, rhamnosyl, laktosyl, cellobiosyl, maltosyl a jejich 2-deoxyanaloga,

5 s nativním nebo substituovaným γ -cyklodextrinem vyrobený způsobem podle vynálezu.

Ve výhodném provedení vynálezu jsou substituenty obecného vzorce X^a vybrány ze skupiny zahrnující sukcinát, ftalát nebo glutarát.

10 Ve výhodném provedení jsou substituenty obecného vzorce X^b cholinové estery, kde $n=2$, $R^2=CH_3$.

Ve výhodném provedení jsou substituenty obecného vzorce X^c pyridiniové soli, kde $n=2$, $(R^3)^+=PyH^+$, $Y^-=Br^-$.

15 Ve výhodném provedení jsou substituenty obecného vzorce X^d glykoláty, kde $R^4=CH_2$.

Ve výhodném provedení jsou substituenty obecného vzorce X^e vybrány ze skupiny zahrnující glukosyl, galaktosyl, laktosyl a jejich 2-deoxyanaloga.

20 Předmětem vynálezu je také farmaceutický prostředek, obsahující rozpustnou formulaci podle předloženého vynálezu, vodu a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku, vyrobený způsobem podle vynálezu.

25 Pomocnými látkami mohou být biokompatibilní organická rozpouštědla, např. ethanol nebo propylenglykol, a látky usnadňující tvorbu inkluzních komplexů, jako např. alkalické uhličitany nebo hydrogenuhličitany.

Ve výhodném provedení podle vynálezu je farmaceuticky přijatelným rozpouštědlem voda.

30

Přehled obrázků na výkresech

35 Obr. 1 znázorňuje farmakokinetický profil hemisukcinátu 2b podávaného ve formě vodného roztoku inkluzního komplexu s 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinem při orálním podání myším.

Obr. 2 ukazuje farmakokinetický profil aldehydu 3 podávaného ve formě vodného roztoku inkluzního komplexu s 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinem při orálním podání myším.

40 Obr. 3 ukazuje farmakokinetický profil hemisukcinátu 3b podávaného ve formě vodného roztoku inkluzního komplexu s 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinem při orálním podání myším.

Obr. 4 znázorňuje farmakokinetický profil hemisukcinátu 5a podávaného ve formě vodného roztoku inkluzního komplexu s 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinem při orálním podání myším.

45

Obr. 5 ukazuje farmakokinetický profil diketon-dihemisukcinátu 5e podávaného ve formě vodného roztoku inkluzního komplexu s 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinem při orálním podání myším.

50 Obr. 6 znázorňuje farmakokinetický profil pyrazinu 6a podávaného ve formě vodného roztoku inkluzního komplexu s 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinem při orálním podání myším.

Obr. 7 ukazuje farmakokinetický profil hemisukcinátu 8a podávaného ve formě vodného roztoku inkluzního komplexu s 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinem při orálním podání myším.

55

Obr. 8 ukazuje farmakokinetické profily látek 5c, 5d, 6, 7, 8 podávané jako suspenze s karboxymethylcelulózou (CMC) orálně myším.

5 Příklady provedení vynálezu

Způsob přípravy farmaceutického prostředku s obsahem pentacyklických a tetracyklických terpenoidů se skládá ze dvou stupňů: a) derivatizace nerozpustné výchozí látky, b) příprava vodného roztoku inkluzního komplexu derivátu s nativním nebo substituovaným γ -cyklodextrinem.

Všechny v příkladech popisované sloučeniny a jejich zjišťované vlastnosti jsou shrnuty v Tabulce 1 a znázorněné ve vzorcích 1 až 8.

Jednotlivé obecné postupy derivatizace nerozpustných pentacyklických a tetracyklických triterpenoidů jsou označeny H-1, H-1*, H-2, H-3, H-4, K-1, K-2 a jsou zde ukázány na konkrétních příkladech. Obecné postupy přípravy inkluzního komplexu, při níž dojde k rozpuštění látky, jsou označeny A a B.

a) Derivatizace nerozpustné látky

Příklad 1

Příprava betulín-dihemisukcinátu (1 a) (postup H-1)

Do roztoku betulínu (1) (500 mg; 1,13 mmol) v pyridínu (20 ml) byl přidán sukcinanhydrid (1,2 g; 12,0 mmol) a *N,N*-dimethylaminopyridin, dále jen DMAP (1,2 g; 10,0 mmol) a reakční směs byla refluxována za míchání 12 h. Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie, dále jen TLC (hexan/ethylacetát 1:1). Poté byla reakční směs ochlazená, zředěna desetinasobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu gradientovou elucí z 20% ethylacetátu v hexanu do 100% ethylacetátu. Chromatograficky jednotný dihemisukcinát 1a byl lyofilizován z terc.butylalkoholu. Získaný hemisukcinát 1a (387 mg; 67 %) měl t.t. 107 °C, $[\alpha]_D = 10^\circ$ ($c = 0,44$). ^{13}C NMR spektrum: 14,8, 16,0, 16,1, 16,5, 18,1, 19,1, 20,8, 23,6, 25,2, 27,0, 27,9, 29,0, 29,0, 29,1, 29,3, 29,5, 29,6, 34,1, 34,4, 37,0, 37,6, 37,8, 38,4, 40,9, 42,7, 46,4, 47,7, 48,8, 50,3, 55,4, 63,2, 81,5, 109,9, 150,1, 171,8, 172,4, 177,8, 177,8.

Příklad 2

Příprava hemisukcinátu 5a (postup H-1)

Do roztoku hydroxydiketonu 5 (500 mg; 1,0 mmol) ve směsi pyridínu (15 ml) a tetrahydrofuranu, dále jen THF (5 ml) byl přidán sukcinanhydrid (900 mg; 9,0 mmol) a DMAP (982 mg; 8,0 mmol) a reakční směs byla refluxována za míchání 12 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (hexan/ethylacetát 1:1). Poté byla reakční směs ochlazená a zpracována analogickým způsobem jako při přípravě sloučeniny 1a. Chromatograficky jednotný hemisukcinát 5a byl krystalizován ze směsi acetonitril/voda. Získaný hemisukcinát 5a (383 mg; 64 %) měl t.t. 154 až 157 °C, $[\alpha]_D = -99^\circ$ ($c = 0,24$). ^{13}C NMR spektrum: 16,1, 16,5, 16,7, 16,8, 18,0, 19,7, 19,8, 21,0, 23,5, 25,9, 27,4, 27,8, 27,9, 28,4, 28,9, 29,2, 34,5, 37,1, 37,8, 38,5, 41,5, 45,5, 46,1, 50,8, 50,8, 53,4, 55,4, 81,2, 150,6, 168,1, 171,0, 171,9, 177,6, 189,2, 194,3.

Příklad 3

Příprava hemisukcinátu 8a (postup H-1)

5 Do roztoku aminoalkoholu 8 (500 mg; 1,1 mmol) v tetrahydrofuranu (10 ml) byl přidán sukcinanhydrid (900 mg; 9,0 mmol) a reakční směs byla refluxována za míchání 5 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (hexan/ethylacetát 1:1). Poté byla reakční směs ochlazena a zpracována analogickým způsobem jako při přípravě sloučeniny 1a. Chromatograficky jednotný hemisukcinát 8a byl krystalizován ze směsi acetonitril/voda. Získaný hemisukcinát 8a (406 mg; 67 %) měl t.t. 283 až 284 °C, $[\alpha]_D = +65^\circ$ (c = 0,34).

Příklad 4

15 Příprava hemisukcinátu volné kyseliny 2e (postup H-1*)

Ke směsi kyseliny betulínové (2) (500 mg; 1,1 mmol) a uhličitanu draselného (276 mg; 2,0 mmol) v *N,N*-dimethylformamidu, dále jen DMF (20 ml) byl přidán benzylbromid (178 μ l; 1,5 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 24 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (toluen/diethylether 10:1). Poté byla reakční směs zředěna desetinásobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl toluen. Získaný surový benzylbetulinát (517 mg; 86 %) byl použit bez čištění do dalšího kroku.

25 Do roztoku benzylbetulinátu (500 mg; 0,9 mmol) v pyridinu (20 ml) byl přidán sukcinanhydrid (900 mg; 9,0 mmol) a DMAP (982 mg; 8,0 mmol) a reakční směs byla refluxována za míchání 15 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (hexan/ethylacetát 1:1). Poté byla reakční směs ochlazena, zředěna desetinásobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu gradientovou elucí z 10% ethylacetátu v hexanu do 50% ethylacetátu. Chromatograficky jednotný hemisukcinát benzylbetulinátu byl použit bez čištění do dalšího kroku.

35 Do roztoku hemisukcinátu benzylbetulinátu (389 mg; 0,6 mmol) ve směsi tetrahydrofuranu (10 ml) a methanolu (5 ml) bylo přidáno palladium na uhlí (50 mg; 10%) a 1,4-cyklohexadien (568 μ l; 6 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 22 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (hexan/ethylacetát 1:1). Poté byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu a eluát odpařen na rotační vakuové odparce. Krystalizací odparku z benzenu byl získán hemisukcinát 2e (366 mg; 91 %) o t.t. 265 °C, $[\alpha]_D = 15^\circ$ (c = 0,37). ^{13}C NMR spektrum: 14,6, 16,2, 16,2, 16,6, 18,2, 19,3, 20,9, 23,6, 25,4, 28,0, 29,2, 29,4, 29,7, 30,5, 32,1, 34,1, 37,1, 37,1, 37,9, 38,2, 38,4, 40,7, 42,4, 46,9, 49,2, 50,2, 55,3, 56,5, 81,5, 109,7, 150,3, 171,7, 178,3, 182,7.

45 Příklad 5

Příprava hemifitalátu 2c (postup H-2)

50 Do roztoku ethylbetulinátu 2a (500 mg; 1,0 mmol) v pyridinu (20 ml) byl přidán fitalanhydrid (1,48 g; 10,0 mmol) a DMAP (366 mg; 3,0 mmol) a reakční směs byla refluxována za míchání 28 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (hexan/ethylacetát 1:1). Poté byla reakční směs ochlazena a zpracována a produkt čištěn analogickým způsobem jako při přípravě sloučeniny 1a. Chromatograficky jednotný hemifitalát 2c byl lyofilizován z terc.butylalkoholu. Získaný hemifitalát 2c (335 mg; 53 %) měl t.t. 131 °C, $[\alpha]_D = -26^\circ$ (c = 0,45).

55

Příklad 6

Příprava betulin–dihemifalátu (1b) (postup H-2)

5

Do roztoku betulinu (1) (500 mg; 1,13 mmol) v pyridinu (20 ml) byl přidán ftalanhydrid (1,33 g; 9,0 mmol) a DMAP (366 mg; 3,0 mmol) a reakční směs byla refluxována za míchání 37 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (hexan/ethylacetát 1:1). Poté byla reakční směs ochlazena a zpracována a produkt čištěn analogickým způsobem jako při přípravě sloučeniny 1a. Chromatograficky jednotný dihemifalát 1b byl lyofilizován z tercbutylalkoholu. Získaný dihemifalát 1b (633 mg; 76 %) měl t.t. 178 až 180 °C, $[\alpha]_D = 28^\circ$ (c = 0,55).

10

Příklad 7

15

Příprava glukosidu 4i (postup H-3)

i) Do roztoku ethylesteru 4g (1,00 g; 2,07 mmol) v bezvodém acetonitrilu (25 ml) byl přidán 2,3,4,6-tetraacetyl- α -D-glukopyranosylbromid (1,7 g; 4,1 mmol) a kyanid rtuťnatý (782 mg; 3,1 mmol) a směs byla poté refluxována pod zpětným chladičem s vyloučením vzdušné vlhkosti. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (toluen/ether 6:1). Poté byla ochlazená reakční směs probublána vlhkým sulfanem, zfiltrována na křemelině, filtrát byla zředěn desetinásobkem vody a extrahován do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl toluen s gradientem diethyletheru. Získaný acetylovaný glukosid 4h (550 mg; 33 %) o t.t. 110 °C, $[\alpha]_D = -33^\circ$ (c = 0,32). IR spektrum: 1246 (C–O); 1609 (C=C); 1697, 1754 (C=O). ^1H NMR spektrum: 0,73 s, 3H; 0,87 s, 3H; 0,90 s, 3H; 0,92 s, 3H; 1,02 s, 3H; 1,20 s, 3H; 1,22 s, 3H; (7xCH₃); 1,26 t, 3H (J= 7,4; –CH₂–CH₃); 2,01 s, 3H; 2,03 s, 3H; 2,04 s, 3H; 2,09 s, 3H (4xCH₃COO); 2,46 d, 1H (J=18,6; H–22b); 2,46 m, 1H (Σ J=12,0; H–16 β); 2,68 dd, 1H (J₁=12,7, J₂=3,2; H–13 β); 3,08 m, 1H, (Σ J=16,4; H–3 α); 3,20 septet, 1H (J=7,1; H–20); 3,69 m, 1H (J=20,0; H–5'); 4,10–4,28 m, 4H (O–CH₂, H–6'a,b); 4,54 d, 1H (J=8,1; H–1'); 5,01–5,09 m, 2H (H–4', H–2'); 5,18–5,24 m, 1H (Σ J=24; H–3'). MS ESI m/z (%): [Pro C₄₆H₆₄O₁₃, M⁺ 828], 829 ([M+H]⁺, 10); (851 ([M+Na]⁺, 40). Elementární analýza pro C₄₆H₆₄O₁₃: vypočteno C 66,64 %, H 8,27 %; nalezeno C 61,97 %, H 8,12 %.

35

ii) Získaný acetylovaný glukosid 4h (330 mg; 0,39 mmol) byl smíchán s bezvodým methanolem (10 ml) a do směsi byl přidán kovový sodík (5 mg). Průběh reakce byl sledován reverzní TLC (voda/THF 1:1). Reakční směs byla poté okyselena kyselinou octovou na pH 6 a odpařena na rotační vakuové odparce. K odparku byla přidána voda a vzniklá suspenze byla odsáta a promyta vodou. Sraženina byla vysušena v exsíkátoru nad oxidem fosforečným. Získaný volný glukosid 4i (180 mg; 0,28 mmol), 68 %) měl t.t. 196,0 °C, $[\alpha]_D = -46^\circ$ (c = 0,29). IR spektrum: 1609 (C=C); 1697, 1724 (C=O); 3411 (O–H). ^1H NMR spektrum: 0,82 s, 3H; 0,89 s, 3H; 0,93 s, 3H; 1,02 s, 3H; 1,03 s, 3H; 1,20 s, 3H; 1,21 s, 3H (7xCH₃); 1,25 t, 3H (J=7,2; –CH₂–CH₃); 2,14 d, 1H (J=18,5; H–22b); 2,45 d, 1H (J=18,8; H–22a); 2,42–2,52 m, 1H (Σ J=40; H–16 β); 2,68 dd, 1H (J₁=12,8, J₂=2,6; H–13 β); 3,13–3,50 m, 6H (H–3 α , H–20, H–5', H–3', H–4', H–2'); 3,75–3,87 m, 2H (H–6'a,b); 4,10–4,24 m, 2H (O–CH₂); 3,79 d, 1H (J=7,6; H–1'). MS ESI m/z (%): [Pro C₃₈H₆₀O₉, M⁺ 660], 683 ([M+Na]⁺, 60). Elementární analýza pro C₃₈H₆₀O₉: vypočteno C 66,06 %, H 9,15 %; nalezeno C 66,39 %, H 8,98 %.

50

Příklad 8

Příprava bisglukosidu 7e, 7f (postup H-3)

55

i) Do suspenze diolu 7a (2,00 g; 3,92 mmol) v bezvodém acetonitrilu (25 ml) byl přidán 2,3,4,6-tetraacetyl- α -D-glukopyranosylbromid (6,4 g; 15,7 mmol) a kyanid rtuťnatý (3,0 g; 11,8 mmol) a směs byla poté refluxována pod zpětným chladičem s vyloučením vzdušné vlhkosti. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (toluen/ether 6:1). Poté byla ochlazená reakční směs probublána vlhkým sulfanem, zfiltrována na křemelině, filtrát byla zředěn desetinásobkem vody a extrahován do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl toluen s gradientem diethyl-etheru. Získaný acetylovaný bisglukosid 7d (2,50 g; 54 %) měl t.t. 102,7 °C, $[\alpha]_D = +14^\circ$ (c = 0,28). IR spektrum: 1234 (C–O); 1603 (C=C); 1755 (C=O). ^1H NMR spektrum: 0,73 s, 3H; 0,87 s, 3H; 0,89 s, 3H; 0,90 s, 3H; 1,09 s, 3H (5x CH₃); 1,99 s, 3H; 2,01 s, 3H; 2,02 s, 3H; 2,03 s, 3H; 2,03 s, 3H; 2,04 s, 3H; 2,08 s, 3H (8xCH₃COO); 2,38 dt, 1H ($J_1=14,0$, $J_2=4,9$; H-16 α); 3,58 dd, 1H ($J_1=11,8$, $J_2=3,5$; H-13 β); 3,07 dd, 1H ($J_1=11,6$, $J_2=4,9$; H-3 α); 3,51 m, 1H ($\Sigma J=16,8$; H-5'); 3,67 m, 1H ($\Sigma J=17,7$; H-5'); 3,99 d, 1H ($J=11,0$; H-28a); 4,11 m, 2H (H-6'a,b); 4,20 d, 1H ($J=10,7$; H-28b); 4,25 m, 2H (H-6'a,b); 4,53 d, 1H ($J=7,9$; H-1'); 4,63 d, 1H ($J=8,2$; H-1'); 4,89 dd, 1H ($J_1=9,5$, $J_2=7,9$; H-3'); 5,03 m, 1H ($\Sigma J=24,0$; H-3'); 5,07–5,16 m, 3H (2x H-2'); 5,17–5,23 m, 2H (2x H-4'); 5,19 bs, 2H (Bn); 7,37 m, 5H (Ph). MS ESI m/z (%): [Pro C₆₀H₈₂O₂₃, M⁺ 1170], 1193 ([M+Na]⁺, 60). Elementární analýza pro C₆₀H₈₂O₂₃: vypočteno C 61,53 %, H 7,06 %; nalezeno C 63,86 %, H 7,52 %.

ii) Získaný acetylovaný bisglukosid 7d (2,30 g; 1,97 mmol) byl smíchán s bezvodým methanolem (250 ml) a do směsi byl přidán kovový sodík (10 mg). Průběh reakce byl sledován reverzní TLC (voda/THF 1:1). Reakční směs byla poté okyselena kyselinou octovou na pH 6 a odpařena na rotační vakuové odparce. K odparku byla přidána voda a vzniklá suspenze byla odsáta a promyta vodou. Sraženina byla vysušena v exsikátoru nad oxidem fosforečným. Získaný volný bisglukosid 7e (1,36 g; 54 %) měl t.t. 186 °C, $[\alpha]_D = +5^\circ$ (c = 0,33). IR spektrum (měřeno technikou ATR): 1034, 1076 (C–O); 1708, 1726 (C–O); 3403 (O–H). ^1H NMR spektrum: 0,84 s, 3H; 0,89 s, 3H; 0,93 s, 3H; 1,02 s, 3H; 1,12 s, 3H (5xCH₃); 2,39 dt, 1H ($J_1=13,0$, $J_2=3,7$; H-16 α); 2,71 d, 1H ($J=9,0$; H-13 β); 3,17m, 1H (H-3 α); 3,24–3,34 m, 4H (2xH-5', 2xH-2'); 3,36–3,48 m, 4H (H-3', H-4'); 3,68–3,80 m, 2H (H-6'a,b); 3,84 m, 2H (H-6'a,b); 3,94 d, 1H ($J=9,8$; H-28a); 4,30 d, 1H ($J=10,0$; H-28b); 4,33 d, 1H ($J=7,6$; H-1'); 4,34 d, 1H ($J=7,6$; H-1') 5,20 bs, 2H (Bn); 7,35 m, 5H ($\Sigma J=3,2$; Ph). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 3. MS ESI m/z (%): [Pro C₄₄H₆₆O₁₅, M⁺ 834], 858 ([M+Na]⁺, 40). Elementární analýza pro C₄₄H₆₆O₁₅: vypočteno C 63,29 %, H 7,97 %; nalezeno C 63,44 %, H 7,52 %.

iii) Bisglukosid 7e (1,10 g; 1,32 mmol) byl rozpuštěn ve směsi THF (10 ml) a methanolu (10 ml) a benzylová skupina ochráněna v autoklávu za přítomnosti Pd/C (100 mg; 10%) pod přetlakem vodíku (0,6 MPa) za stálého míchání. Průběh reakce byl kontrolován reverzní TLC (voda/THF 1:1). Po 24 h byl autokláv otevřen a reakční směs zfiltrována přes sloupec křemeliny. Eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce a odparek překrystalizován z methanolu. Získaná bisglukosidická kyselina 7f (785 mg; 42 %) měla t.t. 194 °C, $[\alpha]_D = +19$ (c = 0,31). IR spektrum (měřeno technikou ATR): 1033, 1079 (C–O); 1693, 1707 (C–O); 3386 (O–H). ^1H NMR spektrum: 0,85 s, 3H; 0,93 s, 3H; 0,96 s, 3H; 1,05 s, 3H; 1,18 s, 3H (5xCH₃); 2,32–2,45 m, 1H (H-16 α); 2,87 dd, 1H ($J_1=11,2$, $J_2=2,8$; H-13 β); 3,11–3,15 m ($\Sigma J=17,2$; H-3 α); 3,15–3,22 m, 4H; 3,24–3,30 m, 4H; 3,65 d, 2H ($J=4,7$; 2xH-6'a); 3,68 d, 2H ($J=4,9$; 2xH-6'b); 3,85 d, 1H ($J=12,4$; H-28a); 4,29 d, 2H ($J=8,1$; H-1'); 4,31 d, 1H ($J=13,7$; H-28b); 4,32 d, 1H ($J=7,7$; H-1'). MS ESI m/z (%): [Pro C₃₇H₆₀O₁₅, M⁺ 734], 767 ([M+Na]⁺ 40). Elementární analýza pro C₃₇H₆₀O₁₅: vypočteno C 59,66 %, H 8,12 %; nalezeno C 59,93 %, H 8,01 %.

Příklad 9

Příprava 2-deoxygalaktosidu 4k (postup H-4)

i) Do roztoku triterpenického hydroxyderivátu 4g (500 mg; 1,0 mmol) v suchém acetonitrilu (30 ml) byl přidán tri-*O*-acetylgalaktal (1,2 mmol), molekulové síto 4A (500 mg), bromid lithný (730 mg) a vysušený katex v H⁺ cyklu (900 mg). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 12 hodin. Průběh reakce byl kontrolován tenkovrstvou chromatografií s mobilní fází hexan:ethylacetát 2:1. Reakční směs pak byla zfiltrována přes vrstvu křemeliny a sloupec byl promyt ethylacetátem. Reakční směs byla zředěna vodou (50 ml), extrahována ethylacetátem (2x 20 ml) a organická fáze odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu (5 ml) a roztok byl prolit přes krátký sloupec silikagelu (eluze ethylacetátem). Eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl poté separován sloupcovou chromatografií na silikagelu, eluce toluenem. Produkt byl poté lyofilizován z 2-methylpropan-2-olu, byl získán bílý lyofilizát 4j (360 mg; 47 %) s teplotou tání 100,8 °C, $[\alpha]_D = +38,9^\circ$ (c = 0,52).

ii) 2-deoxygalaktosid 4j (200 mg; 0,26 mmol) byl rozpuštěn suchém methanolu (300 ml) a do roztoku bylo přidáno katalytické množství sodíku (5 mg). Průběh reakce byl sledován tenkovrstvou chromatografií na reverzní fází (mobilní fáze voda:tetrahydrofuran 1:1). Reakční směs byla zneutralizována kyselinou octovou a odpařena na rotační vakuové odparce. K odparku byla přidána voda (300 ml) a vyloučená sraženina produktu odfiltrována. Filtrační koláč byl promýván vodou. Byl získán bílý krystalický 2-deoxyglukosid 4k (161 mg; 97 %) s teplotou tání 158,0 °C a $[\alpha]_D = +17,2^\circ$ (c = 0,51).

Příklad 10

Příprava 2-deoxyglukosidu 4m (postup H-4)

i) Do roztoku triterpenického hydroxyderivátu 4d (500 mg; 1,0 mmol) v suchém acetonitrilu (30 ml) byl přidán tri-*O*-acetylglukal (1,2 mmol), molekulové síto 4A (500 mg), bromid lithný (730 mg) a vysušený katex v H⁺ cyklu (900 mg). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 12 hodin. Průběh reakce byl kontrolován tenkovrstvou chromatografií s mobilní fází hexan:ethylacetát 2:1. Reakční směs pak byla zfiltrována přes vrstvu křemeliny a sloupec byl promyt ethylacetátem. Reakční směs byla zředěna vodou (50 ml), extrahována ethylacetátem (2x 20 ml) a organická fáze odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu (5 ml) a roztok byl prolit přes krátký sloupec silikagelu (eluze ethylacetátem). Eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl poté separován sloupcovou chromatografií na silikagelu, eluce toluenem. Produkt byl poté lyofilizován z 2-methylpropan-2-olu, byl získán bílý lyofilizát 4l (245 mg; 34 %), teplota tání 204,1 °C, $[\alpha]_D = +24,2$ (c = 0,43).

ii) 2-deoxyglukosid 4l (60 mg; 0,08 mmol) byl rozpuštěn suchém methanolu (100 ml) a do roztoku bylo přidáno katalytické množství sodíku (5 mg). Průběh reakce byl sledován tenkovrstvou chromatografií na reverzní fází (mobilní fáze voda:tetrahydrofuran 1:1). Reakční směs byla zneutralizována kyselinou octovou a odpařena na rotační vakuové odparce. K odparku byla přidána voda (100 ml) a vyloučená sraženina produktu odfiltrována. Filtrační koláč byl promýván vodou. Byl získán bílý krystalický 2-deoxyglukosid 4m (39 mg; 74 %) s teplotou tání 208,0 °C, $[\alpha]_D = +14,0$ (c = 0,40). ¹³C NMR spektrum: 15,7, 16,1, 16,5, 16,6, 18,0, 19,7, 19,8, 21,0, 21,6, 24,9, 27,5, 28,3, 28,9, 33,5, 34,7, 37,0, 37,6, 38,2, 38,3, 41,1, 45,1, 45,2, 47,4, 50,9, 52,4, 53,0, 55,4, 62,7, 68,6, 71,2, 72,1, 81,4, 93,1, 174,9, 145,5, 172,7, 208,0. MS m/z (%): [Pro C₃₇H₅₈O₈, M⁺ 630], 653 ([M+Na]⁺, 30), 631 ([M+H]⁺, 30). Pro C₃₇H₅₈O₈ (630,9) vypočteno: C 70,44 %, H 9,27 %. Nalezeno: C 70,58 %, H 9,13 %.

Příklad 11

Příprava glykolátu 4a (postup K-1)

- i) Ke směsi 21-oxokyseliny 4 (500 mg; 0,98 mmol) a uhličitanu draselného (276 mg; 2,0 mmol) v dichlormethanu (10 ml) a acetonitrilu (5 ml) byl přidán benzylbromacetát (240 μ l; 1,5 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 24 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (toluen/diethylether 6:1). Poté byla reakční směs zředěna desetinásobkem vody a extrahována do dichlormethanu. Spojené organické podíly byly jednou vytrřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu, mobilní fází byl toluen. Získaný surový benzylglykolát 21-oxokyseliny (509 mg; 79 %) byl použit do dalšího kroku.
- ii) Do roztoku benzylglykolátu 21-oxokyseliny (350 mg; 0,5 mmol) ve směsi tetrahydrofuranu (20 ml) a methanolu (10 ml) bylo přidáno palladium na uhlí (75 mg; 10%) a 1,4-cyklohexadien (473 μ l; 5 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 20 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (toluen/diethylether 4:1). Poté byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu a eluát odpařen na rotační vakuové odparce. Krystalizací odparku ze směsi aceton/voda byl získán glykolát 21-oxokyseliny 4a (272 mg; 90 %) o t.t. 267 až 269 °C, $[\alpha]_D = -33^\circ$ (c = 0,39). ^{13}C NMR spektrum: 15,9, 16,5, 16,6, 16,8, 18,1, 20,0, 20,1, 21,2, 21,3, 27,7, 29,0, 23,6, 25,1, 27,9, 33,5, 34,9, 37,1, 37,7, 38,5, 41,4, 45,3, 45,3, 47,3, 51,1, 53,1, 55,4, 60,4, 80,8, 146,0, 171,2, 171,7, 172,4, 173,7, 208,0. MS, m/z (%): [Pro $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_7$, M^+ 570], 570 (M^+ , 18), 527 (5), 510 (22), 495 (6), 467 (23), 375 (4), 359 (3), 320 (16), 307 (98), 229 (10), 203 (31), 189 (52). Pro $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_7$ (570,4) vypočteno: 71,55 % C, 8,83 % H; nalezeno: 71,52 % C, 8,85 % H.

Příklad 12

25 Příprava glykolátu 7d (postup K-1)

- i) Ke směsi pentanorkyseliny 7 (600 mg; 1,2 mmol), uhličitanu stříbrného (440 mg; 1,6 mmol) ve směsi chloroformu (10 ml) a acetonitrilu (7 ml) byl přidán benzylbromacetát (260 μ l; 1,6 mmol) a reakční směs byla míchána 28 h za laboratorní teploty. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (toluen/diethylether 6:1). Poté byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu a filtrát zpracován a produkt čištěn analogickým způsobem jako při přípravě benzylglykolátu 21-oxokyseliny. Získaný surový benzylglykolát pentanorkyseliny (358 mg; 46 %) o t.t. 156 až 157 °C (methanol), $[\alpha]_D = +57^\circ$ (c = 0,31) byl použit do dalšího kroku.
- ii) Do roztoku benzylglykolátu pentanorkyseliny (300 mg; 0,5 mmol) ve směsi tetrahydrofuranu (10 ml) a methanolu (3 ml) bylo přidáno palladium na uhlí (75 mg; 10%) a reakční směs byla hydrogenována vodíkem v autoklávu za míchání za teploty místnosti 5 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (chloroform). Poté byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu a eluát odpařen na rotační vakuové odparce. Krystalizací odparku ze směsi aceton/voda byl získán glykolát 7d (215 mg; 83 %) o t.t. 230 až 230 °C, $[\alpha]_D = 66^\circ$ (c = 0,23). ^{13}C NMR spektrum: 16,0, 16,2, 16,5, 16,7, 18,1, 19,7, 20,7, 21,3, 21,8, 23,6, 26,5, 27,1, 27,9, 34,0, 37,1, 37,8, 38,5, 41,0, 46,7, 50,5, 50,4, 55,4, 61,0, 63,2, 80,6, 170,2, 170,7, 171,0, 171,2, 210,5. MS, m/z (%): [Pro $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_9$, M^+ 562], 562 (M^+ , 1), 516 (36), 502 (38), 487 (18), 459 (19), 415 (10), 339 (8), 313 (54), 223 (11), 204 (15), 189 (70). Pro $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_9$ (562,3) vypočteno: 66,17 % C, 8,24 % H; nalezeno: 66,24 % C, 8,31 % H.

Příklad 13

50 Příprava kvartérní amoniové soli 2f (postup K-2)

- i) Do suspenze kyseliny betulínové 2 (1,37 g; 3 mmol) ve směsi dichlormethanu (15 ml) a acetonitrilu (1 ml) byl přidán uhličitan draselný (0,42 g; 3 mmol) a 1,2-dibromethan (550 μ l; 4,5 mmol) a reakční směs byla míchána za teploty místnosti. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (toluen/ether 6:1). Poté co byla veškerá výchozí látka spotřebována, byla filtrací odstraněna

použitá báze, směs byla zředěna desetinásobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradient ethylacetátu v hexanu). Získaný 2'-bromethylbetulinát (480 mg; 28 %) měl t.t. 184 °C, $[\alpha]_D = +7^\circ$ ($c = 0,24$).

ii) 2'-bromethylbetulinát (200 mg; 0,35 mmol) byl rozpuštěn v DMF (5 ml). K roztoku byl přidán trimethylamin (0,5 ml; 5,67 mmol), reakční nádoba byla uzavřena a ponechána 1 h při 60 °C. Po ochlazení byla reakční směs zředěna desetinásobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradient methanolu v chloroformu). Získaná kvartérní amoniová sůl 2f (163 mg; 75 %) měla t.t. 155 až 156 °C, $[\alpha]_D = +22^\circ$ ($c = -0,40$). ^{13}C NMR spektrum: 15,1, 16,1, 16,6, 16,7, 19,3, 19,5, 21,9, 26,6, 27,9, 28,6, 30,8, 31,3, 32,7, 35,4, 37,5, 38,2, 39,3, 39,8, 39,9, 41,8, 43,4, 50,5, 51,8, 54,4, 56,6, 57,7, 58,4, 59,5, 65,9, 78,7, 79,1, 79,4, 79,5, 110,5, 128,1, 137,3, 151,2, 176,1. Elementární analýza pro $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{BrNO}_3$: vypočteno C 67,50 %, H 9,71 %; nalezeno C 67,46 %, H 9,68 %.

20 Příklad 14

Příprava kvartérní amoniové soli 2g (postup K-2)

2'-bromethylbetulinát z příkladu 12 (285 mg; 0,46 mmol) byl rozpuštěn v DMF (5 ml), k roztoku byl přidán pyridin (1 ml; 9,49 mmol), reakční nádoba byla uzavřena a ponechána 4 dny při 60 °C. Po ochlazení byla reakční směs zředěna desetinásobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradient methanolu v chloroformu). Získaná kvartérní amoniová sůl 2g (527 mg; 86 %) měla t.t. 186 až 187 °C, $[\alpha]_D = +45^\circ$ ($c = 0,39$). ^{13}C NMR spektrum: 15,0, 16,1, 16,7, 16,7, 19,4, 19,4, 21,9, 26,6, 28,0, 28,6, 30,8, 31,4, 32,7, 35,5, 37,5, 38,2, 39,5, 39,9, 40,0, 41,8, 43,4, 50,6, 51,8, 56,7, 57,9, 61,5, 63,6, 79,5, 79,5, 110,5, 129,7, 146,6, 147,7, 151,4, 176,3. Elementární analýza pro $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{BrNO}_3$: vypočteno C 69,14 %, H 8,78 %; nalezeno C 69,18 %, H 8,76 %.

35

Příklad 15

Příprava kvartérní amoniové soli 4o (postup K-2)

40

i) Do suspenze kyseliny 4 (5,0 g; 10 mmol) ve směsi dichlormethanu (150 ml) a acetonitrilu (5 ml) byl přidán uhličitán draselný (2 g; 14,2 mmol) a 1,2-dibromethan (1,65 ml; 13,5 mmol) a reakční směs byla míchána při teplotě místnosti. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (toluen/ether 6:1). Poté co byla veškerá výchozí látka spotřebována, byla filtrací odstraněna použitá báze, směs byla zředěna desetinásobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradient ethylacetátu v hexanu). Získaný 2'-bromethylester kyseliny 4 (2,3 mg; 37 %) měl t.t. 210 °C, $[\alpha]_D = 23^\circ$ ($c = 0,35$).

50

ii) Získaný 2'-bromethylester kyseliny 4 (285 mg; 0,46 mmol) byl rozpuštěn v DMF (5 ml). K roztoku byl přidán triethylamin (0,5 ml; 3,39 mmol), reakční nádoba byla uzavřena a ponechána 4 dny při 60 °C. Po ochlazení byla reakční směs zředěna desetinásobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čiš-

55

těn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradient methanolu v chloroformu). Získaný kvartérní amoniový ester 4o (68 mg; 19 %) měl t.t. 183 °C, $[\alpha]_D = +15^\circ$ (c = 0,31). ^{13}C NMR spektrum: 16,4, 16,8, 17,2, 17,2, 18,7, 20,1, 21,4, 218, 24,2, 257, 28,3, 29,6, 29,8, 33,9, 35,5, 37,8, 38,4, 42,0, 45,9, 51,7, 53,9, 56,1, 65,3, 78,0, 78,3, 78,6, 81,9, 146,5, 172,5, 174,6, 209,1. Elementární analýza pro $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{BrNO}_5$: vypočteno C 66,65 %, H 9,23 %; nalezeno C 66,66 %, H 9,26 %.

Příklad 16

Příprava kvartérní amoniové soli 4p (postup K-2)

2'-bromethylester kyseliny 4 získaný v příkladu 14 (285 mg; 0,46 mmol) byl rozpuštěn v DMF (5 ml). K roztoku byl přidán triethanolamin (500 mg; 4,7 mmol), reakční nádoba byla uzavřena a ponechána 10 dní při 60 °C. Po ochlazení byla reakční směs zředěna desetinásobkem vody a extrahována do ethylacetátu. Spojené organické podíly byly třikrát vytřepány s 5% HCl, třikrát vodou, vysušeny síranem horečnatým a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (gradient methanolu v chloroformu). Získaný kvartérní amoniový ester 4p (134 mg; 41 %) měl t.t. 162 až 163 °C, $[\alpha]_D = +28^\circ$ (c = 0,13). ^{13}C NMR spektrum 16,5, 17,0, 17,3, 17,4, 19,2, 20,3, 20,6, 21,1, 22,4, 2,6, 26,4, 28,4, 28,8, 3,2, 34,5, 36,0, 38,3, 38,9, 39,6, 42,6, 46,0, 46,5, 46,8, 52,3, 54,3, 54,5, 56,7, 57,9, 60,8, 64,6, 79,5, 146,8, 172,8, 14,4, 15,5, 209,7. Elementární analýza pro $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{BrNO}_6$: vypočteno C 62,49 %, H 8,65 %; nalezeno C 62,52 %, H 8,62 %.

b) Příprava farmaceutického prostředku

Postup A: Ve směsi vody (26,0 ml), roztoku hydrogenuhličitanu sodného (5,0 ml; nasycený roztok) a ethanolu (7,0 ml; 99%) se za intenzivního míchání při teplotě 50 °C rozpustí 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin (10,0 g). Do vzniklého bezbarvého, viskózního roztoku se poté přidá najednou rozpustný derivát triterpenu (1,50 g) a opět se intenzivně míchá při teplotě 50 °C. K úplnému rozpuštění je většinou potřeba 20 až 40 min. Po úplném rozpuštění triterpenoidu se vzniklý čirý roztok ochladí na laboratorní teplotu, zfiltruje filtrem pro injekční stříkačku (hydrofilní, velikost pórů 0,22 μm), aby byl sterilní a umístí do chladničky. Získaný roztok lze bez znatelného rozkladu přechovávat v mrazničce při -20 °C až do dalšího použití.

Postup B: Ve směsi vody (14,0 ml) a propylenglykolu (6,0 ml) se za intenzivního míchání při teplotě 50 °C rozpustí 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin (7,00 g). Do vzniklého bezbarvého, viskózního roztoku se poté přidá najednou rozpustný derivát triterpenu (1,00 g) a opět se intenzivně míchá při teplotě 50 °C. K úplnému rozpuštění je většinou potřeba 20 až 40 min. Po úplném rozpuštění triterpenoidu se vzniklý čirý roztok ochladí na laboratorní teplotu, zfiltruje filtrem pro injekční stříkačku (hydrofilní, velikost pórů 0,22 μm), aby byl sterilní a umístí do chladničky. Získaný roztok lze bez znatelného rozkladu přechovávat v mrazničce při -20 °C po dobu několika měsíců.

Stanovení biodostupnosti a farmakokinetického profilu při orálním podání sloučenin pokusným myším

Rozpustné cyklodextrinové formulace terpenoidních sloučenin, připravené podle výše uvedených postupů A nebo B, byly neředěné podány outbredním myším CD-1 intragastricky (200 μl v jediné dávce) jako vodné roztoky injekční stříkačkou s žaludeční sondou. Nerozpustné sloučeniny byly podávány taktéž intragastricky (200 μl v jediné dávce), ale jako vodné suspenze v 0,5 až 1% karboxymethylcelulose. V časových intervalech 2, 4, 6, 8, 12 a 24 h byla myším odebrána krev, která byla centrifugována a získaná plasma následně analyzována technikou HPLC-ESI MS.

Analytické stanovení koncentrace rozpuštěného triterpenoidu v aplikační formě a vzorcích plazmy

5 Ke stanovení koncentrace rozpuštěných triterpenoidů byla použita technika HPLC–ESI MS. Vzorky byly měřeny v jedné analytické šarži s kalibračními roztoky a slepým vzorkem. Vzorek pro měření byl připraven z 50 μ l vodného roztoku obsahujícího inkluzní sloučeninu naředěním methanolem na 10 ml. Následně se 10 μ l roztoku vzorku po prvním ředění dále zředí na 1 ml mobilní fázi. Slepý vzorek byl získán z 50 μ l připraveného vodného roztoku 2–hydroxypropyl– γ –
10 cyklodextrinu naředěním methanolem na 10 ml. Následně se 10 μ l roztoku slepého vzorku po prvním ředění dále zředí na 1 ml methanolem. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 0,2 mg/ml) byly připraveny navážením 2,00 mg analytu do 10 ml odměrné baňky a rozpuštěním v methanolu. Naředěním zásobního roztoku mobilní fázi byly poté připraveny kalibrační vzorky (0,4 resp. 4 μ g/ml).

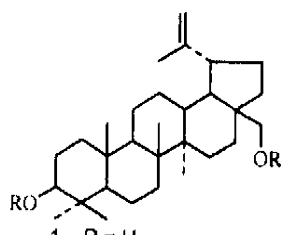
15 Analýza byla prováděna na koloně ODS Hypersil 125 x 2,1 mm, 5 μ m, SN 0745415X, Thermo EC, předkolona ODS 4,0 x 3,0 mm, Phenomenex, mobilní fáze A – 100 mmol/L roztok mravenčanu amonného ve vodě, pH se upraví na 5 kyselinou mravenčí, B – 100 mmol/L roztok mravenčanu amonného v methanolu, teplota kolony: 25 °C, lineární gradientová nebo isokratická eluce, velikost nástřiku 30 μ l. Koncentrace byla stanovena srovnáním se standardem a přepočtena na
20 původní roztok obsahující inkluzní sloučeninu.

Farmakokinetické profily vybraných derivátů při jejich orálním podání myším (látky 2b, 3, 3b, 5a, 5f, 6a, 8a byly podány jako cyklodextrinové formulace, sloučeniny 5c, 5d, 6, 7, 8 jako suspenze s karboxymethylcelulosou) jsou znázorněny na obr. 1 až 8. Výsledky prokazují orální dostupnost rozpustných cyklodextrinových formulací terpenoidů, nikoliv však nerozpustných suspenzí.
25

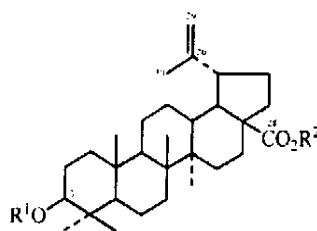
Tabulka 1: Příklady rozpustnosti biologicky aktivních triterpenů (n=konzentrace nižší než detekční limit, tzn. 1 ng/ml; měsíce znamená dva a více měsíců)

5

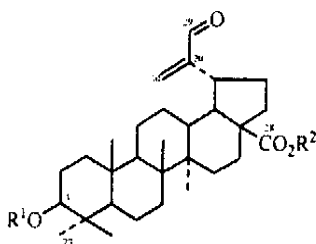
Výchozí sloučenina	Rozpustný derivát	Derivizační postup	Rozpouštěcí postup	Konzentrace rozp.látky	Stabilita roztoku při -20 °C
		-	-	mg/ml	dny
Betulin		-	B	n	-
Betulin 1/ betulin-dihemisukcinát 1a		H-1	A	54	měsíce
Betulin 1/ betulin-dihemifalát 1b		H-2	A	39	měsíce
Betulin 1/betulin-diglukosid 1c		H-3	B	55	měsíce
Ethyl-betulinát 2a		-	B	n	-
Ethyl-betulinát 2a/ hemisukcinát 2b		H-1	A	45	měsíce
Ethyl-betulinát 2a/ hemifalát 2c		H-2	A	41	měsíce
Ethyl-betulinát 2a/ glukosid 2d		H-3	B	43	měsíce
Kyselina betulinová 2		-	A	38	měsíce
kyselina betulinová 2 / hemisukcinát 2e		H-1*	A	51	měsíce
kyselina betulinová 2 / ethyltrimethylamoniium bromid-betulinát 2f		K-2	B	55	měsíce
kyselina betulinová 2 / ethylpyridinium bromid-betulinát 2g		K-2	B	31	měsíce
Aldehyd 3		-	A	35	měsíce
Ethyl-ester 3a		-	B	n	-
Ethyl-ester 3a 3 / hemisukcinát 3b		H-1	A	55	měsíce
Ethyl-ester 3a / hemifalát 3b		H-2	A	40	měsíce
21-oxokyselina 4		-	A	48	měsíc
21-oxokyselina 4 / glykolát 4a		K-1	A	59	měsíc
21-oxokyselina 4/ethyltrimethylamoniium bromidová sůl 4b		K-2	B	47	měsíce
21-oxokyselina 4/ethylpyridinium bromidová sůl 4c		K-2	B	33	měsíce
21-oxokyselina 4/ethyltriethylamoniium bromidová sůl 4o		K-2	B	37	měsíce
21-oxokyselina 4/ethyltriethanolamoniium bromidová sůl 4p		K-2	B	41	měsíce
Ethyl-ester 4d		-	B	n	-
Ethyl-ester 4g/ hemisukcinát 4e		H-1	A	53	měsíce
Ethyl-ester 4g/ hemifalát 4f		H-2	A	28	měsíce
ethyl-ester 4g / glukosid 4i		H-3	B	56	měsíce
ethyl-ester 4g / 2-deoxygalaktosid 4j		H-4	B	60	měsíce
methyl-ester 4d / 2-deoxyglukosid 4H-4			H	61	měsíce
Diketon 5		-	B	n	-
diketon 5 / diketon-hemisukcinát 5a		H-1	A	50	měsíc
diketon 5 / glukosid 5b		H-3	B	51	měsíce
diketon 5 / diketon-dihemisukcinát 5e		H-1	A	69	měsíce
Pyrazin 6		-	A	1,2	měsíce
pyrazin 6 / pyrazin-glykolát 6a		K-1	A	56	měsíce
pyrazin 6 / ethyltrimethylethylamoniium bromidová sůl 6b		K-2	B	49	měsíce
Pentanorkyselina 7		-	A	68	tyden
pentanorkyselina 7 / dihemisukcinát 7c		H-1*	A	73	měsíc
pentanorkyselina 7/diglukosid 7f		H-3	A/B	72/79	měsíce
pentanorkyselina 7 / glykolát 7d		K-1	A	75	měsíc
aminoalkohol 8 / hemisukcinát 8a		H-1	A	37	měsíce



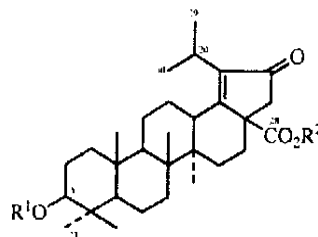
- 1, R = H
 1a, R = CO(CH₂)₂CO₂H
 1b, R = CO(C₆H₄)CO₂H
 1c, R = 1β-D-glukosyl,



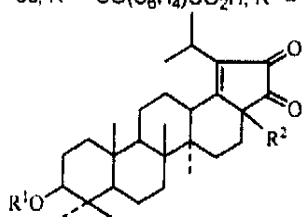
- 2, R¹ = R² = H
 2a, R¹ = H, R² = CH₂CH₃
 2b, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = CH₂CH₃
 2c, R¹ = CO(C₆H₄)CO₂H, R² = CH₂CH₃
 2d, R¹ = 1β-D-glukosyl, R² = CH₂CH₃
 2e, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = H
 2f, R¹ = H, R² = (CH₂)₂N⁺(CH₃)₃Br⁻
 2g, R¹ = H, R² = (CH₂)₂N⁺C₅H₅Br⁻



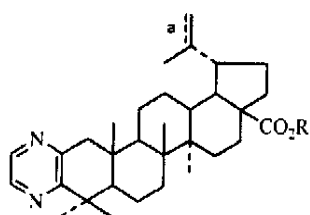
- 3, R¹ = R² = H
 3a, R¹ = H, R² = CH₂CH₃
 3b, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = CH₂CH₃
 3c, R¹ = CO(C₆H₄)CO₂H, R² = CH₂CH₃



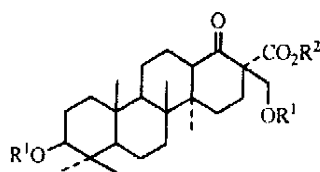
- 4, R¹ = Ac, R² = H
 4a, R¹ = Ac, R² = CH₂CO₂H
 4b, R¹ = Ac, R² = (CH₂)₂N⁺(CH₃)₃Br⁻
 4c, R¹ = Ac, R² = (CH₂)₂N⁺C₅H₅Br⁻
 4d, R¹ = H, R² = CH₃
 4e, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = CH₂CH₃
 4f, R¹ = CO(C₆H₄)CO₂H, R² = CH₂CH₃
 4g, R¹ = H, R² = CH₂CH₃
 4h, R¹ = 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1β-D-glukosyl, R² = CH₂CH₃
 4i, R¹ = 1β-D-glukosyl, R² = CH₂CH₃
 4j, R¹ = 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-1α-D-galaktosyl, R² = CH₂CH₃
 4k, R¹ = 2-deoxy-1α-D-galaktosyl, R² = CH₂CH₃
 4l, R¹ = 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-1α-D-glukosyl, R² = CH₃
 4m, R¹ = 2-deoxy-1α-D-glukosyl, R² = CH₃
 4o, R¹ = Ac, R² = (CH₂)₂N⁺(CH₂CH₃)₃Br⁻
 4p, R¹ = Ac, R² = (CH₂)₂N⁺(CH₂CH₂OH)₃Br⁻



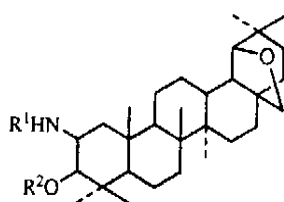
- 5, R¹ = H, R² = CO₂CH₃
 5a, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = CO₂CH₃
 5b, R¹ = 1β-D-glukosyl, R² = CO₂CH₃
 5c, R¹ = Ac, R² = CO₂CH₃
 5d, R¹ = H, R² = CH₂OH
 5e, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = CH₂OCO(CH₂)₂CO₂H



- 6, R = H
 6a, R = CH₂CO₂H
 6b, R = (CH₂)₂N⁺C₅H₅Br⁻



- 7, R¹ = Ac, R² = H
 7a, R¹ = H, R² = CH₂C₆H₅
 7b, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = CH₂C₆H₅
 7c, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = H
 7d, R¹ = 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1β-D-glukosyl, R² = CH₂C₆H₅
 7e, R¹ = 1β-D-glukosyl, R² = CH₂C₆H₅
 7f, R¹ = 1β-D-glukosyl, R² = H



- 8, R¹ = R² = H
 8a, R¹ = CO(CH₂)₂CO₂H, R² = H

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Způsob přípravy inkluzních komplexů pentacyklických a tetracyklických terpenoidů s nativními nebo substituovanými γ -cyklodextriny, **v y z n a ě n ý t í m**, že se ve vodě nerozpustný pentacyklický nebo tetracyklický terpenoid mající volnou karboxylovou, hydroxylovou nebo amino funkční skupinu derivatizuje na této funkční skupině substituentem vybraným ze skupiny zahrnující

10

a) substituenty obecného vzorce X^a , kde X^a reprezentuje $-\text{OC}-\text{R}^1-\text{COOH}$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na hydroxyskupinu terpenoidu;

15

b) substituenty obecného vzorce X^a , kde X^a je $-\text{OC}-\text{R}^1-\text{COOH}$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na aminoskupinu terpenoidu;

20

c) kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^b , kde X^b reprezentuje $-(\text{CH}_2)_n\text{N}^+\text{R}^2_3\text{Y}^-$, kde n je 2–8, R^2 je lineární nebo větvený C_1 až C_8 alkyl, případně substituovaný $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ nebo halogenem, a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;

25

d) kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^c , kde X^c reprezentuje $-(\text{CH}_2)_n(\text{R}^3)^+\text{Y}^-$, kde n je 2–8, $(\text{R}^3)^+$ je protonovaný dusíkatý heterocyklus obsahující 1 až 2 atomy N a 4 až 9 atomů C a obsahuje alespoň jeden aromatický cyklus a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;

30

e) substituenty obecného vzorce X^d , kde X^d reprezentuje $-\text{R}^4-\text{COOH}$, kde R^4 je lineární či větvený C_1 až C_4 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_4 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;

35

f) glykosylové substituenty X^e , kde X^e je vybrán ze skupiny zahrnující glukosyl, galaktosyl, arabinosyl, rhamnosyl, laktosyl, cellobiosyl, maltosyl a jejich 2-deoxyanaloga, pro navázání α - nebo β -glykosidickou vazbou na hydroxyskupinu terpenoidu;

40

reakcí se sloučeninou poskytující daný substituent a následně se připravený derivát rozpustí v roztoku obsahujícím vodu a nativní nebo substituovaný γ -cyklodextrin, načež se vzniklý inkluzní komplex s nativním nebo substituovaným γ -cyklodextrinem izoluje z vodného roztoku, s výhodou lyofilizací.

45

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^a použije sloučenina vybraná ze skupiny zahrnující sloučeniny poskytující sukcinát, ftalát nebo glutarát.

50

3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^b použije sloučenina poskytující cholinový ester, kde $n=2$, $\text{R}^2=\text{CH}_3$.

4. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^c použije sloučenina poskytující pyridiniovou sůl, kde $n=2$, $(\text{R}^3)^+=\text{PyH}^+$, $\text{Y}^-=\text{Br}^-$.

55

5. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^d použije sloučenina poskytující glykolát, kde $R^4=CH_2$.
- 5 6. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se jako sloučenina poskytující substituent obecného vzorce X^e použije sloučenina vybraná ze skupiny zahrnující sloučeniny poskytující glukosyl, galaktosyl, laktosyl a jejich 2-deoxyanaloga.
- 10 7. Způsob přípravy farmaceutického prostředku obsahujícího inkluzní komplex pentacyklického nebo tetracyklického terpenoidu s nativním nebo substituovaným γ -cyklodextrinem, **v y z n a ě n ý t í m**, že se ve vodě nerozpustný pentacyklický nebo tetracyklický terpenoid mající volnou karboxylovou, hydroxylovou nebo amino funkční skupinu derivatizuje na této funkční skupině substituentem vybraným ze skupiny zahrnující
- 15 a) substituenty obecného vzorce X^a , kde X^a reprezentuje $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na hydroxyskupinu terpenoidu;
- 20 b) substituenty obecného vzorce X^a , kde X^a je $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na aminoskupinu terpenoidu;
- 25 c) kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^b , kde X^b reprezentuje $-(CH_2)_nN^+R^2_3Y^-$, kde n je 2–8, R^2 je lineární nebo větvený C_1 až C_8 alkyl, případně substituovaný $-OH$, $-NH_2$ nebo halogenem, a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;
- 30 d) kvartérní amoniové substituenty obecného vzorce X^c , kde X^c reprezentuje $-(CH_2)_n(R^3)^+Y^-$, kde n je 2–8, $(R^3)^+$ je protonovaný dusíkatý heterocyklus obsahující 1 až 2 atomy N a 4 až 9 atomů C a obsahuje alespoň jeden aromatický cyklus a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;
- 35 e) substituenty obecného vzorce X^d , kde X^d reprezentuje $-R^4-COOH$, kde R^4 je lineární či větvený C_1 až C_4 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_4 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou, pro navázání na karboxyskupinu terpenoidu;
- 40 f) glykosylové substituenty X^e , kde X^e je vybrán ze skupiny zahrnující glukosyl, galaktosyl, arabinosyl, rhamnosyl, laktosyl, cellobiosyl, maltosyl a jejich 2-deoxyanaloga, pro navázání α - nebo β -glykosidickou vazbou na hydroxyskupinu terpenoidu;
- 45 reakcí se sloučeninou poskytující daný substituent a následně se připravený derivát rozpustí v roztoku obsahujícím vodu, nativní nebo substituovaný γ -cyklodextrin a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.
- 50 8. Způsob podle nároku 7, **v y z n a ě n ý t í m**, že pomocnými látkami jsou biokompatibilní organická rozpouštědla a/nebo alkalické uhličitany nebo hydrogenuhličitany.
9. Způsob podle nároku 8, **v y z n a ě n ý t í m**, že biokompatibilními organickými rozpouštědly jsou ethanol nebo propylenglykol.

10. Inkluzní komplex pentacyklického nebo tetracyklického terpenoidu s lipofilním rigidním skeletem, tvořeným 25 až 30 atomy uhlíku, obsahujícího alespoň jeden z následujících substituentů:

- 5 a) $-OX^a$, kde X^a je $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou,
- 10 b) $-NHX^a$, kde X^a je $-OC-R^1-COOH$, kde R^1 je lineární či větvený C_1 až C_8 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_8 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou,
- 15 c) $-COOX^b$, kde X^b je $-(CH_2)_nN^+R^2_3Y^-$, kde n je 2–8, R^2 je lineární nebo větvený C_1 až C_8 alkyl, případně substituovaný $-OH$, $-NH_2$ nebo halogenem, a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát,
- 20 d) $-COOX^c$, kde X^c je $-(CH_2)_n(R^3)^+Y^-$, kde n je 2–8, $(R^3)^+$ je protonovaný dusíkatý heterocyklus obsahující 1 až 2 atomy N a 4 až 9 atomů C a obsahuje alespoň jeden aromatický cyklus a Y^- je anion vybraný ze skupiny zahrnující halogenid, sulfát, hydrogensulfát a triflát,
- e) $-COOX^d$, kde X^d reprezentuje $-R^4-COOH$, kde R^4 je lineární či větvený C_1 až C_4 alkylen, lineární či větvený C_1 až C_4 alkenylen, C_6 arylen nesubstituovaný či substituovaný halogenem, hydroxylem nebo aminoskupinou,
- 25 f) $-OX^e$, kde X^e je vázán α nebo β glykosidickou vazbou a je vybrán ze skupiny zahrnující glukosyl, galaktosyl, arabinosyl, rhamnosyl, laktosyl, cellobiosyl, maltosyl a jejich 2-deoxyanaloga,

s nativním nebo substituovaným γ -cyklodextrinem, vyrobený způsobem podle nároku 1.

30

11. Inkluzní komplex podle nároku 10, **v y z n a ě e n ý t í m**, že substituenty obecného vzorce X^a jsou vybrány ze skupiny zahrnující sukcinát, ftalát nebo glutarát.

35

12. Inkluzní komplex podle nároku 10, **v y z n a ě e n ý t í m**, že substituenty obecného vzorce X^b jsou cholinové estery, kde $n=2$, $R^2=CH_3$.

40

13. Inkluzní komplex podle nároku 10, **v y z n a ě e n ý t í m**, že substituenty obecného vzorce X^c jsou pyridiniové soli, kde $n=2$, $(R^3)^+=PyH^+$, $Y^-=Br^-$.

14. Inkluzní komplex podle nároku 10, **v y z n a ě e n ý t í m**, že substituenty obecného vzorce X^d jsou glykoláty, kde $R^4=CH_2$.

45

15. Inkluzní komplex podle nároku 10, **v y z n a ě e n ý t í m**, že substituenty obecného vzorce X^e jsou vybrány ze skupiny zahrnující glukosyl, galaktosyl, laktosyl a jejich 2-deoxyanaloga.

16. Inkluzní komplex podle kteréhokoliv z nároků 10 až 15 pro použití jako léčivo.

50

17. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě e n ý t í m**, že obsahuje inkluzní komplex podle kteréhokoliv z nároků 10 až 15, vodu a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku, vyrobený způsobem podle nároku 7.

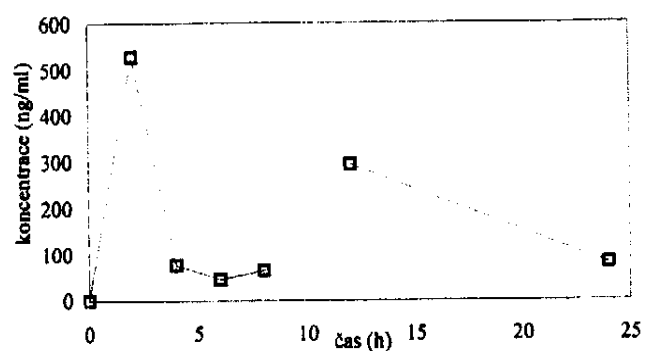
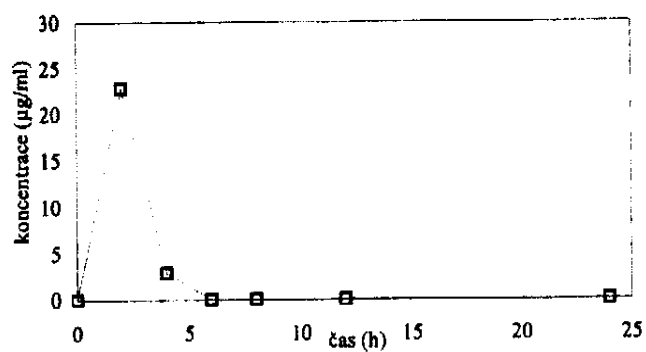
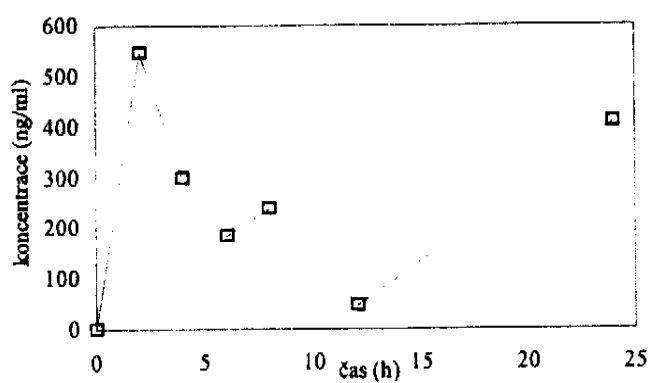
18. Farmaceutický prostředek podle nároku 17, **v y z n a ě e n ý t í m**, že pomocnými látkami jsou biokompatibilní organická rozpouštědla a/nebo alkalické uhličitany nebo hydrogenuhličitany.

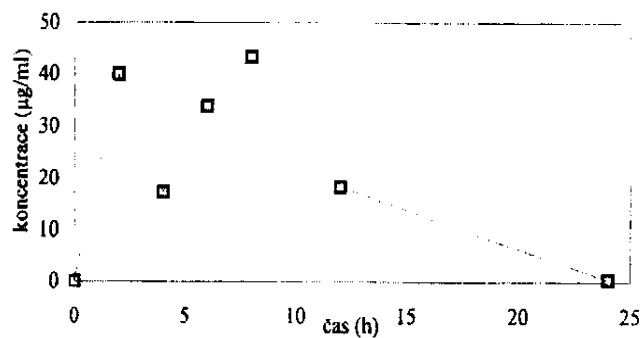
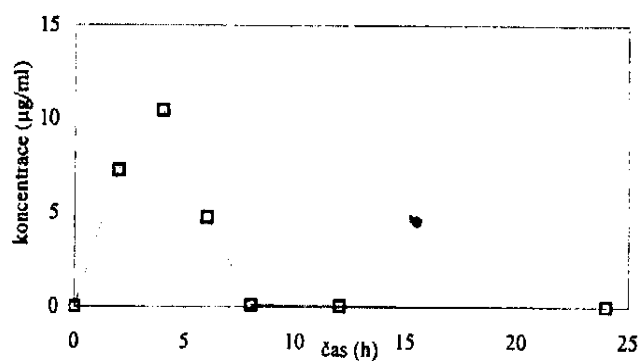
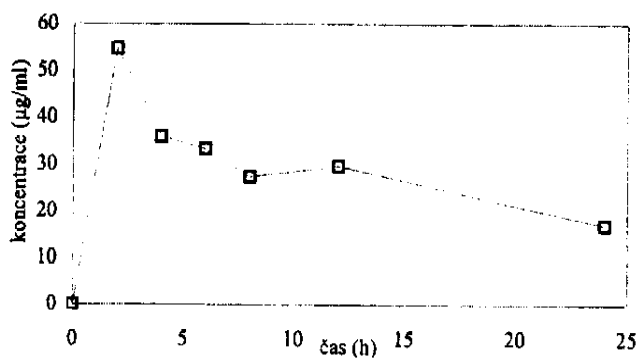
55

19. Farmaceutický prostředek podle nároku 18, **v y z n a ě n ý t i m**, že biokompatibilními organickými rozpouštědly jsou ethanol nebo propylenglykol.

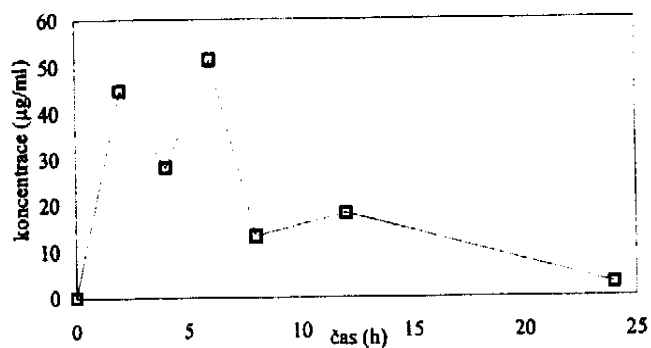
5

3 výkresy

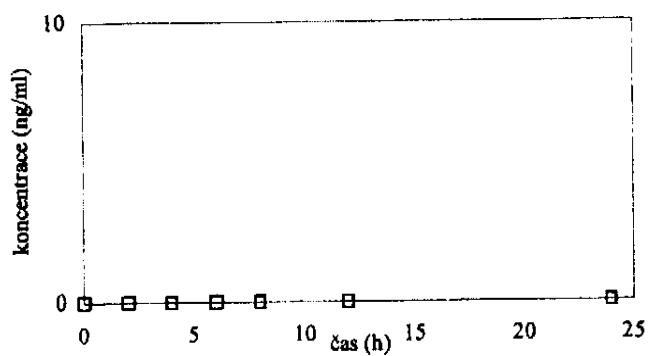
Obr. 1: Farmakokinetický profil hemisukcinátu 2b při orálním podání myším**Obr. 2:** Farmakokinetický profil aldehydu 3 při orálním podání myším**Obr. 3:** Farmakokinetický profil hemisukcinátu 3b při orálním podání myším

Obr. 4: Farmakokinetický profil hemisukcinátu 5a při orálním podání myším**Obr. 5:** Farmakokinetický profil diketon-dihemisukcinátu 5e při orálním podání myším**Obr. 6:** Farmakokinetický profil pyrazinu 6a při orálním podání myším

Obr. 7: Farmakokinetický profil hemisukcinátu 8a při orálním podání myším



Obr. 8: Farmakokinetické profily látek 5c, 5d, 6, 7, 8 podávaných jako suspenze s karboxymethylcelulózou orálně myším



Konec dokumentu