

(12) **PŘEKLAD EVROPSKÉHO
PATENTOVÉHO SPISU**

(10)
CZ/EP 2 854 861 T3

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (96) Datum podání evropské přihlášky: **31.05.2013**
- (96) Číslo evropské přihlášky: **EP 13726846.2**
- (97) Datum zveřejnění evropské přihlášky: **05.12.2013**
- (97) Číslo evropského patentu: **EP 2854861**
- (97) Datum oznámení o udělení evropského patentu: **04.10.2017**
- (30) Právo přednosti:
01.06.2012 US 201261654277 P
- (86) PCT číslo: **PCT/GB2013/051458**
- (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2013/179057**
- (47) Datum zveřejnění překladu evropského patentového spisu: **24.01.2018**
(Věstník č. 4/2018)

(51) Int. Cl.:

C 07 C 331/20 (2006.01)
C 08 B 37/16 (2006.01)
C 08 L 5/16 (2006.01)

(73) Majitel patentu:
PharmAgra Labs, Inc., Brevard, NC 28712, US

(72) Původce:
DAMIREDDI, Sahadeva Reddy, Waverly, Iowa 50677, US
AKUE, Kpakpo Ambroise, Columbia, Missouri 65201, US
NELSON, Jared K., Pisgah Forest, North Carolina 28768, US
FRISBEE, Albert Roger, Hendersonville, North Carolina 28792, US
NEWSOME, Peter Wyatt, Horseshoe, North Carolina 28742, US

(74) Zástupce:
ŽOVICOVÁ & ŽOVIC IP, s.r.o., Záhradnícka 36, 82108 Bratislava, SK

(54) Název vynálezu:
Metoda syntézy sulforafanu

CZ/EP 2 854 861 T3

Metoda syntézy sulforafanu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká metody syntézy sulforafanu. Předkládaný vynález se týká metody syntézy stabilizovaných komplexů sulforafan-cyklodextrin.

Dosavadní stav techniky

Podle amerického Národního institutu pro léčbu rakoviny (National Cancer Institute) je sulforafan považován za jeden z 40 nejslibnějších protinádorových přípravků (Kelloff G.J, Crowell J.A, Steele V.E, Lubet R.A, Malone W.A, Boone C.W, Kopelovich L, Hawk E.T, Lieberman R, Lawrence J.A, Ali I, Viner J.L, Sigman C.C, J. Nutr, 2000,130, 467). Je také známo, že se vyznačují antimikrobiálními vlastnostmi. Sulforafan tedy přitahuje zájem jako potenciální látka pro léčbu a/nebo prevenci rakoviny a mikrobiálních infekcí.

Sulforafan se vyskytuje v hlávkové zelenině jako je zelí, brokolice, výhonky brokolice, růžičková kapusta, květák, výhonky kvěťáku, čínské zelí, kapusta, zelné listy, rukola, kedlubna, hořčice, tuřín, červené ředkvičky a řeřišnice. V rostlině je přítomna vázaná forma jako glukorafanin, glukosinolát. V přírodě se sulforafan často vytváří z glukorafaninu po poškození rostlinných buněk enzymatickou reakcí.

V oboru jsou známé různé syntetické metody výroby sulforafanu. Sulforafan byl syntetizován již v roce 1948 Schmidem a Karrerem (Schmid H. And Karrer, P.; Helvetica Chimica Acta. 1948; 31; 6: 1497–1505). Schmidova syntéza vede k racemické směsi.

Různé alternativní syntetické postupy popsal například Vermeulen se spolupracovníky (Vermeulen M, Zwanenburg B, Chittenden G.J.F, Verhagen H, Eur. J. Med. Chem, 2003, 38(78), 729–737), Conaway se spolupracovníky (Conaway C.C, Wang C.X, Pittman B, Yang Y.M, Schwartz J.E, Tian D, McIntee E.J, Hecht S.S, Chung F.L, Cancer Research, 2005, 65(18), 8548-8557), Kuhnert se spolupracovníky (Kuhnert N and Lu Y, Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals 2004, 47(8), 501–507), Rajski se spolupracovníky (Mays J. R and Rajski, S. R. ChemBioChem, 2008, 9(5), 729–747 a WO2008/008954), Christopher se spolupracovníky (Christopher A. D'Souza, Shantu Amin, Dhimant Desai, Journal of

Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals, 2003, 46(9), 851–859), Takayuki se spolupracovníky (Joon-Kwan M, Jun-Ran K, Young-Joon A and Takayuki S, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2010, 58 (11), 6672–6677) a Rabhi se spolupracovníky (WO 2008015315 a US 0135618 A1), Cao se spolupracovníky (Tong Jian Ding, Ling Zhou, Xiao Ping Cao, Chinese Chemical Letters, 2006, 17(9), 1152–1154) a Chen se spolupracovníky (Xin Chen, Zhengyi Li, Xiaoqiang Sun, Hongzhao Ma, Xiaoxin Chen, Jie Ren, Kun Hu, Synthesis, 2011, 24, 3991–3996 a CN 102249968).

Ačkoli byl sulforafan syntetizován různými metodami, většina vykazovaných metod s sebou nese několik nevýhod; jako jsou například nízké výtěžky, používání nebezpečných a potenciálně škodlivých činidel (jako je thiofosgen, což je vysoce toxická a těkavá kapalina s nepříjemným a dráždivým zápachem), používání rozpouštědel třídy I nebo II, náročné zpracování/čištění a nežádoucí vedlejší produkty (jako je neoddělitelný disulfonový/sulfonylový derivát sulforafanu). Tyto procesy proto nejsou vhodné pro účinnou syntézu sulforafanu ve velkém měřítku.

Proto existuje potřeba alternativního procesu syntézy sulforafanu, který by řešil jeden nebo více z výše uvedených nedostatků dosavadního stavu techniky. Zejména je zapotřebí syntetický proces, který lze realizovat ve velkém měřítku. Takový proces ideálně bude:

- (i) účinný, tj. poskytovat komerčně přiměřené výtěžky sulforafanu s dobrou čistotou za použití malého počtu syntetických stupňů;
- (ii) nákladově efektivní, tj. za použití levných reakčních složek a reakčních podmínek;
- (iii) ekologicky přijatelný a bezpečný při provádění, to znamená, že nepoužívá příliš toxická činidla nebo rozpouštědla.

Dalším a významným problémem spojeným se sulforafanem je jeho vlastní nestabilita. Sulforafan existuje ve formě nestabilního oleje, který za normálních podmínek rychle degraduje. Díky tomu je sulforafan výjimečně obtížné vyrábět a distribuovat.

Proto existuje také potřeba procesu syntézy sulforafanu, který je snadno přístupný následným krokům zpracování, aby se získala stabilnější forma vyrobeného sulforafanu.

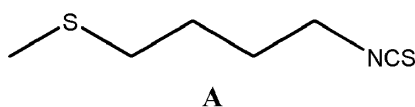
Jeden zvláště účinný způsob stabilizace sulforafanu zahrnuje tvorbu komplexů sulforafan-cyklodextrin. V tomto ohledu popisuje US 7,879,822B2 přípravu komplexů sulforafan-cyklodextrin, které mají dobrou stabilitu.

Dalším cílem předkládaného vynálezu je proto poskytnout jednoduchý proces, který umožňuje, aby byl syntetizovaný sulforafan snadno stabilizován tvorbou komplexu sulforafan-cyklodextrin.

Podstata vynálezu

Podle prvního aspektu předkládaného vynálezu se poskytuje proces přípravy komplexu sulforafanu a cyklohextrinu nebo komplexu sulforafanu a derivátu hydroxyalkylcyklohextrinu, přičemž tento proces zahrnuje:

(i) reakci ve vodném rozpouštědle sloučeniny vzorce A:

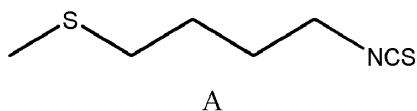


s oxidačním činidlem a za přítomnosti katalyzátoru za vzniku sulforafanu; a
 (ii) smíchání sulforafanu z kroku (i) s cyklohextrinem nebo derivátem hydroxyalkylcyklohextrinu ve vodném rozpouštědle za vzniku sraženiny komplexu sulforafan-cyklohextrin nebo komplexu sulforafan-hydroxyalkylcyklohextrin;

přičemž vodným rozpouštědlem je voda a katalyzátor je vybrán z cyklohextrinu, derivátu hydroxyalkylcyklohextrinu, valchařské hlínky a organických nebo anorganických kyselin a přičemž oxidačním činidlem je peroxid vodíku nebo ve vodě rozpustná nebo mísitelná organická peroxidová kyselina nebo jejich směs.

Podle prvního aspektu je popsána metoda syntézy sulforafanu, přičemž tato metoda zahrnuje:

reakci ve vodném rozpouštědle sloučeniny vzorce A:



s oxidačním činidlem a za přítomnosti katalyzátoru.

Proces podle předkládaného vynálezu má řadu výhod oproti běžným metodám výroby sulforafanu podle dosavadního stavu techniky. Za prvé, tento proces je účinný a poskytuje vysoké výtěžky požadovaného výsledného sulforafanového produktu bez významné produkce sulfonylového derivátu (Erysolin) jako vedlejšího produktu. Za druhé, reakce může probíhat za mírných, vodných podmínek. Použití vodného rozpouštědla, jako je voda, je obzvláště výhodné, protože se tak vylučuje použití drahých a/nebo potenciálně nebezpečných rozpouštědel. Rovněž umožňuje použití méně nebezpečných oxidačních činidel, jako je peroxid vodíku. Kromě toho použití vodného rozpouštědla činí reakci ideální pro rychlou a účinnou tvorbu *in situ* stabilizovaných komplexů sulforafan-cyklodextrin (jednoduchým smísením výsledného sulforafanového produktu s vodným roztokem cyklodextrinu za vzniku komplexu).

Proces podle předkládaného vynálezu je také vhodný pro výrobu sulforafanu ve velkém měřítku.

V dalším aspektu je popsán sulforafan tvořený, získatelný, získaný nebo přímo získaný procesem definovaným v tomto textu.

V ještě dalším aspektu je popsán komplex sulforafan-cyklodextrin vytvořený, získatelný, získaný nebo přímo získaný procesem definovaným v tomto textu.

V dalším aspektu je popsán komplex sulforafan-cyklodextrin, jak je zde definován, pro použití při léčení a/nebo prevenci mikrobiálních infekcí a/nebo rakoviny.

V dalším aspektu je popsána farmaceutická kompozice obsahující komplex sulforafan-cyklodextrin, jak je zde definován, a jednu nebo více dalších farmaceutických pomocných látek.

Podrobný popis vynálezu

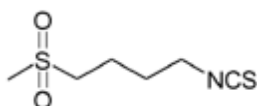
Definice

Pokud není uvedeno jinak, následující termíny používané ve specifikaci a nárocích mají následující významy uvedené níže.

„Terapeuticky účinné množství“ znamená množství sloučeniny, které, je-li podáváno nějakému subjektu pro léčbu onemocnění nebo zdravotního stavu, je dostatečné k uskutečnění takové léčby onemocnění nebo zdravotního stavu. Toto „terapeuticky účinné množství“ se bude lišit v závislosti na dané sloučenině (např. ve formě soli), onemocnění nebo zdravotním stavu a jeho závažnosti, a rovněž na věku, hmotnosti atd. subjektu, který má být léčen.

Termín „jednotlivec“ se zde používá k označení teplokrevného savce. Sloučenina podle předkládaného vynálezu může být proto používána v humánních a/nebo veterinárních aplikacích. V konkrétním provedení je subjektem člověk.

Výraz „Erysolin“ se zde používá k označení sloučeniny, která strukturu znázorněnou níže:



Erysolin

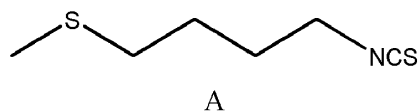
Proces výroby sulforafanu

Je třeba si uvědomit, že v popisu zde popsanych syntetických metod mohou být navrženy všechny navrhované reakční podmínky, včetně volby vodného rozpouštědla, reakční atmosféry, reakční teploty, trvání experimentu a jakýchkoli použitých postupů zpracování vybrané osobou se znalostí techniky. Odborníkovi v oboru organické syntézy je rovněž zřejmé, že funkční skupiny nacházející se na různých částech molekuly musí být kompatibilní s použitými činidly a reakčními podmínkami.

Jak je uvedeno výše, předkládaný vynález poskytuje metodu syntézy sulforafanu, tato metoda zahrnuje:

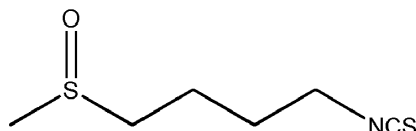
reakci ve vodném rozpouštědle sloučeniny vzorce A:

6



s oxidačním činidlem a za přítomnosti katalyzátoru.

Výsledná sulforafanová sloučenina má strukturu znázorněnou níže:



Sulforafan může být shromažďován a vhodně skladován pro následné použití, nebo výhodněji může být smíchán přímo nebo *in situ* v přítomnosti cyklodextrinu za vzniku stabilizovaného komplexu sulforafan-cyklodextrin, jak je zde dále definováno. Tím se zabrání nutnosti náročného přečišťování výsledného produktu sulforafanu.

Rozpouštědlem je voda.

Výhodně je vodné rozpouštědlo odplyněno před reakcí. Lze použít jakýkoli vhodný způsob odplynění vhodného rozpouštědla známý v oboru. Rozpouštědlo může být například odplyněno probubláním rozpouštědla inertním plynem (jako je dusík nebo argon), zahříváním rozpouštědla pod zpětným chladičem nebo použitím vakuového nebo ultrazvukového odplynění.

Oxidační činidlo může být vybráno z peroxidu vodíku nebo ve vodě rozpustných nebo mísitelných organických peroxidů, jako je kyselina *meta*-chlorperoxybenzoová (mCPBA). V jednom provedení je oxidačním činidlem peroxid vodíku. Peroxid vodíku je obzvláště vhodný, protože reaguje v metodologii předkládaného vynálezu za vzniku sulforafanu a vody jako konečných produktů (to znamená, že se nevytváří žádné nežádoucí vedlejší produkty).

Vhodně je oxidační činidlo přítomno v množství dostatečném k oxidaci veškeré sloučeniny vzorce A na sulforafan. Typicky se bude požadovat přibližně jeden molární ekvivalent (vztaženo na sloučeninu vzorce A) oxidačního činidla, ačkoli je možné použít mírný přebytek oxidačního činidla, pokud jsou podmínky kontrolovány za účelem zabránění nebo omezení tvorby sulfonylového vedlejšího produktu. Například mohou být v některých případech použity 1 až 2 molární ekvivalenty oxidačního činidla (vztaženo na sloučeninu vzorce A), výhodněji 1 až 1,5 molárních

ekvivalentů oxidačního činidla a ještě výhodněji 1 až 1,1 molárních ekvivalentů oxidačního činidla.

Reakce probíhá také v přítomnosti vhodného katalyzátoru. Katalyzátor musí být aktivní ve vodném prostředí a může být homogenní nebo heterogenní. Vhodnými katalyzátory jsou kyselé katalyzátory, jako je cyklodextrin a/nebo valchařská hlinka a organické nebo anorganické kyseliny, jako je například kyselina askorbová, kyselina mravenčí, kyselina octová a/nebo kyselina sírová.

V konkrétním provedení je katalyzátorem cyklodextrin. Jakýkoliv vhodný cyklodextrin může být použit jako katalyzátor. Například cyklodextrin může být vybrán z jednoho nebo více z W6 (alfa) cyklodextrinu (kruhová molekula se šesti cukry), W7 (beta) cyklodextrinu (kruhová molekula se sedmi cukry) W8 (gamma) cyklodextrinu (kruhová molekula s osmi cukry), jejich hydroxypropylových derivátů (jako je hydroxypropylcyklodextrin) a jejich směsí. Jiné cyklodextriny známé v oboru jsou také považovány za užitečné v syntetické metodě.

V jednom provedení vynálezu cyklodextrin používaný jako katalyzátor je α -cyklodextrin.

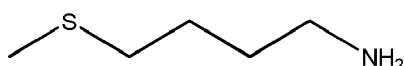
Množství požadovaného katalyzátoru se bude měnit v závislosti na povaze oxidačního činidla, katalyzátoru a použitých reakčních podmínkách. Výhodně jsou přítomny 0,0001 až 1,0 molárního ekvivalentu katalyzátoru (vztaheno na sloučeninu vzorce A) a výhodněji 0,005 až 0,2 molárního ekvivalentu katalyzátoru a ještě výhodněji 0,005 až 0,05 molárního ekvivalentu katalyzátoru.

V provedeních vynálezu, ve kterých je oxidačním činidlem peroxid vodíku, se peroxid vodíku vhodně přidává k reakční směsi pomalu a teplota reakční směsi se udržuje na 15 °C nebo méně nebo výhodněji na 10 °C nebo méně. Teplota se vhodně sleduje při přidávání peroxidu vodíku a rychlost přidávání se upraví tak, aby teplota zůstala v požadovaných mezích.

V jednom provedení vynálezu je oxidačním činidlem peroxid vodíku, rozpouštědlo je voda a katalyzátor je vybrán z cyklodextrinu, valchařské hlinky a kyselin, jako je kyselina askorbová, kyselina mravenčí, kyselina octová a/nebo kyselina sírová. V konkrétním provedení vynálezu je oxidačním činidlem peroxid vodíku, rozpouštědlem je voda a katalyzátorem je cyklodextrin, zejména α -cyklodextrin. V takových provedeních mohou být sloučenina vzorce A a katalyzátor rozpuštěny ve vodě a ochlazeny na méně než 15 °C nebo výhodněji na méně než 10 °C (například mezi 1 a 2 °C) a vodný roztok peroxidu vodíku může být potom přidán do chlazeného

roztoku řízeným způsobem tak, aby teplota nepřekročila 15 °C nebo výhodněji 10 °C. Reakce může být potom míchána a nechá se probíhat po vhodnou dobu, například v rozmezí od 1 do 48 hodin. Sulforafanový produkt může být poté shromážděn nebo použit v následných procesních krocích.

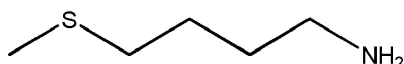
Výchozí látka, tj. sloučenina vzorce A, může být získána komerčně (může být získána od různých dodavatelů buď jako přírodní nebo syntetický produkt) a/nebo může být připravena technikami známými v oboru. Například sloučenina vzorce A může být připravena jako meziproduct ze sloučeniny vzorce B znázorněné níže



B

postupy, které popsal Vermeulen se spolupracovníky (Eur. J. Med. Chem, 2003, 38(78), 729–737), D'Souza se spolupracovníky (Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals, 2003, 46(9), 851-859), Cao se spolupracovníky (Chinese Chemical Letters, 2006, 17(9), 1152–1154) and Chen se spolupracovníky (Synthesis, 2011, 24, 3991–3996 a CN 102249968).

V jednom provedení předkládaného vynálezu se sloučenina vzorce A připravuje reakcí sloučeniny vzorce B



B

se sulfidem uhličitým ve vhodném rozpouštědle (například THF) a v přítomnosti vhodné báze (jako je Et₃N) a vhodného oxidačního činidla (jako je peroxid vodíku).

V jednom konkrétním provedení je rozpouštědlem THF, bází je triethylamin a oxidačním činidlem je peroxid vodíku.

V dalším provedení se sloučenina vzorce B a báze (například triethylamin) rozpustí v rozpouštědle (např. THF) při nízké teplotě (například pod 25 °C, výhodněji pod 0 °C a ještě výhodněji pod –10 °C). Do reakční směsi se potom přidá sulfid uhličitý. Vhodně se teplota reguluje během přidávání sulfidu uhličitého (například se udržuje pod 25 °C, nebo výhodněji pod 5 °C a ještě výhodněji pod 0 °C). Sulfid uhličitý může být přidáván regulovanou rychlostí, aby se udržovala teplota reakční směsi nízká (např.

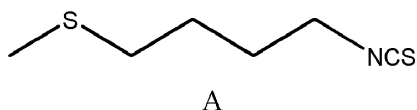
může být přidávána po kapkách po dobu například 0,5 až 4 hodin). Reakční směs se potom může zahřát (například na teplotu mezi 5 a 25 °C a výhodněji na teplotu mezi 5 a 20 °C) a potom se přidá oxidační činidlo (například peroxid vodíku).

Výsledný surový produkt sloučeniny vzorce A může být shromážděn, promyt a čištěn (například destilací) za vzniku čisté sloučeniny vzorce A za použití technik dobře známých v oboru.

Proces výroby komplexů sulforafan-cyklodextrin

Je zde také popsán proces přípravy komplexu sulforafanu a cyklodextrinu, tento proces zahrnuje:

(i) reakci ve vodném rozpouštědle sloučeniny vzorce A:



s oxidačním činidlem v přítomnosti katalyzátoru za vzniku sulforafanu; a

(ii) smíchání vodného roztoku sulforafanu z kroku (i) s vodným roztokem cyklodextrinu ve vodném rozpouštědle za vzniku sraženiny komplexu sulforafan-cyklodextrin.

Krok (i) reakce je proces syntézy sulforafanu definovaný výše. Zvláštní výhodou použití vodného rozpouštědla v kroku (i) je to, že po dokončení reakce umožňuje jednoduché přidání vodného roztoku cyklodextrinu do reakční směsi za účelem vytvoření stabilizovaného komplexu sulforafan-cyklodextrin. Proto tento proces poskytuje jednoduchý, účinný a rychlý prostředek, pomocí něhož může být sulforafan stabilizován.

Komplexy sulforafan-cyklodextrin jsou popsány v US 7,879,822B2.

Proces podle předkládaného vynálezu vhodně zahrnuje další krok odběru sraženiny komplexu sulforafan-cyklodextrin a popřípadě promytí a sušení sraženiny. Sraženina může být odebírána technikami dobře známými v oboru, jako je například filtrace.

Vhodné reakční podmínky pro vytváření komplexu sulforafan-cyklodextrin ve vodných roztocích jsou v oboru známy z patentu US 7,879,822 B2.

V některých provedeních může být čistota výsledného komplexu dále zvýšena rekrystalizací.

Může být použit jakýkoliv vhodný cyklodextrin pro vytvoření komplexu se sulforafanem. V provedeních, ve kterých je katalyzátorem v kroku (i) cyklodextrin, pak cyklodextrin použitý pro vytvoření komplexu v kroku (ii) může být stejný nebo odlišný od cyklodextrinu použitého jako katalyzátor v kroku (i). Například cyklodextrin pro použití v metodách podle předkládaného vynálezu může být vybrán z jednoho nebo více z W6 (alfa) cyklodextrinu (kruhová molekula se šesti cukry), W7 (beta) cyklodextrinu (kruhová molekula se sedmi cukry) W8 (gamma) cyklodextrinu (kruhová molekula s osmi cukry), jejich hydroxypropylových derivátů (jako je hydroxypropylcyklodextrin) a jejich směsí. Jiné cyklodextriny známé v oboru jsou rovněž považovány za užitečné v předkládaných procesech.

V jednom provedení vynálezu cyklodextrin použitý pro vytvoření komplexu se sulforafanem v kroku (ii) je α -cyklodextrin.

Před smísením se sulforafanem získaným ve stupni (i) se cyklodextrin použitý v kroku (ii) předkládané metody může rozpustit ve vodném rozpouštědle, jako je voda. Roztoky/disperze cyklodextrinu v rozpouštědle mohou být připraveny jakoukoli metodou známou v oboru. Například v některých provedeních může být cyklodextrin zcela nebo částečně rozpuštěn ve vodném rozpouštědle tak, že se cyklodextrin umístí do rozpouštědla a směs se zahřívá. V dalších provedeních může být sonikace použita k úplnému nebo částečnému rozpuštění cyklodextrinu v rozpouštědle. V dalších provedeních může být použito více metod rozpouštění, aby se dosáhlo požadované úrovně rozpouštění uživatelem, například použitím sonikace ve spojení s ohřátím rozpouštědla.

Když se sulfonát a cyklodextrin přidávají dohromady v kroku (ii) procesu a jsou připraveny k míchání, lze použít jakoukoli metodu míchání. Složky mohou být například smíchány pomocí zamíchání, sonikace, míchání nebo jinými metodami známými v oboru. V některých provedeních může být společně použito více než jedna metoda míchání.

Doba míchání se může měnit v závislosti na konkrétních použitých metodách míchání. Například pokud se použije míchání nebo sonikace, mohou být sulforafan a cyklodextrin míchány po dobu asi 2 hodin až asi 48 hodin. V jiných provedeních

může být sulforafan a cyklodextrin míchán míchadlem nebo sonikací po dobu asi 6 hodin až asi 15 hodin.

Jak bylo diskutováno výše, pro smíchání sulforafanu a cyklodextrinu lze použít více metod míchání. Například v některých provedeních může být ultrazvuk použit v souvislosti s mícháním. V takových provedeních může být sonikace použita po dobu od asi 0,01 hodiny do asi 1,5 hodiny během míchání s míchadlem po dobu od asi 2 hodin do asi 48 hodin.

Počáteční smíchání sulforafanu a cyklodextrinu při okolní teplotě, například mezi 15 °C a 25 °C. Avšak ve zvláštním provedení, po smíchání sulforafanu a cyklodextrinu, se směs ochladí, aby se vytvořená sraženina stabilizovala. Použitý sulforafan a cyklodextrin mohou diktovat trvání a závažnost požadovaného chlazení. Například může být směs ochlazená na teplotu v rozmezí od asi -10 °C do asi 20 °C, výhodněji mezi -8 °C až 10 °C, ještě výhodněji mezi -5 °C až 4 °C. Doba trvání chlazení se může měnit a může být například od přibližně 0,1 hodiny do přibližně 24 hodin.

V jednom konkrétním provedení se směs může ochladit na teplotu od asi -5 °C do asi 2 °C, případně na dobu od asi 0,5 hodiny do asi 4 hodin. Sraženina může být potom filtrována za získání komplexu sulforafan-cyklodextrin se zvýšenou čistotou.

Výhodně je molární poměr sulforafanu k cyklodextrinu ve výsledném komplexu v rozmezí od 0,4:1 do 1:1; výhodně od 0,8:1 do 1:1; a výhodněji 0,9:1 až 1:1, 0,95:1 až 1:1 nebo 0,98:1 až 1:1.

V dalších provedeních může být výsledný komplex rekrystalizován za získání komplexu s ještě vyšší čistotou sulforafanu. V takových provedeních lze použít jakoukoli metodu rekrystalizace známou v oboru. Například v některých provedeních může být rekrystalizace provedena chlazením výsledné směsi rozpuštěním výsledné směsi v druhém rozpouštědle chemickou reakcí, změnou pH směsi nebo odpařením rozpouštědla. Uživatelské specifikace mohou diktovat konkrétní použité metody.

V některých provedeních může metoda rekrystalizace zahrnovat rozpuštění vzniklých pevných částic v rozpouštědle. Takové rozpouštění může být dokončeno jakoukoli metodou známou v oboru. Například v některých provedeních může být rozpuštění dokončeno pomocí sonikace. Sonikace může být aplikována při zvýšené teplotě, tj. od přibližně 50 °C do přibližně 100 °C, a může pokračovat, dokud nezůstanou žádné pevné částice. Navíc může být použito jakékoliv rozpouštědlo známé v oboru, včetně těch, která jsou uvedena výše, které může být užitečné v souvislosti s rozpouštěním cyklodextrinu.

Po podstatném dokončení rozpuštění se směs může udržovat při pokojové teplotě, aby se zbytky pevných látek vyloučily z roztoku. V závislosti na použitých materiálech může být doba, během níž je směs udržována při pokojové teplotě, různá. Pokud se například použije sulforafan, většina pevných látek se může vyloučit z roztoku během jedné hodiny udržování při pokojové teplotě. V jiných provedeních může trvat více než nebo méně než hodinu, aby se z roztoku dostatečně uvolnili pevné látky komplexu.

Jak bylo uvedeno výše, mohou být pevné látky ochlazeny, aby se napomohlo tvorbě a stabilizaci komplexu. Použitý komplex může určovat požadovanou intenzitu chlazení. Například v některých provedeních může být směs chlazena v chladicím zařízení, jako je například chladnička, která je udržována při teplotě od asi $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ do asi $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, popřípadě po dobu od asi 0,1 hodiny do přibližně 2 hodin. V jiných provedeních může být směs chlazena v chladicím zařízení, které se udržuje při teplotě od asi $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do asi $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu mezi přibližně 0,5 až 1 hodinou. Poté, co komplex dostatečně zkrystalizuje, může být zfiltrován za vzniku komplexu sulforafan-cyklodextrin s ještě větší čistotou.

Farmaceutické kompozice a metody léčby

V dalším aspektu je popsána metoda poskytování protirakovinné a/nebo antimikrobiální léčby subjektu, potřebuje takovou léčbu. Metoda zahrnuje podávání subjektu, který tuto léčbu potřebuje, komplexů sulforafan-cyklodextrin se zvýšenou čistotou definovaných v tomto textu v terapeuticky účinném množství.

První složkou metody zpracování je komplex sulforafan-cyklodextrin připravený podle zde definovaných metod. Složky, které jsou užitečné v předkládaném vynálezu, mohou mít jakoukoliv čistotu nebo jakost, pokud je přípravek kvality a stability vhodné pro farmaceutické použití a neovlivňuje fyziologickou aktivitu nebo bezpečnost výsledného přípravku.

Metoda může dále zahrnovat podávání jiných farmaceuticky přijatelných složek. Pojem „farmaceuticky přijatelný“ se zde adjektivně používá tak, že znamená, že modifikovaná položka je vhodná pro použití ve farmaceutickém produktu.

Když se komplex sulforafan-cyklodextrin vytvořený předkládanými metodami dodává společně s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou, přičemž tyto pojmy mohou být v tomto textu používány

zaměnitelně, může být vytvořena farmaceutická kompozice. Farmaceutické kompozice mohou být připraveny jakoukoliv z dobře známých technik farmacie, například smícháním složek.

Popisovaná farmaceutická kompozice je zaměřena na kompozici vhodnou pro prevenci nebo léčení zde popsaných poruch.

Farmaceuticky přijatelné nosiče a pomocné látky jsou vybrány tak, že vedlejší účinky farmaceutické sloučeniny nebo sloučenin jsou minimalizovány a účinnost sloučeniny (sloučenin) není rušena nebo inhibována v takovém rozsahu, že by léčba byla neúčinná. Farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují fyziologický roztok, Ringerův roztok, fosfátový roztok nebo pufr, pufovaný fyziologický roztok a další nosiče známé v oboru. Farmaceutické kompozice mohou také obsahovat stabilizátory, antioxidanty, barviva a ředidla.

Nosič by měl být přijatelný ve smyslu kompatibility s ostatními ingrediencemi kompozice a neměl by být škodlivý pro příjemce. Nosič může být pevný nebo kapalný nebo obojí a může být formulován se sloučeninou (sloučeninami) jako kompozice s jednotkovou dávkou, například tablety, která může obsahovat od přibližně 0,01 % do přibližně 95 % hmotnostních účinné sloučeniny.

Farmaceuticky přijatelný nosič může být také vybrán na základě požadovaného způsobu podávání sloučeniny (sloučenin). Požadovaný způsob podávání může být jeden nebo více z podání orálního, enterálního, parenterálního, injekčního, bukalního a topického. Například v jednom provedení je nosič vhodný pro orální podávání. V některých aspektech kompozice obsahuje nosič nebo další činidlo, které je vhodné pro podporu podávání sloučeniny (sloučenin) do gastrointestinálního nebo intestinálního traktu.

Zejména popsané farmaceutické kompozice nebo kompozice, do kterých jsou zahrnuty, se mohou podávat orálně, například jako tablety, potahované tablety, dražé, pastilky, vodné nebo olejové suspenze, dispergovatelné prášky nebo granule, emulze, měkkých tobolek nebo sirupy nebo elixíry. Prostředky určené pro orální použití mohou být připraveny jakoukoliv metodou známou v oboru pro výrobu farmaceutických kompozic a takové prostředky mohou obsahovat jedno nebo více činidel vybraných ze skupiny sestávající ze sladidel, aromatizačních činidel, barviv a konzervačních činidel, aby poskytovaly farmaceuticky přijatelné a chutné přípravky. Tablety mohou obsahovat účinnou látku ve směsi s netoxickými farmaceuticky přijatelnými pomocnými látkami, které jsou vhodné pro výrobu tablet. Tyto pomocné

látky mohou být například inertní ředidla, jako je uhličitán vápenatý, uhličitán sodný, laktóza, fosforečnan vápenatý nebo fosforečnan sodný; granulační a dezintegrační činidla, například kukuřičný škrob nebo kyselina alginová; vazebná činidla, například škrob, želatina nebo akácie, a lubrikační činidla, například stearát hořečnatý, kyselina stearová nebo mastek. Tablety mohou být nepotahované nebo mohou být potahované známými technikami pro zpoždění rozpadu a adsorpce v gastrointestinálním traktu a tím k zajištění trvalého účinku po delší dobu. Například může být použita látka poskytující časové zpoždění jako je jako glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát.

Formulace pro orální podávání mohou být také prezentovány jako tvrdé želatinové kapsle, přičemž jsou účinné látky smíchány s inertním pevným ředidlem, jako je například uhličitán vápenatý, fosforečnan vápenatý nebo kaolin, nebo jako měkké želatinové kapsle, ve kterých jsou účinné složky přítomny nebo smíchány s vodou nebo olejovým médiem, jako je například arašídový olej, kapalný parafin, některé z různých bylinných extraktů, mléko nebo olivový olej.

Mohou se připravit vodné suspenze, které obsahují aktivní látky ve směsi s pomocnými látkami vhodnými pro výrobu vodných suspenzí. Takové pomocné látky zahrnují suspendující činidla, jako je například sodná sůl karboxymethylcelulózy, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, alginát sodný, tragakant polyvinylpyrrolidonová pryskyřice a arabská guma; dispergační nebo smáčecí činidla mohou být přirozeně se vyskytující fosfatidy, jako je například lecitin nebo kondenzační produkty alkylenoxidu s mastnými kyselinami, jako je například polyoxyethylen stearát nebo kondenzační produkty ethylenoxidu s alifatickými alkoholy s dlouhým řetězcem, například heptadekaethylenoxycetanol nebo kondenzační produkty ethylenoxidu s parciálními estery odvozenými od mastných kyselin a hexitolu, jako je například polyoxyethylensorbitolmonooleát nebo kondenzační produkty ethylenoxidu s parciálními estery odvozenými od mastných kyselin a anhydridů hexitolu, jako je například polyoxyethylensorbitan monooleát.

Vodné suspenze mohou také obsahovat jednu nebo více konzervačních látek, jako je například ethyl nebo n-propyl p-hydroxybenzoát, jedno nebo více barviv, jedno nebo více ochucovacích činidel nebo jedno nebo více sladidel, jako je sacharóza, glycerol, sorbitol nebo sacharin.

Olejové suspenze mohou být formulovány suspendováním účinných látek v omega-3 mastné kyselině, rostlinném oleji, jako je například arašídový olej, olivový olej,

sezamový olej nebo kokosový olej nebo v minerálním oleji, jako je kapalný parafin. Olejové suspenze mohou obsahovat zahušťovací činidlo, jako je například včelí vosk, tvrdý parafin nebo cetylalkohol.

Mohou se přidávat sladidla, jako jsou výše uvedené, a ochucovadla, aby se získal chutný orální přípravek. Tyto kompozice mohou být chráněny přidáním antioxidantu, jako je kyselina askorbová.

Dispergovatelné prášky a granule vhodné pro přípravu vodné suspenze přidáním vody poskytují účinnou látku ve směsi s dispergačním nebo smáčecím činidlem, suspenzačním činidlem a jedním nebo více konzervačními látkami. Vhodná dispergační nebo smáčecí činidla a suspenzační činidla jsou uvedena výše. Mohou být také přítomny další pomocné látky, například sladidla, ochucovadla a barviva.

Sirupy a elixíry obsahující komplex sulforafan-cyklodextrin mohou být formulovány se sladícími činidly, jako je například glycerol, sorbitol nebo sacharóza. Takové formulace mohou také obsahovat demulcentní, konzervační a/nebo ochucovací a barvicí činidla. Kapalné dávkové formy pro orální podávání mohou zahrnovat farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy a/nebo elixíry obsahující inertní ředidla běžně používaná v oboru, jako je voda. Takové kompozice mohou také obsahovat adjuvans, jako jsou smáčedla, emulgační a/nebo suspenzační činidla a sladidla, ochucovadla a/nebo parfémů.

Farmaceutické kompozice vhodné pro orální podávání mohou být přítomny v diskrétních jednotkách, z nichž každá obsahuje předem určené množství alespoň jedné terapeutické sloučeniny užitečné v předkládaném vynálezu; jako prášek nebo granule; jako roztok nebo suspenze ve vodné nebo nevodné kapalině; nebo jako emulze olej ve vodě nebo voda v oleji. Jak bylo uvedeno, mohou být takové kompozice připraveny jakoukoliv vhodnou farmaceutickou metodou, která může zahrnovat krok spojování účinné sloučeniny (sloučenin) a nosiče (které mohou tvořit jednu nebo více pomocných složek). Obecně se kompozice připravují smícháním účinné sloučeniny s kapalným nebo jemně rozptýleným pevným nosičem nebo obojím a pak, pokud je to nutné, tvarováním výrobku.

Tableta může být například připravena stlačením nebo formováním prášku nebo granulí sloučeniny, volitelně s jednou nebo více pomocnými složkami. Stlačené tablety mohou být připraveny kompresí ve vhodném stroji jako sloučenina ve volně tekoucí formě, jako je prášek nebo granule, případně smíchané s pojivem, mazivem, inertním ředidlem a/nebo povrchově aktivním/dispergujícím činidlem. Lisované

tablety mohou být vyrobeny tvářením ve vhodném stroji práškovou sloučeninou navlhčenou inertním kapalným ředidlem.

Orální podávání kombinací podle předkládaného vynálezu může zahrnovat formulace, které jsou dobře známy v oboru, za účelem prodloužení nebo trvalého dodávání léčiva do gastrointestinálního a/nebo střevního traktu libovolným počtem mechanismů. Patří mezi ně, nikoli však výlučně, uvolňování citlivé na pH z dávkové formy založené na měnícím se pH v tenkém střevě, pomalé eroze tablety nebo kapsle, zadržetí v žaludku na základě fyzikálních vlastností formulace, bioadheze dávkovací formy na slizniční výstelku střevního traktu nebo enzymatické uvolňování účinné látky z lékové formy. U některých terapeutických sloučenin použitelných v metodách, kombinacích a kompozicích podle předkládaného vynálezu je zamýšleným účinkem prodloužit časové období, během kterého se účinná léková molekula přivádí do místa působení manipulací dávkové formy. Prostředky podle předkládaného vynálezu tedy obsahují entericky potažené formulace a entericky potažené formulace s řízeným uvolňováním. Vhodné enterické potahy zahrnují acetátftalát celulózy, polyvinylacetátftalát, ftalát hydroxypropylmethylcelulózy a aniontové polymery kyseliny methakrylové a methylesteru kyseliny methakrylové.

V některých provedeních může farmaceutická kompozice zahrnovat tablety, které mohou být nepotahované nebo mohou být potahované známými technikami pro zpoždění rozpadu a absorpce v gastrointestinálním traktu a tím poskytnutí zpožděného účinku po delší dobu. Například může být použita látka poskytující časové zpoždění jako je glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát.

V dalších provedeních mohou být kompozice vytvořené touto metodou podávány parenterálně, například subkutánně, intravenózně, intramuskulárně, intrasternálně nebo infuzními technikami, ve formě sterilních injekčně aplikovatelných vodných nebo olagenních suspenzí. Sterilním injekčním přípravkem může být také sterilní injekčně aplikovatelný roztok nebo suspenze v netoxickém parenterálně přijatelném ředidle nebo rozpouštědle, jako je například roztok v 1,3-butandiolu. Mezi přijatelná vehikula a rozpouštědla, která mohou být použita, patří voda, Ringerův roztok a isotonický roztok chloridu sodného. Navíc se jako rozpouštědlo nebo suspendující médium běžně používají sterilní, fixované oleje. K tomuto účelu může být použit jakýkoliv jemný fixovaný olej, včetně syntetických mono- nebo diglyceridů. Kromě toho n-3 polynenasycené mastné kyseliny mohou být použity při přípravě injekčních přípravků.

Farmaceutické kompozice vhodné pro parenterální podávání mohou obsahovat sterilní vodné přípravky sloučeniny podle předkládaného vynálezu. Tyto přípravky mohou být podávány intravenózně, i když podávání může být také provedeno subkutánní, intramuskulární nebo intradermální injekcí nebo infuzí. Takové přípravky mohou být připraveny smícháním sloučeniny s vodou a spojením výsledného roztoku se sterilní a isotonicou krví. Injekční kompozice podle vynálezu budou obecně obsahovat od 0,01 do 10 % hmotnostních sloučeniny zde popsané.

Účinné látky mohou být také podávány injekčně jako kompozice, přičemž jako vhodný nosič může být například použit fyziologický roztok, dextróza nebo voda. Vhodná denní dávka každé účinné terapeutické sloučeniny je taková, která dosahuje relativně stejnou hladinu krevního séra, jaká byla produkována orálním podáváním, jak je popsáno výše.

Je také popsáno bukální nebo „sublingvální“ podávání, které zahrnuje pastilky nebo žvýkací gumu obsahující sloučeniny zde uvedené. Sloučeniny mohou být uloženy v ochucené bázi a akácii nebo tragantu nebo sloučeniny mohou být uloženy v pastilkách obsahujících sloučeniny v inertní bázi, jako je želatina a glycerin nebo sacharóza a akácie.

Farmaceutické kompozice jsou také vhodné pro topickou aplikaci na kůži a mohou mít formu mastí, krémů, pleťová voda, past, gelů, sprejů, prášků, želé, očních kapek, roztoků, suspenzí, aerosolů nebo olejů. Mohou být použity nosiče, které obsahují vazelínu (např. Vaseline®), lanolin, polyethylenglykoly, alkoholy a kombinace dvou nebo více z nich. Účinná sloučenina nebo sloučeniny jsou obecně přítomny v koncentraci od 0,01 do 50 % hmotn./hmotn. kompozice, jako například od přibližně 0,01 do přibližně 2 %.

Mohou být také zahrnuty bezpečná a účinná množství činidel izotonicity, včetně solí, jako je chlorid sodný a/nebo činidla, která nepodléhají elektrolytu izotonicity, jako je sorbitol a mannitol.

Rozpustnost složek kompozic může být zvýšena povrchově aktivní látkou nebo jiným vhodným společným rozpouštědlem v kompozici. Taková společná rozpouštědla zahrnují polysorbát 20, 60 a 80, polyoxyethylenové/polyoxypropylenové povrchově aktivní látky (např. Pluronic F-68, F-84 a P-103, dostupné od BASF®), cyklodextrin nebo jiné látky známé osobám se znalostmi techniky. Taková společná rozpouštědla mohou být použita v množství od přibližně 0,01 % do přibližně 2 % hmotnostních.

Farmaceuticky přijatelné pomocné látky a nosiče zahrnují všechny výše uvedené a podobně. Účinné formulace a způsoby podávání jsou v oboru dobře známy a jsou popsány ve standardních učebnicích. Viz např. Gennaro, A. R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, (Lippincott, Williams and Wilkins), 2000; Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1975; Liberman, et al., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; and Kibbe, et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients (3rd Ed.), American Pharmaceutical Association, Washington, 1999.

Při této metodě může být subjekt, který potřebuje léčbu a/nebo prevenci zde popsaných poruch a/nebo příbuzných stavů, léčen určitým množstvím vyčištěného sulforafanu podle vynálezu, přičemž množství jednotlivých složek poskytuje dávku nebo množství, které je dostatečné pro dosažení účinného množství pro léčbu nebo prevenci.

Účinné množství purifikovaného komplexu sulforafan-cyklodextrin samozřejmě závisí na řadě faktorů, jako je zvolená specifická sloučenina, způsob použití, způsob podání, hostitel, který má být léčen, a klinický stav příjemce.

Karcinogenní, tumorogenní nebo antibakteriální symptomy se považují za zlepšené, pokud se dosáhne jakéhokoli přínosu, bez ohledu na to, jak je mírný.

Dávky pro kompozice a metody poskytnuté v tomto textu mohou být stanoveny a upraveny na základě účinnosti, která je prokázána při poskytnutí chemoprotektivního nebo chemopreventativního výsledku. Navíc osoba se znalostmi techniky bude vědět, jak měřit a kvantifikovat přítomnost nebo nepřítomnost karcinogeneze nebo symptomy tumorigeneze.

Dávky pro kompozice jsou takové, které jsou účinné pro zajištění chemoprotektivního, chemopreventativního a/nebo antibakteriálního účinku.

Osobám se znalostmi techniky bude zřejmé, že dávky mohou být také stanoveny podle pokynů z Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition (1996), Appendix II, pp. 1707–1711.

Příklady uskutečnění vynálezu

Vynález bude nyní popsán v následujících příkladech.

Obecné materiály a metody

^1H a ^{13}C NMR spektra byla zaznamenána na spektrometru Oxford 400 MHz s použitím TMS jako vnitřního standardu a chemické posuny jsou uváděny v ppm.

Elektrospray ionizační hmotnostní spektrometrie (ESI-MS) byla provedena na Micromass Platform LCZ připojeném k modulu separace Waters 2695 a detektoru fotodiodového pole Water 996. GC-MS spektrometrie byla provedena na sadě Agilent 7820A/5975 MSD.

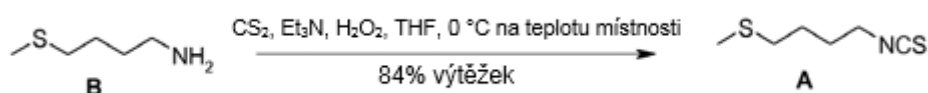
HPLC byla provedena na modulu HP 1050, kolona: Phenomenex Gemini C18, 5 μ , 110A°, 250 \times 4,6 mm. Celková doba trvání: 40 min. MeCN v H₂O + 0,1 % TFA. Průtok: 1,5 ml/min. Detektor: 244 nm (VWD).

Analýza podle Karl Fischera (obsah H₂O) byla provedena na KF coulometru 831 vybaveném stojanem Ti 703.

Všechny reakce probíhaly v atmosféře suchého dusíku a udávané výtěžky jsou izolované výtěžky. Všechna chemická činidla byla zakoupena z komerčních zdrojů a použita v dodané formě.

Příprava výchozích materiálů

Příprava 1-isothiokyanato-4-methylthiobutanu (vzorec A)



50litrová baňka s více hrdly a s kulatým dnem vybavená horním míchadlem, teplotní sondou a 1 l další nálevkou a přetlakovým proudem N₂ byla ochlazena na –10 °C v MeOH/ledové lázni a naplněna THF (EMD, reakční stupeň, 15,0 l). Byl přidán 1-amino-4-methylthiobutan (vzorec B, 1,5 kg, 12,6 mol, 1,0 ekv.) a triethylamin (1,75 l, 1,0 ekv.) a roztok se dále míchal, dokud nevychladl pod –10 °C. Po kapkách byl během 2 hodin přidáván sulfid uhličitý (755 ml, 1,0 ekv.), přičemž vnitřní teplota byla udržována pod –3 °C (teplota lázně je –20 °C), poté byl žlutozelený roztok zahřátý na teplotu 11 °C. Během 2,5 hodiny byl pomalu přidán peroxid vodíku (35 % vodný, 1224 ml, 1,0 ekv.), přičemž vnitřní teplota byla udržována mezi 11 až 18 °C (teplota

lázně byla 0 °C), což poskytlo tmavě oranžovou až červenou suspenzi s vířícími žlutými částicemi.

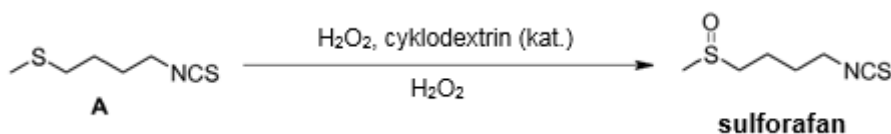
Zpracování: Po míchání přes noc byla alikvotní část zkontrolována pomocí GC (75 °C → 200 °C při rychlosti 15 °/min, potom 40 °/min na 300 °C, 2 min, udržováno: 7,73 min) a potom byla směs přenesena do pracovní stanice 50 l pomocí hadice vybavené filtrem. Směs byla zředěna 4,5 l ethylacetátu a promyta 10 % HCl (6 l), vodou (6 l) a solankou (7,5 l). Získaná organická vrstva byla usušena nad bezvodým Na₂SO₄, odfiltrována a zakoncentrována ve vakuu, čímž se získalo ~ 2 kg tmavě červeného oleje.

Destilace: Červený olej byl přenesen do baňky s kulatým dnem o objemu 2 litry (3 šarže) a připojen k zařízení Kugelrohru. V přístroji byl vytvořen vysoký podtlak (~ 40–67 Pa (0,3–0,5 torr)) a vzduchová lázeň byla zahřátá na teplotu 85 °C. Předběžná frakce (převážně ethylacetát a stopy neznámých vedlejších produktů) byla vyřazena. Po změně přijímací nádoby byla teplota lázně zvýšena na 115 °C. Bledě žlutý materiál byl destilován při teplotě 100–110 °C a okamžitě zmrzl při kontaktu se suchým ledem/acetone. Po destilaci (tři šarže) bylo získáno 1,7 kg (84% výtěžek) materiálu s 98% čistotou podle HPLC a > 99% čistotou podle GC.

¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz); δ 1,7–1,85(m, 4H), 2,2 (s, 3H), 2,55 (t, 2H), 3,56 (t, 2H)

Příklad 1

Příprava sulforafanu (1-isothiokyanato-4-methylsulfinylbutanu)



Do baňky s více hrdly s kulatým dnem o objemu 5 l, vybavené horním míchadlem, teplotní sondou a další nálevkou o objemu 500 ml byl zaveden přetlakový proud N₂. α-cyklodextrin (30 g, 0,03 mol, 0,01 ekvivalentu) byl rozpuštěn v 1 l destilované vody a odplyněn po dobu 30 minut proplachováním dusíkem. K výše uvedenému roztoku bylo přidáno 501 g (3,1 mol, 1 ekvivalent) 1-isothiokyanato-4-methylthiobutanu (vzorec A) a znovu odplyněno při 0 °C během 30 minut. K této dvoufázové reakční směsi se pomalu přidá 305 ml H₂O₂ (3,1 mol, 1 ekvivalent, 35 % vodný roztok),

přičemž se udržuje teplota mezi 0 a 2 °C. [POZNÁMKA: Peroxid byl kapán rychlostí dostatečně nízkou, aby se teplota nezvýšila nad 10 °C]. Po ukončení přidávání byla reakční směs míchána při teplotě ledové lázně po dobu přibližně 8 hodin a poté se pomalu nechala přes noc ohřát na pokojovou teplotu. Reakční směs byla přefiltrována, aby se odstranily světle žluté nerozpustné pevné látky, a pak byl filtr udržován v chladničce po ~1 hod. Na základě analytické HPLC byl surový sulforafan ~95 % čistota.

Tento materiál byl použit pro komplexační krok (příklad 2) bez dalšího zpracování/čištění.

Souhrn třech opakování

Šarže	Rozsah reakce	Čistota podle analýzy HPLC (surový produkt)	Pozorování
1	501 g	95 %	Byl přidán H ₂ O ₂ při < 2 °C
2	500 g	95,6 %	Byl přidán H ₂ O ₂ při < 4 °C
3	500 g	95,4 %	Byl přidán H ₂ O ₂ při < 2 °C

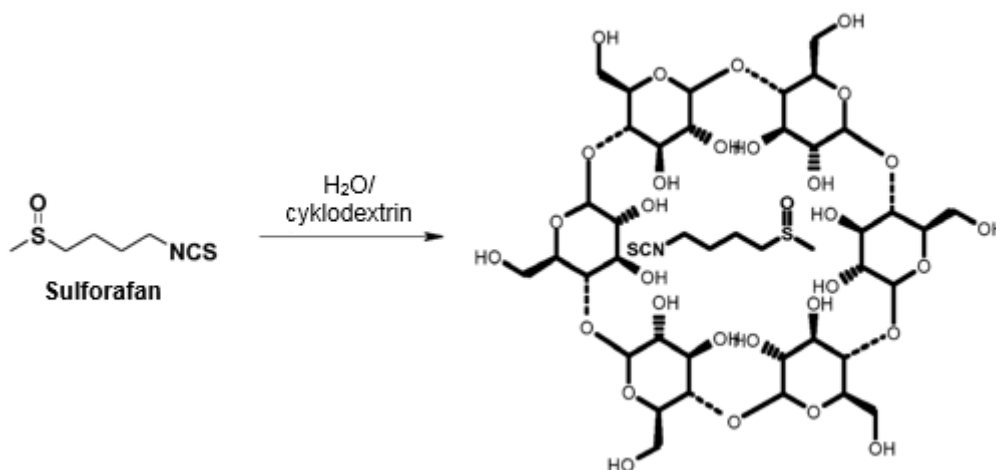
Všechny tři šarže byly provedeny ve stejném reakčním stupni a reakce probíhaly podobným způsobem z hlediska reakčního času a čistoty produktu.

¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz); δ1,90 (m, 4H), 2,58 (s, 3H), 2,75 (m, 2H), 3,60 (t, 2H).

¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz); δ130,2, 53,4, 44,5, 38,5, 29,5, 20,1

Příklad 2

Příprava komplexu sulforafan-cyklodextrin



α -cyklodextrin (Wacker CAVAMAX W6, potravinářská jakost, 3015 g, 3,1 mol, 1 ekvivalent) byl rozpuštěn v destilované vodě (8 l) ohřátím na 55 °C pod dusíkovou atmosférou. Homogenní roztok byl ochlazen ~ 25 °C za použití ledové lázně a potom odplyňován dusíkem po dobu 20 minut. Po odplynění se změnil na zakalený roztok. Vodný roztok sulforafanu byl vyjmut z chladničky (viz předchozí krok) a potom byl najednou přidán k výše zmíněnému zakalenému roztoku α -cyklodextrinu. V této fázi byla reakční teplota ~18 °C a pokračovalo se v míchání při pokojové teplotě přes noc (~16 hodin). Heterogenní reakční směs byla ochlazená na teplotu 1–2 °C za použití lázně led-methanol a míchána po dobu 3 hodin při této teplotě. Vysrážená bílá pevná látka byla filtrována a sušena přes noc za vysokého podtlaku při pokojové teplotě zakrytím filtrační nálevky latexovou vrstvou. Bílý filtrační koláč byl převeden do 10litrové rotační baňky a dále sušen při teplotě místnosti ve vysokém podtlaku, čímž bylo získáno 2,802 g komplexu (98,7 % čistota podle analýzy HPLC, 78,5 % výtěžek).

Souhrn třech opakování

Šarže	Rozsah reakce**	Čistota podle analýzy HPLC	Výtěžek*
1	550,8 g	98,5 %	78,5 %
2	549,7 g	98,6 %	76,9 %
3	549,7 g	98,7 %	73,2 %

*celkový výnos v posledních dvou krocích, **na základě 100 %

Šarže	Rozsah reakce**	Čistota podle analýzy HPLC	Výtěžek*
konverze v předchozím kroku.			

Všechny tři šarže byly prováděny téměř ve stejném rozsahu a reakce probíhaly podobným způsobem z hlediska reakčního času, výtěžku, čistoty produktu a procentuálního zatížení sulforafanu na α -cyklodextrin

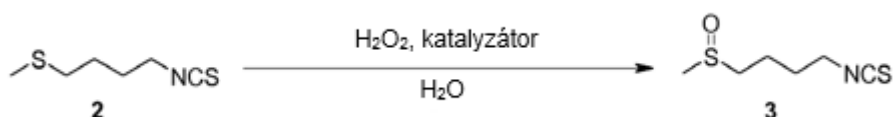
^1H NMR (D_2O , 400 MHz); δ 1,99 (br, 4H), 2,73 (s, 3H), 2,98 (br, 2H), 3,60 (m, 12H), 3,70 (br, 2H), 3,92 (m, 24H), 5,11 (d, 6H).

^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz); δ 130,05, 101,82, 81,40, 74,05, 71,98, 71,84, 60,34, 52,02, 44,94, 37,03, 29,29, 20,08.

Příklad 3

Příprava sulforafanu (1-isothiokyanato-4-methylsulfinylbutanu) s různými katalyzátory a reakčními podmínkami

Obecný postup



Do baňky s více hrdly s kulatým dnem opatřené horním míchadlem, teplotní sondou a další nálevkou byl zaveden přetlakový proud N_2 . Kyselý katalyzátor (0,001 až 0,01 ekvivalentu) byl rozpuštěn v rozpouštědle (voda, acetonitril, aceton atd.) a odplyněn po dobu 30 minut proplachováním dusíkem. K výše uvedenému roztoku byl přidán 1 ekvivalent tioetherového výchozího materiálu (2) a roztok byl znovu odplyněn po dobu 30 minut při teplotě 0–5 °C. K této dvoufázové reakční směsi byl pomalu přidáván 1 ekvivalent oxidačního činidla (H_2O_2 , *m*-CBPA apod.), přičemž teplota byla udržována mezi 0 a 10 °C. Po dokončení přidávání byla reakční směs míchána při teplotě ledové lázně po dobu 8 až 24 hodin a potom se pomalu nechala přes noc ohřát na pokojovou teplotu. Reakční směs byla přefiltrována, aby se odstranila nerozpustná pevná látka, a potom byl filtrát uložen v chladničce nebo se okamžitě použil v následujícím kroku. Na základě analýzy HPLC byla čistota surového

sulforafanu ≥ 95 %. Tento materiál byl použit pro komplexační krok bez dalšího čištění.

Oxidace sloučeniny 2 na sulforafan v různých rozpouštědlech a/nebo v přítomnosti různých katalyzátorů/kyselin je uvedena v následující tabulce spolu s reakčními podmínkami.

Reakční podmínky	H ₂ O ₂ /H ₂ O, aceton, 0 °C do RT	H ₂ O ₂ /H ₂ O, acetonitril 0 °C do RT	H ₂ O ₂ /H ₂ O 0,1 ekv. α-CD 0 °C do RT	H ₂ O ₂ /H ₂ O 0,01 ekv. α-CD 0 °C do RT	H ₂ O ₂ /H ₂ O 1,0 ekv. α-CD 0 °C do RT	H ₂ O ₂ /H ₂ O 0,05 ekv. AcOH 0 °C do RT	H ₂ O ₂ /H ₂ O 0,1 % valchařská hlinka
Čistota podle analýzy HPLC	95,6 % (3,1 % SM)	96,8 % (0,7 % SM)	96 % (1 % SM)	98 % (0,5 % SM)	77 % (21 % SM)	98,8 % (0,06 % SM)	98 % (0,06 % SM)
Výtěžek	Neizolováno	Neizolováno	Neizolováno	82 %*	Neizolováno	Neizolováno	Neizolováno
Konečná čistota	---	---	---	98 %	---	---	---
*Izolovaný výtěžek.							

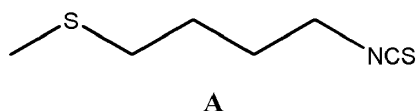
Na základě výše uvedených výsledků všechny uvedené katalyzátory vedly k podobným výsledkům, ale cyklodextrin je výhodný, protože se používá v dalším kroku komplexace ke stabilizaci sulforafanu.

Metodou HPLC bylo detekováno pouze stopové množství sulfonylové nečistoty (Erysolin).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Proces přípravy komplexu sulforafanu a cyklodextrinu nebo komplexu sulforafanu a derivátu hydroxyalkylcyklodextrinu, vyznačující se tím, že zahrnuje:

(i) reakci ve vodném rozpouštědle sloučeniny vzorce A:



s oxidačním činidlem a za přítomnosti katalyzátoru za vzniku sulforafanu;

a

(ii) smíchání sulforafanu z kroku (i) s cyklodextrinem nebo derivátem hydroxyalkylcyklodextrinu ve vodném rozpouštědle za vzniku sraženiny komplexu sulforafan-cyklodextrin nebo komplexu sulforafan-hydroxyalkylcyklodextrin;

přičemž vodným rozpouštědlem je voda a katalyzátor je vybrán z cyklodextrinu, derivátu hydroxyalkylcyklodextrinu, valchařské hlínky a organických nebo anorganických kyselin a přičemž oxidačním činidlem je peroxid vodíku nebo ve vodě rozpustná nebo mísitelná organická peroxidová kyselina nebo jejich směs.

2. Proces podle nároku 1, vyznačující se tím, že oxidační látkou je peroxid vodíku.
3. Proces podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že katalyzátorem je cyklodextrin a organické nebo anorganické kyseliny, jako je kyselina askorbová, kyselina mravenčí, kyselina octová a/nebo kyselina sírová.
4. Proces podle nároku 3, vyznačující se tím, že katalyzátorem je cyklodextrin.
5. Proces podle nároku 4, vyznačující se tím, že katalyzátorem je α -cyklodextrin.

6. Proces podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, přičemž je přítomno 0,0001 až 1,0 molárních ekvivalentů katalyzátoru (vztaženo na sloučeninu vzorce A).
7. Proces podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, přičemž v kroku (i) se teplota reakce udržuje na teplotě 25 °C nebo méně nebo 15 °C nebo méně, když se oxidační činidlo přidá k reakční směsi.
8. Proces podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že cyclodextrin použitý v kroku (ii) je vybrán z jednoho nebo více z W6 (alfa) cyclodextrinu (kruhová molekula se šesti cukry), W7 (beta) cyclodextrinu (kruhová molekula se sedmi cukry) W8 (gamma) cyclodextrinu (kruhová molekula s osmi cukry), jejich hydroxypropylových derivátů a jejich směsí.
9. Proces podle nároku 8, vyznačující se tím, že cyclodextrin použitý v kroku (ii) je α -cyclodextrin.
10. Proces podle nároku 9, vyznačující se tím, že se směs ochladí na teplotu v rozmezí – 8 °C až 10 °C.
11. Proces podle nároku 9, vyznačující se tím, že se směs ochladí na teplotu v rozmezí – 5 °C až 4 °C.
12. Proces podle nároku 9, vyznačující se tím, že molární poměr sulforafanu k cyclodextrinu ve výsledném komplexu je v rozmezí od 0,4:1 do 1:1.
13. Proces podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že tento proces zahrnuje další krok rekrystalizace výsledného komplexu.