

Kompleksy wanadu z hydrazydohydrazonami, sposób ich otrzymywania, preparaty farmaceutyczne oraz zastosowanie

Przedmiotem wynalazku są nowe kompleksy wanadu, sposób otrzymywania nowych kompleksów wanadu, preparaty farmaceutyczne z tymi kompleksami oraz zastosowanie kompleksów oraz ich kompozycji z innymi substancjami w zapobieganiu i leczeniu różnych zaburzeń i chorób z grupy zaburzeń metabolicznych i/lub związanych z aktywnością różnych fosfataz.

Zaburzenia metaboliczne są schorzeniami o różnorodnej etiologii, z których cukrzyca jest najważniejsza z punktu widzenia epidemiologii. Spowodowana może być zaburzeniami syntezy i wydzielania insuliny i/lub obniżeniem wrażliwości tkanek na działanie insuliny. Prowadzi to do zaburzeń metabolizmu węglowodanów, lipidów i białek, a w konsekwencji do wielu poważnych chorób i powikłań (np. otyłości, miażdżycy, retinopatii, nefropatii, stopy cukrzycowej) obniżających jakość życia oraz będących częstą przyczyną zgonów.

Cukrzycę leczy się przez modyfikację stylu życia oraz odpowiednią farmakoterapię. Stosuje się leki wpływające na dwie główne przyczyny cukrzycy: zaburzenia wydzielania i działania insuliny na tkanki (np. pochodne tiazolinodionu, sulfonylomocznika). Dodatkowo stosuje się leki zmniejszające wchłanianie glukozy z przewodu pokarmowego (np. akarboza).

Stosowane środki farmakologiczne obarczone są wieloma niedogodnościami, z których wynika konieczność dalszych poszukiwań leków o mniejszych działaniach niepożądanych, a większej skuteczności. Obejmuje to poszukiwanie leków wykorzystujących niedawno poznane mechanizmy działania przeciwcukrzycowego, np. polegające na hamowaniu aktywności fosfataz tyrozynowych.

Fosfatazy są liczną grupą enzymów, które hydrolizują monoestry kwasu fosforowego do grupy fosforanowej i cząsteczki z wolną grupą hydroksylową. Poprzez usuwanie grupy fosforanowej, fosfatazy białkowe zdolne są do modulowania aktywności licznych białek komórkowych, co stanowi jeden z podstawowych mechanizmów regulacyjnych komórek. W organizmie stanowią grupę kilkuset enzymów wpływających na regulację licznych szlaków przekazywania sygnałów, które warunkują przebieg podstawowych funkcji komórek, jak np. metabolizm, zdolność podziałów, śmierć komórek.

Aktywność fosfataz białkowych ma istotne znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu, a w świetle licznych badań regulacja ich aktywności może mieć istotne znaczenie terapeutyczne m.in. w zaburzeniach metabolizmu glukozy, chorobach nowotworowych, chorobach zapalnych i autoimmunologicznych, chorobach układu nerwowego (w tym neurodegeneracyjnych, zaburzeniach pamięci, różnych zaburzeniach psychicznych), chorobach układu kostnego, chorobach infekcyjnych. Udział fosfataz białkowych w regulacji licznych funkcji i układów organizmu nie ogranicza ich potencjalnego zastosowania w terapii do wymienionych w tym miejscu chorób (Xu Y., Fisher G.J., *J. Cell. Commun. Signal.*, **6** (2012) 125; Braithwaite S.P., Voronkov M., Stock J.B., Mouradian M.M., *Neurochem. Int.*, **61** (2012) 899; Braithwaite S.P., Stock J.B., Lombroso P.J., Nairn A.C., *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 106 (212) 343; Sun H., Wang Y., *Physiology (Bethesda)*, **27** (2012) 43; Pagano M.A., Tibaldi E., Gringeri E., Brunati A.M., *IUBMB Life*, **64** (2012) 27; Blunt M.D., Ward S.G., *Curr. Opin. Pharmacol.*, **12** (2012) 444.)

Od wielu lat prowadzone są intensywne prace nad biologiczną aktywnością związków wanadu. Badania prowadzone są z wykorzystaniem modeli komórkowych i zwierzęcych. Niektóre związki były również badane klinicznie. Badania te wykazały wyraźny wpływ związków wanadu na różne mechanizmy regulacyjne komórek, w tym mechanizmy związane z działaniem insuliny oraz z inhibitowaniem fosfataz białkowych.

W badaniach na komórkach wykazano, że wanad reguluje syntezę lipidów i glikogenu, hamuje lipolizę i glukoneogenezę oraz zwiększa transport glukozy do komórek. Badania te dowiodły, że związki wanadu mogą wpływać na metabolizm komórek, co może być podstawą do zastosowania tych związków w leczeniu chorób metabolicznych (Adachi Y., Sakurai H., *Chem. Pharm. Bull.*, **52** (2004) 428; Crans D.C., Yang L., Alfano J. A., Chi L.H., Jin W., Mahroof-Tahir M., Robbins K., Toloue M.M., Chan L.K., Plante A.J., Grayson R.Z., Willsky G.R., *Coord. Chem. Rev.*, **237** (2003) 13; Hamrin K., Henriksson J., *Life Sci.*, **76** (2005) 2329; Katoh A., Matsumura Y., Yoshikawa Y., Yasui H., Sakurai H., *J. Inorg. Biochem.*, **103** (2009) 567; Sakurai H., Watanabe H., Tamura H., Yasui H., Matsushita R., Takada J., *Inorg. Chim. Acta*, **283** (1998) 175; Thompson K.H., Orvig C., *J. Inorg. Biochem.*, **100** (2006) 1925; US4882171, US5266565, US5278154, US5338759, US6414029).

Badania przeprowadzone na zwierzętach z cukrzycą potwierdziły efektywność terapeutyczną związków wanadu przede wszystkim poprzez obniżenie stężenia glukozy we krwi. Dodatkowo wykazano, że efekty te związane są między innymi z hamowaniem aktywności fosfataz tyrozynowych (Crans D.C., Yang L., Alfano J. A., Chi L.H., Jin W., Mahroof-Tahir M., Robbins K., Toloue M.M., Chan L.K., Plante A.J., Grayson R.Z., Willsky

G.R., *Coord. Chem. Rev.*, **237** (2003) 13.; Gao L., Niu Y., Liu W., Xie M., Liu X., Chen Z., Li L., *Clin. Chim. Acta* **388** (2008) 89; Hamrin K., Henriksson J., *Life Sci.*, **76** (2005) 2329; Islam M.N., Kumbhar A.A., Kumbhar A.S., Zeller M., Butcher R.J., Dusane M.B., Joshi B.N., *Inorg Chem.* **49** (2010) 8237; Nilsson J., Degerman E., Haukka M., Lisensky G.C., Garribba E., Yoshikawa Y., Sakurai H., Enyedy E.A., Kiss T., Esbak H., Rehder D., Nordlander E., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (38) (2009) 7902; Sakurai H., Katoh A., Yoshikawa Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79** (2006) 1645; Thompson K.H., Orvig C., *Coord. Chem. Rev.*, **219–221** (2001) 1033; US4882171, US5266565, US5278154, US6414029).

Efekt przeciwcukrzycowego działania kompleksów wanadu, maltolanu i etylomaltolanu wanadylu, potwierdzony został u ludzi w badaniach klinicznych (Hamrin K., Henriksson J., *Life Sci.*, **76** (2005) 2329.; Sakurai H., Katoh A., Yoshikawa Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79** (2006) 1645; Scior T., Guevara-García A., Bernard P., Do Q., Domeyer D., Laufer S., *Mini-Rev. Med. Chem.*, **5** (2005) 995; Vardatsikos G., Mehdi M.Z., Srivastava A.K., *Int. J. Mol. Med.*, **24** (2009) 303.

W badaniach stosowano związki wanadu na III, IV i V stopniu utlenienia, zarówno proste sole nieorganiczne (np. VOSO_4 , VOCl_2 , NaVO_3), jak również związki kompleksowe z ligandami organicznymi oraz perokso kompleksy wanadu(V). Stosowano ligandy dwuwiązące typu OO, ON, OS, NS, NN (duża litera oznacza atom, przez który wiązany jest ligand do wanadu np. O oznacza atom tlenu), trójwiązące typu ONO oraz czterowiązące typu ONNO oraz NONN (Sakurai H., Katoh A., Yoshikawa Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79** (2006) 1645; Thompson K. H., McNeill J. H., Orvig C., *Chem. Rev.*, **99** (1999) 2561.

Na ogół, kompleksy wanadu z ligandami organicznymi są mniej toksyczne oraz wykazują lepsze właściwości regulacji procesów metabolicznych w porównaniu do nieorganicznych związków, takich jak siarczan wanadylu i wanadany.

Przykłady związków wanadu będących skutecznymi inhibitorami fosfataz białkowych opisano w literaturze: Han H., Lu L., Wang Q., Zhu M., Yuan C., Xing S., Fu X., *Dalton Trans.*, **41** (2012) 11116; Mehdi M.Z., Srivastava A.K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **440** (2005) 158; Schmid A.C., Byrne R.D., Vilar R., Woscholski R., *FEBS Lett.*, **566** (2004) 35; Tracey A.S., *J. Inorg. Biochem.*, **80** (2000) 11; oraz ujawniono w opisach patentowych: US 5,583,242. US 7,692,012 B2; GB0328157; US6432941; US8242092; US8008035; US5877210; US 5155031; US 6579540. Wykazano, że związki kompleksowe wanadu są silnymi inhibitorami fosfataz, szczególnie białkowych fosfataz tyrozynowych, takich jak PTP1B, TCPTP, PTP-MEG2, SHP-1, SHP-2, LAR. Wykazano także, że związki wanadu

mogą być także inhibitorami innych fosfataz, np. ATP-az, glukozo-6-fosfatazy czy fruktozo-2,6-bisfosfatazy.

Zdolność do hamowania aktywności fosfataz wykazano dla tej grupy związków w badaniach z użyciem izolowanych enzymów, w badaniach z użyciem komórek oraz w badaniach na zwierzętach. W badaniach prowadzonych na komórkach oraz zwierzętach wykazano, że związki te mogą wpływać na ogólny poziom fosforylacji białek oraz na różne białka regulacyjne i receptorowe oraz czynniki transkrypcyjne m.in. INS-R, Akt, GSK-3, NF-kappaB, FKHR, FKHL-1, FOXO, ERK 1/2. Prowadzi to do modulacji różnych funkcji komórek i może być podstawą do terapeutycznego zastosowania kompleksowych związków wanadu m.in. w chorobach nowotworowych, metabolicznych, zapalnych, neurodegeneracyjnych i innych. Korzystne efekty związków kompleksowych wanadu obserwowano w badaniach z użyciem komórek (w tym nowotworowych) oraz w badaniach na zwierzętach, wykazując potencjalną skuteczność terapeutyczną tej grupy inhibitorów fosfataz m.in. w cukrzycy, w nowotworach, w chorobach neurodegeneracyjnych i chorobach układu krążenia.

Szereg kompleksów wanadu z *N*-salicylideno Hydrazydami oraz Hydrazydami 1-(2-hydroksyfenylo)alkiloketonów jako trójwiązącymi ligandami ONO donorowymi zostało otrzymanych, a prace przeglądowe na ich temat zostały opublikowane (Plass, W., Coord. Chem. Rev., **255** (2011) 2378; Maurya, M. R., Coord. Chem. Rev., **237** (2003) 163; Seena E. B., Mathew N., Kuriakose M., Kurup M. R. P., Polyhedron, **27** (2008) 1455; Sreeja P. B., Kurup M. R. P., Spectrochim. Acta A, **61** (2005) 331).

Połączenia te zawierają rdzeń typu $[V^{IV}O]^{2+}$, $[V^{V}O]^{3+}$ i $[V^{V}O_2]^+$, przy czym nieznane są kompleksy wanadu(III), a kompleksy wanadu(IV) należą do rzadkości. Opisywane połączenia w zdecydowanej większości zawierają ligandy ONO donorowe, w których fragment pochodzący od *o*-hydroksybenzaldehydu lub *o*-hydroksyfenyloketonu posiada niepodstawiony pierścień aromatyczny.

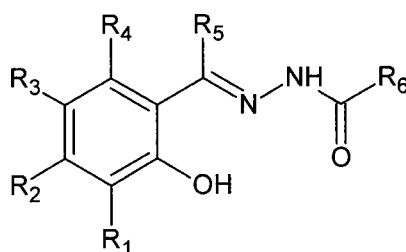
Kompleksy otrzymywano w wyniku reakcji związków wanadu(IV i V) (głównie $VOSO_4$, $VO(acac)_2$ oraz MVO_3 i M_3VO_4) z odpowiednimi ligandami, w wodzie lub rozpuszczalniku organicznym (np. DMF, EtOH, MeOH), w powietrzu lub obojętnej atmosferze (Ar, N_2).

W literaturze opisane jest potencjalne zastosowanie tych związków w katalizie i utlenianiu związków organicznych (Monafared H.H., Bikas R., Mayer P., Inorg. Chim. Acta, **363** (2010) 2574; Maurya M. R., Agarwal S., Bader C., Ebel M., Rehder D., Dalton Trans., (3) (2005) 537).

Przedmiotem wynalazku są kompleksy wanadu(III, IV i V) z hydrazydohydrazonami, które do tej pory nie zostały opisane w literaturze ani ujawnione w zgłoszeniach patentowych, sposób syntezy oraz zastosowania w zapobieganiu i leczeniu zaburzeń i chorób metabolicznych i/lub związanych z aktywnością fosfataz.

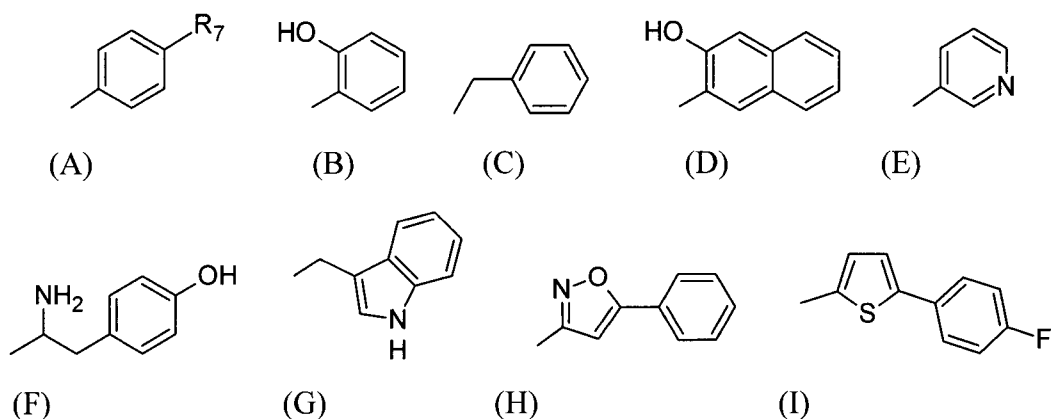
Zgodnie z wynalazkiem kompleksy wanadu są zdefiniowane wzorem ogólnym $M[VX(ONO)_y(L)_n] \cdot mS$, gdzie:

- X oznacza atom tlenu lub jest nieobecny
- L oznacza L_1 lub L_2 , przy czym:
 - L_1 oznacza anion fluorowca lub obojętną lub zdeprotonowaną cząsteczkę rozpuszczalnika wybranego z grupy zawierającej alkohole C_1-C_{12} , korzystnie alkohol etylowy lub alkohol metylowy i/lub wodę;
 - L_2 oznacza obojętny lub anionowy ligand NN, NO lub OO-donorowy wybrany z grupy zawierającej: polipirydyny, korzystnie 2,2'-bipirydynę (bpy), 1,10-fenantrolinę (phen); pirony, korzystnie zdeprotonowany 3-hydroksy-2-metylo-4-piron (mal); chinoliny, korzystnie zdeprotonowaną 8-hydroksychinolinę (quin⁻) lub kwasy pirydynokarboksyłowe, korzystnie zdeprotonowany kwas 2-pikolinowy;
 - przy czym gdy X jest nieobecny to $y = 2$, a $n = 0$,
 - zaś gdy X jest obecny to $y = 1$, przy czym gdy $L=L_1$ to n oznacza 1 albo 2, a gdy n oznacza 2 to L_1 są takie same lub różne, zaś gdy $L=L_2$ to n oznacza 1,
 - S oznacza obojętną cząsteczkę rozpuszczalnika wybranego z grupy zawierającej alkohole C_1-C_4 , wodę lub kwas siarkowy;
 - m zmienia się w zakresie od 0 do 4,
 - M może być nieobecny, a gdy jest obecny to oznacza: jednododatni kation metalu alkalicznego, korzystnie Na^+ , K^+ ; albo kation amonowy albo kation alkiloamoniowy, korzystnie Me_4N^+ , Et_4N^+ ;
 - ONO, gdzie litery O i N oznaczają atom, przez który wiązany jest ligand do wanadu, oznacza trójwiązący ligand o wzorze ogólnym 1



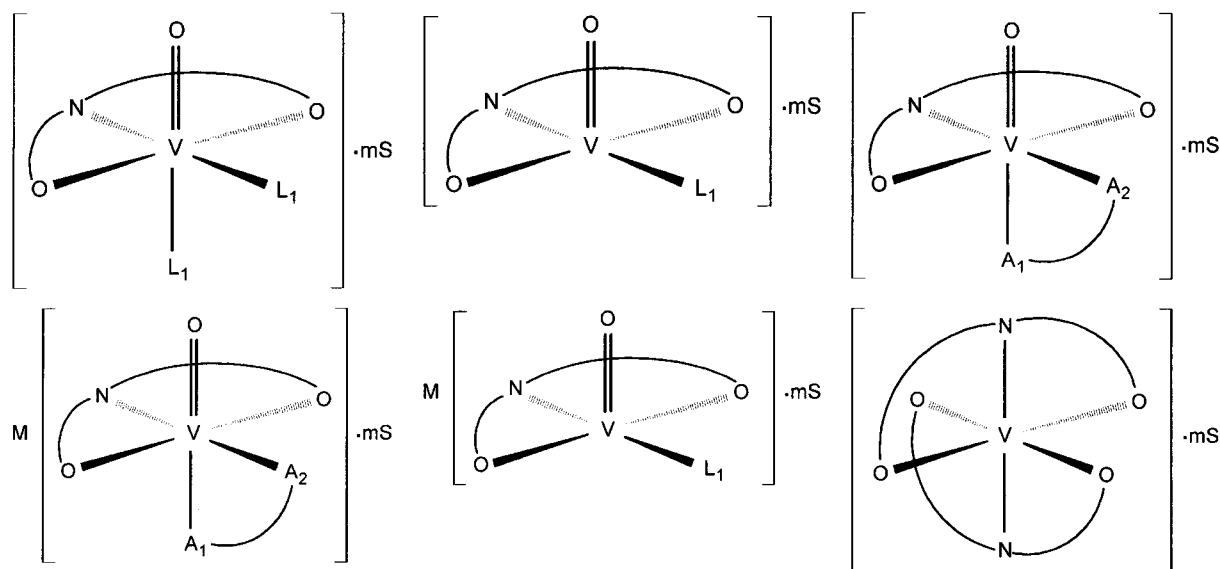
wzór 1

w formie ketonowej lub enolowej, obojętny lub zdeprotonowany, w którym R_1, R_2, R_3, R_4 niezależnie oznaczają atom wodoru, fluoru, chloru, bromu, jodu lub grupę SO_3 , hydrokso, nitro, alkoksy, aryloksy, dialkiloamino, alkilową lub arylową, przy czym przynajmniej jeden z podstawników R_1, R_2, R_3, R_4 jest różny od atomu wodoru, R_5 niezależnie oznacza atom wodoru, grupę alkilową lub arylową, R_6 oznacza grupę wybraną z:



gdzie podstawnik R_7 niezależnie oznacza grupę hydrokso, nitro, alkoksy, aryloksy, alkilową lub atom wodoru, fluoru, chloru, bromu, jodu.

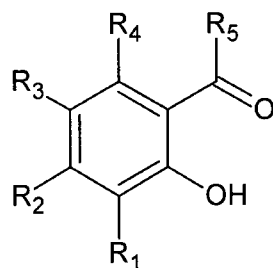
Kompleksy według wynalazku posiadają budowę zdeformowanej piramidy lub bipiramidy tetragonalnej (A_1, A_2 są to atomy donorowe liganda L_2 , które niezależnie oznaczają atom azotu lub atom tlenu).



Sposób otrzymywania kompleksów wanadu zależy od rodzaju liganda, stopnia utlenienia wanadu oraz medium reakcyjnego. Kompleksy otrzymuje się w reakcji

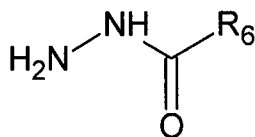
dwuetapowej z izolacją lub/i bez izolacji hydrazydohydrazonu, w warunkach beztlenowych lub w atmosferze powietrza.

Zgodnie z wynalazkiem pierwszy etap syntezy obejmuje reakcję kondensacji aldehydu lub ketonu o wzorze 2



Wzór 2

w którym R_1 , R_2 , R_3 , R_4 i R_5 mają wyżej podane znaczenie, z hydrazidem o wzorze 3



Wzór 3

w którym R_6 ma wyżej podane znaczenie. Reakcję kondensacji aldehydu lub ketonu z hydrazidem prowadzi się przy stosunku molowym 1:1 lub przy nadmiarze stechiometrycznym jednego z reagentów. Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku, którym jest alkohol C_1 - C_{12} lub woda lub roztwór wodno-alkoholowy, powstały przez zmieszanie w dowolnym stosunku alkoholu C_1 - C_{12} i wody.

W drugim etapie produkt kondensacji poddaje się reakcji kompleksowania z użyciem wyjściowego kompleksu wanadu: VO_4 , $VO(acac)_2$, $VOCl_2$ lub też $V(acac)_3$, z dodatkiem lub bez dodatku czynnika deprotonującego, którym jest amoniak, alkiloamina lub aryloamina. Reakcję kompleksowania prowadzi się przy stosunku molowym 1:1:1 wanadu do aldehydu (ketonu) i hydrazidu w przypadku kompleksów wanadu(IV) i wanadu(V) oraz przy stosunku molowym 1:2:2 wanadu do aldehydu (ketonu) i hydrazidu w przypadku kompleksów wanadu(III). Reakcję kompleksowania również można prowadzić przy nadmiarze lub niedomiarze stechiometrycznym wanadu.

Produkty reakcji wytrącają się samoistnie lub po wprowadzeniu dodatkowego czynnika kompleksującego: obojętnego lub anionowego liganda L_2 (tzw. koliganda) dwuwiążącego NN, NO, czy też OO-donorowego. Koligand L_2 wprowadza się przy stosunku molowym koliganda do wanadu 1:1. Koligand można również wprowadzić w nadmiarze lub niedomiarze stechiometrycznym w stosunku do wanadu.

Wszystkie etapy syntezy prowadzi się w zakresie temperatur -130 do $260^\circ C$ oraz w zakresie ciśnień od $0,01$ do 1 MPa, czyli w warunkach temperatury i ciśnienia, w których

mieszanina reakcyjna występuje w postaci roztworu lub zawiesiny. Najkorzystniej jest prowadzić te reakcje w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod ciśnieniem atmosferycznym.

Modyfikacją opisaną metody jest wydzielenie ze środowiska reakcji liganda otrzymanego w pierwszym etapie syntezy i następnie użycie go jako substratu w etapie drugim przy zachowanych warunkach reakcji etapu drugiego, opisanego powyżej.

Przez odpowiednie kombinacje wspomnianych parametrów oraz stosowanie koliganda otrzymano z dobrą wydajnością kompleksy będące przedmiotem wynalazku.

Wybrane przykłady otrzymanych kompleksów zebrano w Tabeli 1. Podstawniki R odpowiadają numeracji przedstawionej we wzorze 1, a R₆ oznacza grupę wybraną z grup A-I. Dla wszystkich kompleksów R₄=R₅=H.

Tabela 1.

R ₁	R ₂	R ₃	R ₆ (A-I)	R ₇	L ₁ , L ₂	mS
Kompleksy typu [VO(ONO)(L ₁)(L ₁)]·mS						
Cl	H	Cl	C	-	L ₁ = EtOH L ₁ = EtO ⁻	-
H	H	OCH ₃	C	-	L ₁ = EtOH L ₁ = EtO ⁻	-
Br	OCH ₃	Br	C	-	L ₁ = EtOH L ₁ = EtO ⁻	-
Kompleksy typu [VO(ONO)(L ₁)]·mS						
OCH ₃	H	Br	E	-	L ₁ = H ₂ O	-
Br	H	Cl	E	-	L ₁ = H ₂ O	-
H	H	NO ₂	E	-	L ₁ = H ₂ O	-
^t Bu	H	^t Bu	E	-	L ₁ = H ₂ O	-
H	H	OH	E	-	L ₁ = H ₂ O	-
OH	H	H	E	-	L ₁ = H ₂ O	-
H	H	OCH ₃	E	-	L ₁ = H ₂ O	0,5H ₂ O
H	H	NO ₂	B	-	L = EtO ⁻	-
OH	H	H	C	-	L = EtO ⁻	-
H	H	Cl	B	-	L = EtO ⁻	-
H	H	NO ₂	C	-	L = EtO ⁻	1H ₂ O
OH	H	H	D	-	L = OH ⁻	1H ₂ O

Kompleksy typu [VO(ONO)(L ₂)]·mS						
H	H	Br	A	OH	L ₂ = phen	2H ₂ O
H	H	Cl	A	OH	L ₂ = phen	2H ₂ O
OCH ₃	H	Br	A	OH	L ₂ = phen	2H ₂ O
Br	H	Cl	A	OH	L ₂ = phen	1H ₂ O
Cl	H	Cl	A	OH	L ₂ = phen	1H ₂ O
H	H	Br	A	OCH ₃	L ₂ = phen	-
H	Et ₂ N	H	A	Cl	L ₂ = phen	1H ₂ O
H	H	Br	A	^t Bu	L ₂ = phen	0,5H ₂ O
^t Bu	H	^t Bu	A	H	L ₂ = bpy	1MeOH
^t Bu	H	^t Bu	A	H	L ₂ = mal ⁻	1EtOH
Kompleksy typu M[VO(ONO)(L ₂)]·mS						
H	H	SO ₃	A	OH	L ₂ = phen	4H ₂ O
H	H	SO ₃	A	OCH ₃	L ₂ = phen	4H ₂ O
Kompleksy typu M[VO(ONO)(L)]·mS						
H	H	SO ₃	C	-	L = OH ⁻	-
H	H	SO ₃	D	-	L = EtO ⁻	1H ₂ SO ₄
Kompleksy typu [V(ONO) ₂]·mS						
H	H	Br	A	NO ₂	-	-
H	H	Br	I	-	-	-
H	H	Br	G	-	-	-
H	H	Br	H	-	-	-
OCH ₃	H	Br	C	-	-	-
H	Et ₂ N	H	C	-	-	-
H	H	Br	A	Cl	-	1H ₂ O

Kolejnym aspektem wynalazku są preparaty farmaceutyczne do stosowania w medycynie i weterynarii, zawierające kompleksy według wynalazku oraz farmaceutycznie dopuszczalne substancje pomocnicze. Preparaty mogą mieć formę stałą lub płynną i mogą być przeznaczone do podawania doustnego, parenteralnego, transdermalnego i wziewnego.

Preparaty według wynalazku, poza kompleksami wanadu, mogą zawierać dodatkowe substancje terapeutyczne o odpowiednim działaniu, jak również witaminy, sole mineralne, wyciągi roślinne i suplementy diety.

Wynalazek obejmuje również zastosowanie wyżej zdefiniowanych kompleksów wanadu(III, IV i V) do wytwarzania produktów farmaceutycznych do zapobiegania i leczenia zaburzeń i chorób metabolicznych i/lub związanych z aktywnością fosfataz.

Korzystnie kompleksy wanadu według wynalazku stosuje się do wytwarzania preparatów do zapobiegania i leczenia cukrzycy, nieprawidłowej tolerancji glukozy oraz otyłości.

Korzystnie kompleksy wanadu stosuje się do wytwarzania preparatów hamujących aktywność fosfataz białkowych, najkorzystniej fosfataz tyrozynowych. Kompleksy hamujące aktywność fosfataz, w tym fosfataz tyrozynowych, mogą być stosowane w zapobieganiu i leczeniu zaburzeń metabolizmu glukozy, w zapobieganiu i leczeniu chorób nowotworowych, chorobach zapalnych i autoimmunologicznych, chorobach układu nerwowego, w tym neurodegeneracyjnych, zaburzeniach pamięci, zaburzeniach psychicznych, chorobach układu kostnego, chorobach infekcyjnych oraz innych jednostkach chorobowych, w których hamowanie aktywności fosfataz może przynieść korzystny efekt profilaktyczny i/lub terapeutyczny.

Kompleksy stosuje się samodzielnie lub w połączeniu z dopuszczalnymi farmaceutycznie nośnikami, takimi jak np. woda, alkohol, glikol propylenowy, pochodne celulozy, skrobia.

Wynalazek obejmuje związki, których działanie polega na uwrażliwianiu narządów docelowych na działanie insuliny, nasilających działanie, naśladujących, bądź zastępujących insulinę. Związki te powodują również wzrost syntezy i/lub wydzielania insuliny przez komórki beta trzustki. Związki według wynalazku wykazują także działanie polegające na hamowaniu aktywności różnych fosfataz. Odpowiednie modulowanie związków według wynalazku może być skuteczną strategią prewencyjną i terapeutyczną.

Kompleksy wanadu otrzymane sposobem według wynalazku wykazują wpływ na metabolizm, co zostało wykazane w badaniach na komórkach głównych narządów związanych z mechanizmami patogenetycznymi cukrzycy typu 2 oraz wykazują wpływ na hamowanie aktywności fosfatazy tyrozynowej PTP1B, co zostało wykazane w badaniach z użyciem ludzkiego, rekombinowanego enzymu.

Przeprowadzono badania wpływu kompleksów wanadu na zużycie glukozy przez mioocyty (komórki C2C12), hepatocyty (komórki HepG2) i adipocyty (komórki 3T3-L1). Efektywność kompleksów porównano z działaniem maltolanu wanadyli ($\text{VO}(\text{mal})_2$), którego silne działanie przeciwcukrzycowe jest szeroko opisane w literaturze.

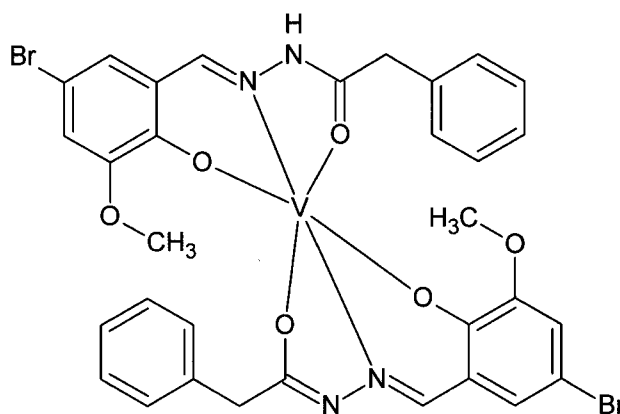
Wykazanie hamującego wpływu badanych związków na aktywność PTP1B pozwala założyć takie samo działanie tych związków wobec innych fosfataz. Wynika to z opisanych w literaturze podobieństw strukturalnych różnych fosfataz oraz mechanizmów działania związków wanadu.

Wynalazek został bliżej przedstawiony w przykładach.

Przykład 1.

Kompleks typu $[V^{III}(ONO)_2] \cdot mS$

$R_1 = MeO$, $R_2, R_4, R_5 = H$, $R_3 = Br$, $R_6 = \text{podstawnik C}$, $m = 0$

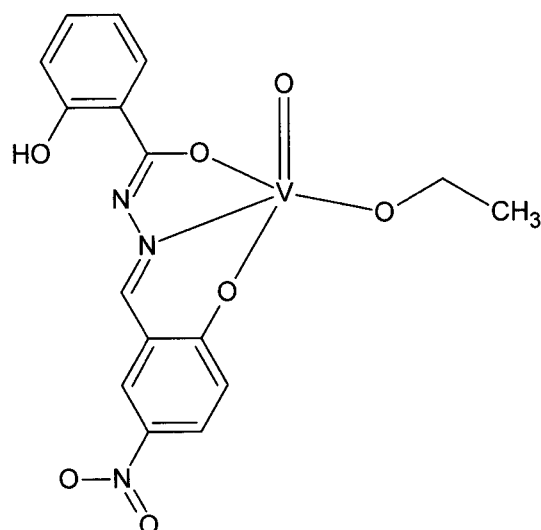


Aldehyd 5-bromo-3-metoksyalicylowy (695 mg, 3,00 mmol), hydrazyd kwasu fenylloctowego (451 mg, 3,00 mmol) oraz EtOH (28 ml) ogrzewano do wrzenia w atmosferze Ar pod chłodnicą zwrotną przez około 10 min. uzyskując żółty roztwór z białym osadem. Następnie dodano stałego $[V(acac)_3]$ (522 mg, 1,50 mmol) i ogrzewano dalej do wrzenia przez około 25 min. Początkowo mieszanina stała się brązowa, po czym wytrącił się produkt. Osad odsączono, przemyto dwukrotnie EtOH i wysuszono na powietrzu. Wydajność: 487 mg, 41,9%. Analiza elementarna: Obliczono dla $C_{32}H_{27}Br_2N_4O_6V$: C, 49,64; H, 3,51; N, 7,24%. Znaleziono: C, 49,24; H, 3,64; N, 7,09%. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{CN(imina)}$ 1592s. Moment magnetyczny: $\mu_{ef} = 2.7 \mu_B$.

Przykład 2

Kompleks typu $[V^VO(ONO) L_1] \cdot mS$

$R_1, R_2, R_4, R_5 = H$, $R_3 = NO_2$, $R_6 = \text{podstawnik B}$, $L_1 = EtO^-$ $m = 0$



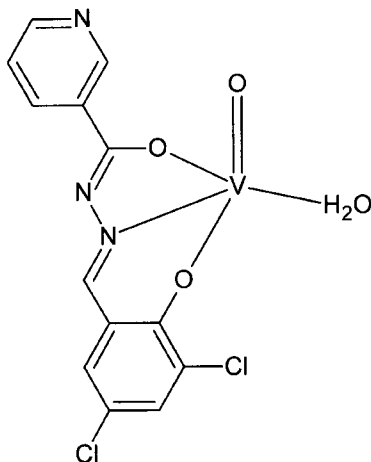
Aldehyd 5-nitrosalicylowy (500 mg; 3,00 mmol), hydrazyd kwasu salicylowego (457 mg; 3,00 mmol) oraz 40 ml EtOH ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez około 10 min. Następnie dodano $\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (665 mg; 3,00 mmol) a ogrzewanie do wrzenia kontynuowano dalej przez około 90 min. Klarowny roztwór pozostawiono do krystalizacji na około 2 dni. Produkt odsączono i przemyto dwukrotnie niewielką ilością zimnego EtOH. Wydajność: 843 mg, 68,0%. Analiza elementarna: Obliczono dla $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_7\text{V}$: C, 46,73; H, 3,43; N, 10,22%. Znaleziono: C, 46,58; H, 3,66; N, 10,08%. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{CN}(\text{imina})}$ 1608s, 1623s; ν_{VO} 968s. Moment magnetyczny: preparat diamagnetyczny.

Dane krystalograficzne: układ trójskośny, grupa przestrzenna $P-1$, $a = 7,4393(4)$, $b = 8,6931(5)$, $c = 13,2880(8)$ Å, $\alpha = 88,914(5)$, $\beta = 80,414(5)$, $\gamma = 82,214(5)^\circ$, $V = 839,53(8)$ Å³, $T = 293(2)$ K, $Z = 2$, $D_c = 1,627$ Mg m⁻³, $\mu = 0,638$ mm⁻¹, 8897 refleksy zmierzone, 2556 niezależne ($R_{\text{int}} = 0,0457$), 2187 obserwowane [$I > 2\sigma(I)$]. $R_1 = 0,1389$; $wR_2 = 0,4652$ [dla 2187 refleksów obserwowanych].

Przykład 3.

Kompleks typu $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{ONO})\text{L}_1] \cdot m\text{S}$

$R_2, R_4, R_5 = \text{H}$, $R_1, R_3 = \text{Cl}$, $R_6 = \text{podstawnik E}$, $L_1 = \text{H}_2\text{O}$ $m = 0$

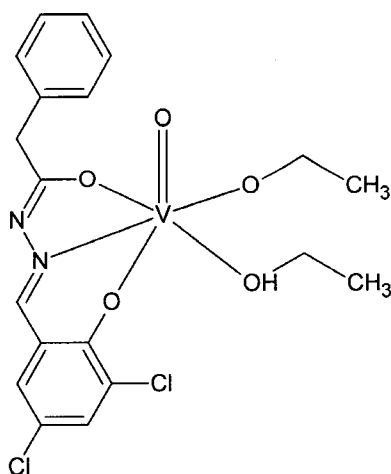


Aldehyd 3,5-dichlorosalicylowy (573 mg, 3,00 mmol) i hydrazyd kwasu nikotynowego (411 mg, 3,00 mmol) oraz 50 ml EtOH ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez około 15 minut w atmosferze beztlenowej (pod Ar). Zaobserwowano powstanie żółtego roztworu. Następnie dodano VO(acac)₂ (795 mg, 3,00 mmol) i układ nadal ogrzewano do wrzenia przez około 60 minut w atmosferze beztlenowej. W tym czasie wytrącił się pomarańczowy związek, który następnie odsączono, przemyto dwukrotnie EtOH i wysuszono na powietrzu. Wydajność: 938 mg, 80,0%. Analiza elementarna: Obliczono dla C₁₃H₉Cl₂N₃O₄V: C, 39,72; H, 2,31; N, 10,69%. Znaleziono: C, 40,12; H, 2,18; N, 10,67%. IR (KBr, cm⁻¹): ν_{CN(imina)} 1613s; ν_{VO} 882s. Moment magnetyczny: μ_{ef} = 1.3 μ_B.

Przykład 4.

Kompleks typu [V^VO(ONO)(L₁)₂]·mS

$R_2, R_4, R_5 = H, R_1, R_3 = Cl, R_6 = \text{podstawnik } C, L_1 = EtOH, i EtO, m = 0$



Aldehyd 3,5-dichlorosalicylowy (717 mg, 3,75 mmol), hydrazyd kwasu fenylloctowego (564 mg; 3,75 mmol) i 125 ml EtOH ogrzewano do wrzenia przez około 15 min. pod chłodnicą zwrotną w atmosferze Ar uzyskując żółty roztwór. Następnie dodano stałego [VO(acac)₂]

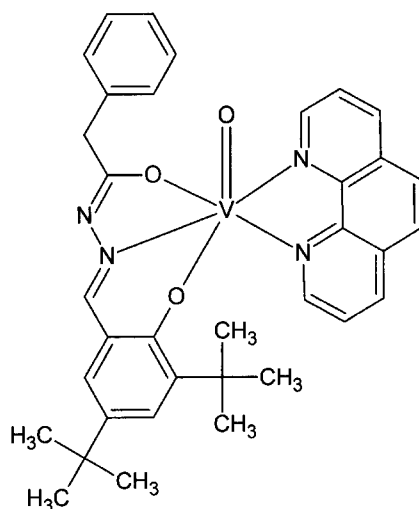
(994 mg, 3,75 mmol) i kontynuowano ogrzewanie do wrzenia przez około 60 min. Żółtobrazowy roztwór zatężono następnie do około 50 ml i pozostawiono do ochłodzenia. Brązowy osad preparatu odsączono, przemyto dwukrotnie EtOH i wysuszono na powietrzu. Wydajność 1.04 g. Wydajność: 1040 mg, 72,3%. Analiza elementarna: Obliczono dla $C_{19}H_{21}Cl_2N_2O_5V$: C, 47,62; H, 4,42; N, 5,85%. Znaleziono: C, 47,27; H, 4,27; N, 5,82%. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{CN(imina)}$ 1609s; ν_{VO} 973s, 954m. Moment magnetyczny: preparat diamagnetyczny.

Dane krystalograficzne: układ rombowy, grupa przestrzenna $Pna2_1$, $a = 38,045(5)$, $b = 7,608(5)$, $c = 15,221(5)$ Å, $V = 4406(3)$ Å³, $T = 293(2)$ K, $Z = 4$, $D_c = 1,445$ Mg m⁻³, $\mu = 0,724$ mm⁻¹, 14347 refleksów zmierzonych, 7820 niezależnych ($R_{int} = 0,0243$), 5327 obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]. $R_1 = 0,0366$; $wR_2 = 0,072$ [dla 5327refleksów obserwowanych].

Przykład 5

Kompleks typu $[V^{IV}O(ONO)(L_2)] \cdot mS$

$R_2, R_4, R_5 = H$, $R_1, R_3 = t-Bu$, $R_6 = \text{podstawnik } C$, $L_2 = phen$, $m = 0$



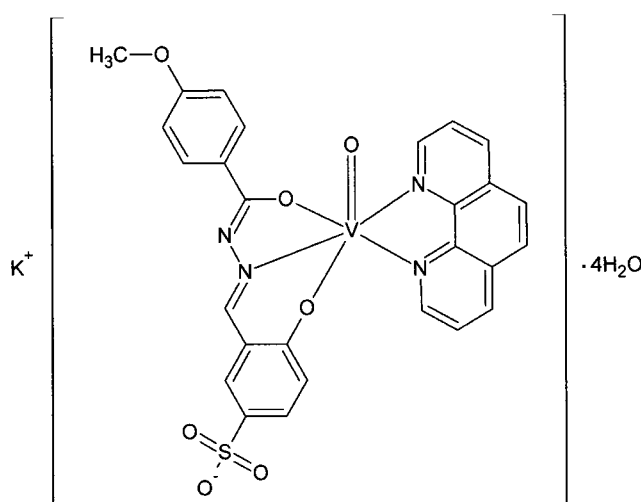
Aldehyd 3,5-diterbutylosalicylowy (254 mg; 1,50 mmol), hydrazyd kwasu fenylloctowego (227 mg; 1,5 mmol) i 25 ml EtOH ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotna w atmosferze Ar przez około 15 min. Do powstałego klarownego roztworu dodano $[VO(acac)_2]$ (398 mg; 1,50 mmol) a mieszaninę ogrzewano następnie do wrzenia przez około 40 min. Do ciemnożółtego roztworu dodano 1,10-fenantrolinę (271 mg; 1,50 mmol) i kontynuowano ogrzewanie do wrzenia przez około 10 min. Rozpuszczalnik odparowano do około 12 ml i oziębiono w lodzie. Utworzone na następny dzień kryształy odsączono, przemyto dwukrotnie EtOH i wysuszono na powietrzu. Wydajność: 346 mg, 37,4%. Analiza elementarna: Obliczono dla $C_{35}H_{38}N_4O_3V$: C, 68,28; H, 6,55; N, 9,10%. Znaleziono: C, 67,34; H, 5,62; N, 9,42%. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{CN(imina)}$ 1625s; ν_{VO} 953s. Moment magnetyczny: $\mu_{ef} = 1.7 \mu_B$.

Dane krystalograficzne: układ jednoskośny, grupa przestrzenna $P2_1/c$, $a = 14,9200(3)$, $b = 16,2740(3)$, $c = 19,9320(3)$ Å, $\beta = 130.2810(10)^\circ$, $V = 3692,08(12)$ Å³, $T = 293(2)$ K, $Z = 4$, $D_c = 1,100$ Mg m⁻³, $\mu = 0,303$ mm⁻¹, 30452 refleksy zmierzone, 8445 niezależnych ($R_{int} = 0,0351$), 6015 obserwowanych [$I > 2\sigma(I)$]. $R_1 = 0,0937$; $wR_2 = 0,2649$ [dla 6015 refleksów obserwowanych].

Przykład 6

Kompleks typu $M[V^{IV}O(ONO)(L_2)] \cdot mS$

$M = K^+$, $R_1, R_2, R_4, R_5 = H$, $R_3 = SO_3$, $R_6 = \text{podstawnik A}$, $R_7 = MeO$, $L_2 = phen$, $m = 4$, $S = H_2O$



Sól potasowa aldehydu 5-sulfosalicylowego (367 mg; 1,50 mmol), 4-metoksybenzhydrazyd (250 mg; 1,50 mmol) i EtOH (45 ml) ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną w atmosferze Ar przez około 20 min. Następnie do jasnożółtego roztworu dodano $[VO(acac)_2]$ (378 mg; 1,50 mmol) i kontynuowano ogrzewanie do wrzenia przez około 20 min. Do brązowego roztworu dodano 1,10-fenantrolinę (271 mg; 1,50 mmol). Czerwony roztwór zatężono do ok. 50% objętości i pozostawiono do ochłodzenia. Powstający pomarańczowy osad odsączono, przemyto dwukrotnie EtOH i wysuszono na powietrzu. Wydajność: 599 mg; 56,6%. Analiza elementarna: Obliczono dla $C_{27}H_{29}KN_4O_{11}SV$: C, 45,96; H, 3,86; N, 7,94; S, 4,54%. Znaleziono: C, 45,65; H, 3,70; N, 7,83; S, 4,40%. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu_{CN(\text{imina})}$ 1608s; ν_{VO} 961s. Moment magnetyczny: $\mu_{ef} = 1,3 \mu_B$.

Przykład 7.

Badania wpływu kompleksów wanadu na zużycie glukozy przez miocyty, hepatocyty, adipocyty.

Hodowle komórkowe

Miocyty linii komórkowej C2C12 hodowane były w medium hodowlanym: DMEM, 10% płodowej surowicy cielęcej oraz 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Hodowle oraz eksperymenty prowadzono w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Fibroblasty linii komórkowej 3T3-L1 hodowane były w medium hodowlanym: DMEM, 10% surowicy cielęcej oraz 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Hodowle oraz eksperymenty prowadzono w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Hepatocyty linii komórkowej HepG2 hodowane były w medium hodowlanym: EMEM, 10% płodowej surowicy cielęcej oraz 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Hodowle oraz eksperymenty prowadzono w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Zużycie glukozy

Komórki linii komórkowej C2C12 w ilości 20 tysięcy nanoszone były w medium hodowlanym do dołków mikroplętek 96-dołkowych. Po 3 dniach rozpoczynano proces różnicowania komórek przez dodatek medium różnicującego (DMEM, 2% surowicy końskiej oraz 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny). Po 24 godzinach medium wymieniano na medium różnicujące. W ósmym dniu od naniesienia komórek prowadzono eksperymenty wpływu związków wanadu na zużycie glukozy.

Po odrzuceniu medium różnicującego, komórki były preinkubowane 2 godziny w medium eksperymentalnym (DMEM z 16 mmol/dm³ glukozy, 1% albuminy wołowej oraz 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny). Następnie medium to zastępowane było nową porcją medium eksperymentalnego, do którego dodawane były stężone roztwory badanych związków w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) z 1% BSA. Eksperymenty prowadzono bez lub z dodatkiem ludzkiej, rekombinowanej insuliny w stężeniu końcowym 34,5 nmol/dm³. Po wymieszaniu zawartości prowadzono inkubację przez 24 godziny. Po tym czasie zawartość mikroplętek mieszano i pobierano medium do badania stężenia glukozy.

Komórki linii 3T3-L1 w ilości 10 tysięcy nanoszone były w medium hodowlanym do dołków mikroplętek 96-dołkowych opłaszczonych polilizyną. Po osiągnięciu konfluencji rozpoczynano proces różnicowania komórek do adipocytów przez wymianę medium na medium hodowlane z dodatkiem 1 µmol/dm³ deksametazonu i 0,5 mmol/dm³ 3-isobutyl-1-metyloksantyny. Po 48 godzinach inkubacji medium wymieniano na medium hodowlane z dodatkiem 10 µg/ml ludzkiej, rekombinowanej insuliny. Po godzinie do dołków mikroplętki dodawano stężone roztwory badanych związków w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Po wymieszaniu zawartości prowadzono inkubację przez 24 godziny.

Po tym czasie zawartość mikroplętek mieszano i pobierano medium do badania stężenia glukozy.

Komórki linii HepG2 w ilości 20 tysięcy nanoszone były w medium hodowlanym do dołków mikroplętek 96-dołkowych. Po 24 godzinach inkubacji do dołków mikroplętki dodawano stężone roztwory badanych związków w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Eksperymenty prowadzono z ludzką, rekombinowaną insuliną w stężeniu końcowym $34,5 \text{ nmol/dm}^3$. Po wymieszaniu zawartości prowadzono inkubację przez 24 godziny. Po tym czasie zawartość mikroplętek mieszano i pobierano medium do badania stężenia glukozy.

Oznaczanie stężenia glukozy

Stężenie glukozy w medium po inkubacji komórek z badanymi związkami oznaczano metodą oksydazową z detekcją fluorymetryczną w płytkach 384-dołkowych. Do badanej próbki dodawano równą objętość odczynnika 0,4 U/ml peroksydazy, 4 U/ml oksydazy glukozy oraz $200 \text{ mikromol/dm}^3$ 10-acetyl-3,7-dihydroksyfenoksazyny w 50 mmol/dm^3 buforze potasowo-fosforanowym pH 7,4. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C prowadzono pomiar intensywności fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 530 nm i emisji 580 nm. Stężenie glukozy obliczano z krzywej wzorcowej. Zużycie glukozy przez komórki obliczano jako różnicę stężenia glukozy w medium eksperymentalnym a medium po inkubacji związków z komórkami.

Komórki mięśniowe są głównym narządem odpowiadającym za zużywanie glukozy w organizmie i regulującym stężenie glukozy we krwi, a także są istotnym narządem efektorowym w działaniu różnych leków przeciwcukrzycowych. Wpływ związków będących przedmiotem wynalazku na zużycie glukozy zbadano z wykorzystaniem komórek mięśniowych (C2C12) oraz dodatkowo adipocytów (3T3-L1) i hepatocytów (HepG2) i porównano z wpływem rosiglitazonu, stosowanego w terapii cukrzycy typu 2 oraz wpływem maltolanu wanadyli, $\text{VO}(\text{mal})_2$, o udokumentowanym silnym działaniu (Tabele 2, 3 i 4). Zużycie glukozy wyrażono w odniesieniu do kontroli nie zawierającej związków wanadu.

Tabela 2. Wpływ kompleksów wanadu (50 mikromol/dm^3) oraz rosiglitazonu (50 mikromol/dm^3) na zużycie glukozy przez komórki C2C12 w obecności ($34,5 \text{ nanomol/dm}^3$) i nieobecności ludzkiej, rekombinowanej insuliny.

Kompleks	Wartościowość wanadu	Podstawniki we wzorze 1, R_6 grupy A-I	Zużycie glukozy (%)	
			Bez insuliny	Z insuliną

[V(ONO) ₂]	III	R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₅ = H R ₃ = Br R ₆ =B	317	267
[VO(ONO)(phen)]•2H ₂ O	IV	R ₁ =R ₃ = Cl R ₂ =R ₄ =R ₅ = H R ₆ = A R ₇ =OH	216	232
[VO(ONO)(OC ₂ H ₅)]	V	R ₁ =OH R ₂ =R ₃ =R ₄ = R ₅ = H R ₆ =C	198	156
[VO(mal) ₂]	IV		104	92
Rosiglitazon			107	123

Tabela 3. Wpływ kompleksów wanadu (50 mikromol/dm³) oraz rosiglitazonu (50 mikromol/dm³) na zużycie glukozy przez komórki 3T3-L1

Kompleks	Wartościowość wanadu	Podstawniki we wzorze 1, R ₆ grupy A-I	Zużycie glukozy (%)
[V(ONO) ₂]	III	R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₅ = H R ₃ =Br R ₆ =A R ₇ = t-Bu	124
[VO(ONO)(phen)]•2H ₂ O	IV	R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₅ = H R ₃ =Br R ₆ =A R ₇ = OH	136
[VO(ONO)(OC ₂ H ₅)]	V		110
[VO(mal) ₂]	IV		116
Rosiglitazon			112

Tabela 4. Wpływ kompleksów wanadu (50 mikromol/dm³) na zużycie glukozy przez komórki HepG2

Kompleks	Wartościowość wanadu	Podstawniki we wzorze 1, R ₆ grupy A-I	Zużycie glukozy (%)
[V(ONO) ₂]	III	R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₅ = H R ₃ =Br R ₆ =G	119
[VO(ONO)(phen)]•H ₂ O	IV	R ₂ =R ₄ =R ₅ = H R ₁ = Br R ₃ =Cl R ₆ =A R ₇ = OH	158
[VO(ONO)(OC ₂ H ₅)(C ₂ H ₅ OH)]	V	R ₂ =R ₄ =R ₅ = H R ₁ = Cl	116

		R ₃ =Cl R ₆ =A R ₇ = OH	
[VO(mal) ₂]	IV		98

Przykład 8.

Badania inhibicji fosfatazy tyrozynowej 1B (PTP1B)

Do roztworu badanego związku w dołku mikroplastyki 96-dołkowej o zmniejszonej powierzchni dodawano równe objętości 0,6 mmol/dm³ fosforanu 6,8-difluoro-4-metyloumbeliferylu oraz 1,5 U/ml ludzkiej, rekombinowanej fosfatazy PTP1B w buforze reakcyjnym pH 7,0: 25 mM kwasu 3-(N-morfolino) propanosulfonowego, 50 mM chlorku sodu, 1 mM ditiotretolu i 0,05% Tween-20. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C prowadzono pomiar intensywności fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 355 nm i emisji 560 nm (Welte S., Baringhaus K.H., Schmider W., Müller G., Petry S., Tennagels N., Anal. Biochem., **338** (2005) 32). Wyniki wyrażono, jako procent aktywności względem próbki kontrolnej niezawierającej inhibitora.

W przeprowadzonych badaniach wykazano silny, hamujący wpływ związków kompleksowych wanadu na aktywność tej fosfatazy (Tabela 5).

Tabela 5. Wpływ kompleksów wanadu (1 mikromol/dm³) na aktywność ludzkiej, rekombinowanej fosfatazy PTP1B.

Kompleks	Wartościowość wanadu	Podstawniki we wzorze 1, R ₆ grupy A-I	Aktywność PTP1B (%)
[V(ONO) ₂]	III	R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₅ = H R ₃ = OH R ₆ = C	18
[VO(ONO)(H ₂ O)]	IV	R ₁ =OH R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₅ = H R ₆ = E	5
[VO(ONO)(OC ₂ H ₅)]	V	R ₁ -OH R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₅ = H R ₆ = C	29
[VO(mal) ₂]	IV		23

Aktywność enzymatyczną PTP1B podano w odniesieniu do kontroli nie zawierającej związków wanadu, której aktywność przyjęto za 100%. Kompleks [VO(mal)₂], maltolan wanadyliu jest to kompleksem referencyjnym opisany w literaturze.

RZECZNIK PATENTOWY
dr inż. Grażyna Padée