

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008-528**
(22) Přihlášeno: **01.09.2008**
(40) Zveřejněno: **18.11.2009**
(Věstník č. 46/2009)
(47) Uděleno: **12.10.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **18.11.2009**
(Věstník č. 46/2009)

(11) Číslo dokumentu:

301 158

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07J 75/00 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07J 63/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 2007/101873 A; WO 01/18029 A; WO 2008/037226 A; WO 00/03749 A; WO 01/90136 A.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Karlova v Praze, přírodovědecká fakulta,
Praha 2, CZ
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:

Šarek Jan RNDr. Ph.D., Praha 10 - Horní Měcholupy,
CZ
Biedermann David Mgr., Praha 7, CZ
Hajdúch Marian Doc. MUDr. Ph.D., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:

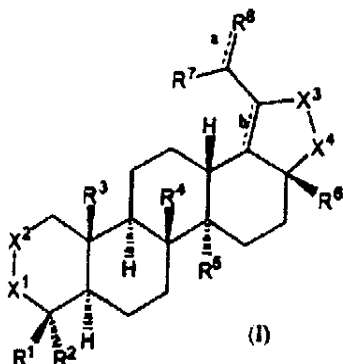
RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle 3, Praha 5,
15000

(54) Název vynálezu:

**Deriváty triterpenoidů pro léčbu nádorových
onemocnění a farmaceutická kompozice je
obsahující**

(57) Anotace:

Deriváty triterpenoidů odvozených od penta- a tetracyklických triterpenoidů obecného vzorce I pro léčbu nádorových onemocnění, zejména leukemických onemocnění a karcinomů plic a prsu, farmaceutická kompozice určená pro léčení nádorových onemocnění, zejména pro léčení leukemických onemocnění a karcinomů plic a prsu, obsahující tyto deriváty, výhodně v inkluzní formě s cyklodextrinem.



(I)

CZ 301158 B6

Deriváty triterpenoidů pro léčbu nádorových onemocnění a farmaceutická kompozice je obsahující

5 Oblast techniky

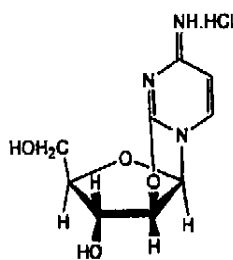
Vynález se týká derivátů triterpenoidů pro léčbu nádorových onemocnění. Vynález dále zahrnuje farmaceutickou kompozici určenou pro léčbu nádorových onemocnění tyto deriváty obsahující.

10

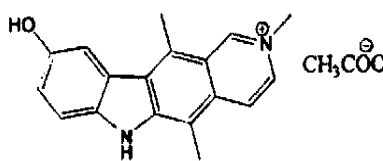
Dosavadní stav techniky

Přes významný pokrok, který chemoterapeutická léčba nádorových onemocnění učinila v posledních třech desetkách let, zůstávají výsledky této léčby neuspokojivé. Proto existuje stálý zájem o vývoj nových látek s protinádorovou aktivitou. Velkou část nově připravených látek pak tvoří semisyntetické deriváty přírodních látek, u kterých se derivatizací dosahuje zlepšení farmakologicky významných vlastností.

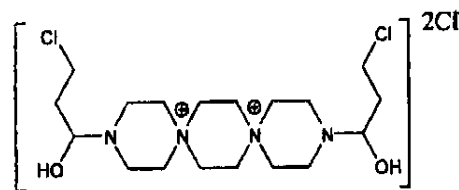
Mezi klinicky významná cytostatika používaná v praxi patří také několik zástupců skupiny kvartérních amoniových solí připravených semisynteticky z přírodních látek. Jedná se zejména o sacharidový derivát cyklocytidin hydrochlorid indikovaný proti akutní leukémii (Karimian K., Radatus B. K., WO9113901; Protinádorová Chemoterapie, Klener P., Galén 1996), dále o alkaloid 2-methyl-9-hydroxyelipticin acetát (Lesca P., Lecoite P., Paoletti C., Mansky D., Biochemical Pharmacology 27, 1203 (1978); Protinádorová Chemoterapie, Klener P., Galén 1996), který je používán při chemoterapii akutní myeloblastické leukémie, sarkomů měkkých tkání, karcinomu štítné žlázy a zejména pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázami (Paoletti, C.; Le Pecq, J. B.; Dat-Xuong, N.; Juret, P.; Garnier, H.; Amiel, J. L.; Rouesse, J., Rec. Res. Cancer Res. 74, 107 (1980); Protinádorová Chemoterapie, Klener P., Galén (1996). Mezi další kvartérní amoniové soli používané jako protinádorová léčiva patří zejména Bisantren (Protinádorová Chemoterapie, Klener P., Galén (1996), Prospidin (Protinádorová Chemoterapie, Klener P., Galén 1996), piperazindion (Protinádorová Chemoterapie, Klener P., Galén (1996), a levamisol (Protinádorová Chemoterapie, Klener P., Galén 1996).



Cyklocytidin

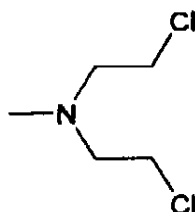


2-methyl-9-hydroxyelipticin



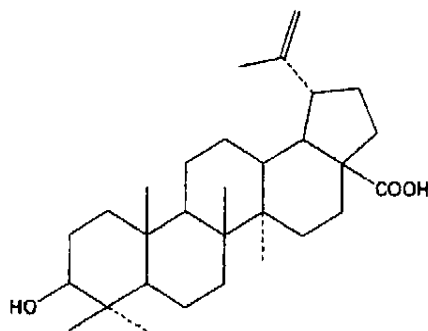
Prospidin

Aminová skupina je ve sloučeninách, které se komerčně používají jako protinádorová chemoterapeutika, poměrně obvyklá. Ve skupině terciárních aminů se jako účinný lék používá například dusíkatý yperit, (Protinádorová Chemoterapie, Klener P., Galén 1996) a to zejména proti bronchogennímu karcinomu se syndromem horní duté žíly.



Dusíkatý yperit

- Pentacyklické a tetracyklické terpenoidy jsou součástí skupiny přírodních látek (isoprenoidů) které vykazují širokou paletou biologických aktivit (Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. Nat. Prod. Rep. 23, 394, (2006)). Jedná se zejména o protinádorovou, anti-HIV, antimikrobiální, protizánětlivou, hepatoprotektivní a kardioprotektivní aktivitu. Mezi látky s vynikající *in vitro* cytotoxickou aktivitou patří například kyselina betulinová (Constantini P., Jacotot E., Decaudin D., Kroemer G.; J. Nat. Cancer Inst. 92, 1042, (2000); Pisha E., Chai H., Lee I., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Gupta T. K. D., Pezzuto J. M.: Nat. Med. 1, 1046 (1995)) Protinádorová aktivita některých semisyntetických triterpenoidů je již známa (např. Hajduch M.; Sarek J.: WO0190136; Hajduch M.; Sarek J.: WO0190046; Hajduch M.; Sarek J.: WO0190096; Konopleva M.; Andreef M.; Sporn M.: WO2002047611). Dokument Jaggi M. et al.: WO 01/18029 popisuje deriváty betulinové kyseliny mající antiangiogenní aktivitu. Dokument Leumis J.-C.; Couche E.: WO 2007/101873 ukazuje polyethylenglykolacetoxylované cholesterylové a karboxymethylové deriváty lupenoátu pro použití k léčbě rakoviny, zejména chronické lymfoidní leukémie. Dokument Sarek J.; Hajduch M.; Svoboda M.: WO 2008/037226 popisuje inkluzní komplexy derivátů triterpenoidů s cyklodextriny se zvýšenou rozpustností ve vodě a tedy biodostupností, nezmiňuje však žádné jejich použití.



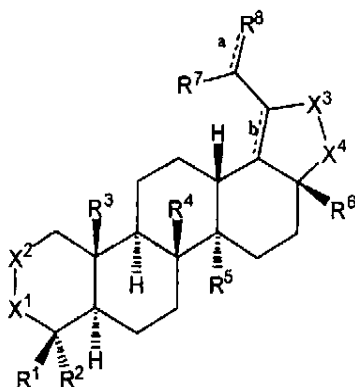
Kyselina betulinová

- Kvartérní amoniové soli triterpenoidů byly zkoumány od poloviny minulého století. V roce 1957 připravili egyptští autoři cholinové estery ursolové a oleanolové kyseliny (Hammouda, Y.; Pourrat, H. Proceedings of the Pharmaceutical Society of Egypt, 39, 69, (1957)). V roce 2003 byly zveřejněny antibakteriální, antifungální a surfaktantní vlastnosti triterpenoidních kvartérních ammoniových solí (Krasutsky P. A.; Avilov D. V.: WO2003062260).

Vzhledem k velkému spektru existujících nádorových onemocnění a ne vždy uspokojivým výsledkům léčby dosud známými léčivy je třeba vyhledávat další látky s protinádorovou účinností. V rámci předkládaného vynálezu bylo překvapivě zjištěno, že substituce terpenoidních derivátů dusíkatými substituenty systematicky zvyšuje jejich protinádorovou aktivitu.

30 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití sloučenin obecného vzorce I



(I)

kde:

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 jsou nezávisle na sobě C_1 až C_4 alkyl, s výhodou methyl;

5 R^6 je vybrán ze skupiny zahrnující $COO(CH_2)_nN[(CH_2)_mOH]_2$, $COO(CH_2)_nN^{\oplus}R^{1b}{}_3Y^{\ominus}$ a $COO(CH_2)_nR^{1c\oplus}Y^{\ominus}$, kde n a m jsou nezávisle na sobě rovny 1–10 (s výhodou $n = 2$, $m = 2$) a Y je halogenidový ion nebo triflát;

10 R^7 je vybrán ze skupiny zahrnující C_1 až C_4 alkyl, $COO(CH_2)_nN[(CH_2)_mOH]_2$, $(CH_2)_nN^{\oplus}R^{1b}{}_3Y^{\ominus}$, $(CH_2)_nR^{1c\oplus}Y^{\ominus}$, kde Y je halogenid nebo triflát a $n = 1-4$, s výhodou je R^7 methyl;

X^1 je vybrán ze skupiny zahrnující $CHOR^{1a}$, $CHO(C=O)R^{1a}$;

X^2 je vybrán ze skupiny zahrnující CH_2 , $C=O$, $CHOH$;

15 X^3 a X^4 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny zahrnující CH_2 a $C=O$;

„a“ je dvojná nebo jednoduchá vazba;

20 pokud je „a“ dvojná vazba, R^8 je CH_2 nebo O ; pokud je „a“ jednoduchá vazba, R^8 je CH_3 ; „b“ je dvojná nebo jednoduchá vazba;

kde R^{1a} je C_1-C_{10} alkyl nebo vodík, s výhodou C_1-C_4 alkyl nebo vodík, výhodněji methyl nebo vodík;

25 R^{1b} je C_1-C_{10} alkyl nebo vodík, s výhodou C_1-C_4 alkyl, výhodněji methyl, ethyl;

R^{1c} je dusíkatý heterocyklyl, s výhodou aromatický, obsahující 4 – 10 atomů uhlíku a 1 až 3 atomy dusíku, s výhodou je R^{1c} pyridin;

30 halogenidový ion je vybrán ze skupiny zahrnující fluoridový, chloridový, bromidový a jodidový ion pro výrobu léčiva pro léčení nádorových onemocnění, zejména pro léčení nemocí vybrané ze skupiny zahrnující leukemická onemocnění a karcinomy plic a prsu.

35 Dalším předmětem vynálezu je farmaceutická kompozice, určená pro léčení nádorových onemocnění, zejména pro léčení nemocí vybrané ze skupiny zahrnující leukemická onemocnění a karcinomy plic a prsu, která obsahuje alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I, jak je definován výše, přičemž když X^4 je CH_2 a X^1 je $CHOH$ nebo $CHO(C=O)CH_3$, R^6 není $COO(CH_2)_2N^{\oplus}(CH_3)_3Br^{\ominus}$, $COO(CH_2)_2N^{\oplus}(CH_2CH_3)_3Br^{\ominus}$ nebo $COO(CH_2)_2N^{\oplus}C_2H_5Br^{\ominus}$, a farmaceuticky přijatelný nosič. Ve výhodném provedení vynálezu může být sloučenina obecného vzorce ve formě inkluzní sloučeniny s cyklodextrinem a dalšími farmaceuticky akceptovatelnými aditivami (podle postupu popsaného v dokumentu PCT/CZ2007/000088). Tuto formulaci je možné používat zejména ve formě roztoku založeného na vodné bázi nebo ve formě lyofilizovaného prášku.

45 Vhodné cesty pro aplikaci jsou orální, rektální, vazální místní (zahrnující okulární, bukální a sublinguální), vaginální a parenterální (zahrnující subkutánní, intramuskulární, intravitreózní, nitrožilní, intradermální, intrathekální a epidurální). Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, léčebném režimu a místě onemocnění, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

50 Terapeutický přípravek obsahuje od 0,1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 0,1 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou například

masti, krémy, tinkury, spreje, disperze atd. Farmaceutické kompozice podle tohoto vynálezu jsou připravovány obvyklými způsoby, například mícháním, rozpouštěním, lyofilizací.

5 Farmaceuticky přijatelnými nosiči mohou být látky běžně používané pro tento účel, jako rozpouštědla, plniva, pufry, stabilizátory, masťové základy, tuhé nosiče, jako jsou cukry, škroby, křemičitany, biopolymery a další.

10 Sloučeniny obecného vzorce I lze připravit tak, že reaguje látka obecného vzorce I, kde R⁶ je COO(CH₂)_nY a ostatní skupiny mají významy uvedené výše, sterciárním aminem N[(CH₂)_mOH]₃, NR^{1b}₃ nebo R^{1c}, kde m, R^{1b} a R^{1c} mají významy uvedené výše, za vzniku látky obecného vzorce I.

15 Příklady provedení vynálezu

Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány.

20 NMR spektra byla měřena na přístroji Varian UNITY INOVA-400 (¹H při 399,95 MHz, ¹³C při 100,58 MHz) v roztoku v CD₃OD. Chemické posuny ¹³C NMR spekter byly referencovány vůči δ(CDCl₃)=77,00 ppm.

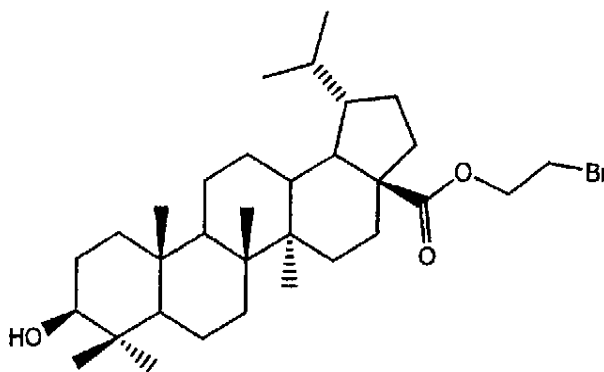
25 Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (model UVS-54; 254 nm) a poté postříkem 10 % kyselinou sírovou a zahřátím na 110 až 200 °C.

30 Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (model UVS-54; 254 nm) a poté postříkem 10 % kyselinou sírovou a zahřátím na 110 až 200 °C.

35 Příklad 1

Příprava bromethylesteru kyseliny dihydrobetulinové 5:

40 Do roztoku dihydrobetulinové kyseliny (3,2 g, 6,15 mmol) ve směsi N,N'-dimethylformamidu (20 ml) a acetonitrilu (3 ml) byl suspendován uhličitan draselný (0,8 g), přidán 1,2-dibromethan (2,2 ml, 18,0 mmol) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu jednoho týdne. Světlý roztok obsahující suspenzi byl poté nalit do vody (400 ml), třikrát extrahován chloroformem a spojené organické podíly byly odpařeny. Získaný žlutý odparek byl separován kolonovou chromatografií v toluenu. Bylo získáno 1,15 g (33 %) bromethylesteru 5. ¹³C NMR δ (ppm) = 38,70, 27,36, 78,99, 38,84, 55,28, 18,27, 34,36, 40,72, 50,28, 37,13, 20,89, 26,91, 38,16, 42,53, 31,93, 29,18, 57,10, 48,86, 44,16, 29,71, 22,75, 37,33, 27,97, 16,08, 16,01, 15,37, 14,61, 175,94, 14,66, 22,98, 63,25, 29,65.



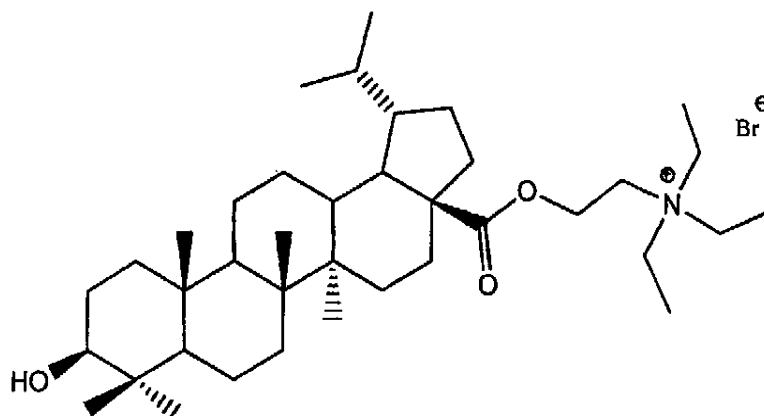
Příklad 2

Příprava kvartérní soli 1:

5

K roztoku bromethylesteru 5 (305 mg, 0,51 mmol) v N,N' -dimethylformamidu (5 ml) byl přidán triethylamin (1 ml, 12,66 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 120 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 159 mg (90 %) bílých krystalů látky 1 o teplotě tání 253 °C. ^{13}C NMR δ (ppm) = 7,9, 15,0, 15,0, 16,1, 16,7, 19,4, 22,1, 23,4, 23,6, 28,0, 28,2, 28,6, 30,9, 31,0, 32,7, 35,6, 38,0, 38,3, 39,3, 39,9, 40,1, 42,0, 43,7, 45,4, 50,3, 51,7, 54,7, 56,8, 57,9, 58,3, 59,6, 79,6, 176,5.

10



1

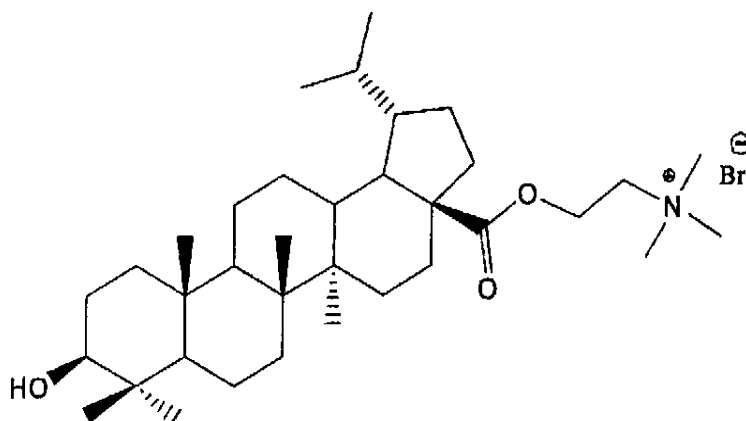
Příklad 3

15

Příprava kvartérní soli 2:

K roztoku bromethylesteru 5 (203 mg, 0,36 mmol) v N,N' -dimethylformamidu (5 ml) byl přidán trimethylamin (0,5 ml, 5,7 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 2 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 156 mg (69 %) bílých krystalů látky 2 o teplotě tání 265 °C. ^{13}C NMR δ (ppm) = 15,0, 15,0, 16,2, 16,7, 19,4, 22,2, 23,4, 23,6, 28,0, 28,2, 28,6, 30,9, 31,0, 32,8, 35,6, 38,0, 38,3, 39,3, 39,9, 40,1, 42,0, 43,7, 45,4, 50,2, 51,7, 54,5, 56,8, 58,3, 58,5, 66,1, 79,6, 176,4.

20



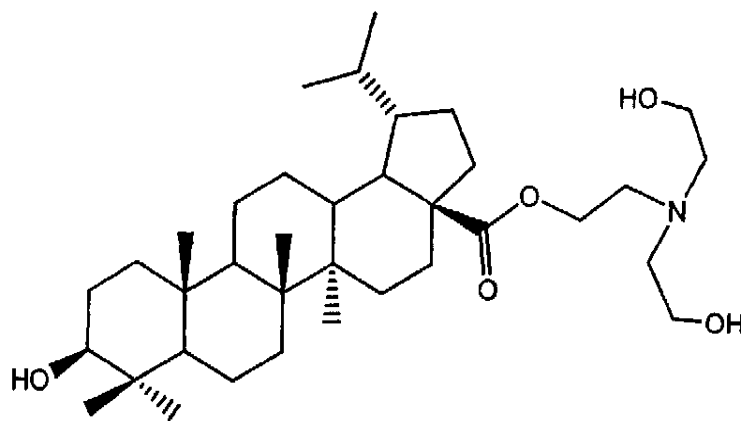
2

25

Příklad 4

Příprava terciárního aminu 3:

K roztoku bromethylesteru 5 (258 mg, 0,43 mmol) v *N,N'*-dimethylformamidu (5 ml) byl přidán triethanolamin (1 ml, 7,5 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 240 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 128 mg (40 %) bílých krystalů látky 3 o teplotě tání 187 °C. ^{13}C NMR δ (ppm) = 14,6, 14,6, 15,4, 16,0, 16,1, 18,2, 20,1, 22,7, 23,0, 26,9, 27,31, 27,9, 29,6, 29,7, 31,9, 34,3, 37,1, 37,3, 38,0, 38,6, 38,8, 40,7, 42,5, 44,1, 48,9, 50,2, 53,3, 55,2, 56,4, 57,0, 59,7, 61,5, 78,9, 176,3.

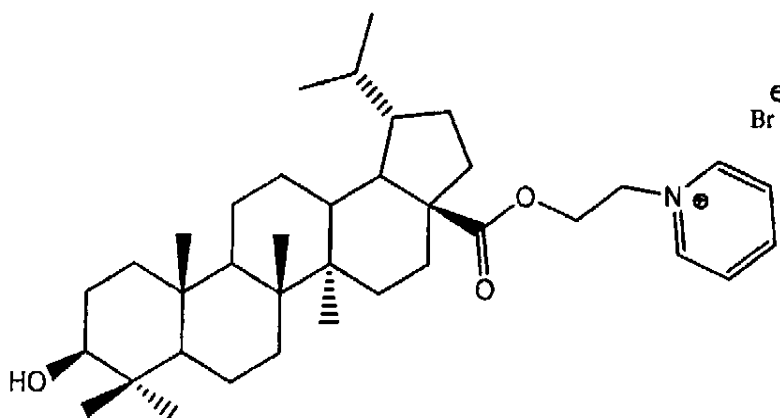


3

10 Příklad 5

Příprava kvartérní soli 4:

K roztoku bromethylesteru 5 (277 mg, 0,45 mmol) v *N,N'*-dimethylformamidu (5 ml) byl přidán pyridin (1 ml, 9,9 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 96 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 240 mg (81 %) bílých krystalů látky 4 o teplotě tání 273 °C. ^{13}C NMR δ (ppm) = 15,0, 15,0, 16,1, 16,7, 16,7, 19,3, 22,0, 23,4, 23,5, 27,9, 28,0, 28,6, 30,7, 30,9, 32,6, 35,5, 38,0, 38,2, 39,3, 39,9, 40,0, 41,8, 43,5, 45,4, 51,5, 56,7, 58,3, 61,5, 63,5, 79,5, 129,6, 146,5, 147,7, 176,4.



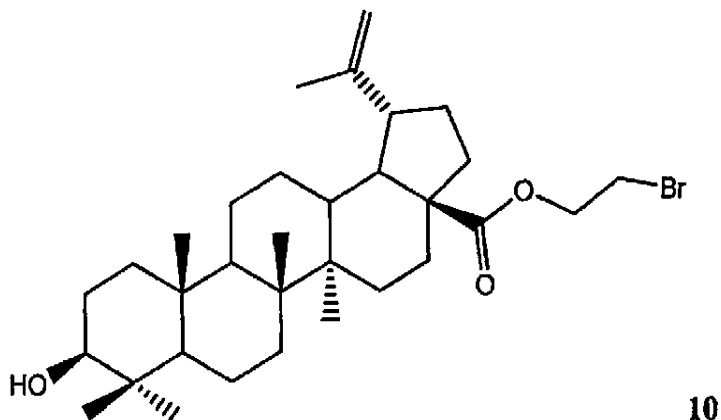
4

Příklad 6

Příprava bromethylesteru kyseliny betulinové 10:

Do roztoku betulinové kyseliny (1,37 g, 3,0 mmol) ve směsi *N,N'*-dimethylformamidu (10 ml) a acetonitrilu (1 ml) byl suspendován uhličitan draselný (0,4 g), přidán dibromethan (0,55 ml, 4,5 mmol) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu jednoho týdne.

Světlý roztok obsahující suspenzi byl poté nalit do vody (200 ml), třikrát extrahován chloroformem a spojené organické podíly byly odpařeny. Získaný žlutý odparek byl separován kolonovou chromatografií v toluenu. Bylo získáno 480 mg (28 %) bromethylesteru 10. ^{13}C NMR δ (ppm) = 14,70, 15,34, 15,99, 16,12, 18,27, 19,36, 20,87, 25,51, 27,39, 27,97, 29,15, 29,66, 30,57, 32,04, 34,29, 36,98, 37,17, 38,32, 38,71, 38,84, 40,72, 42,39, 46,94, 49,40, 50,53, 55,33, 56,67, 63,32, 78,97, 109,67, 150,44, 175,72.



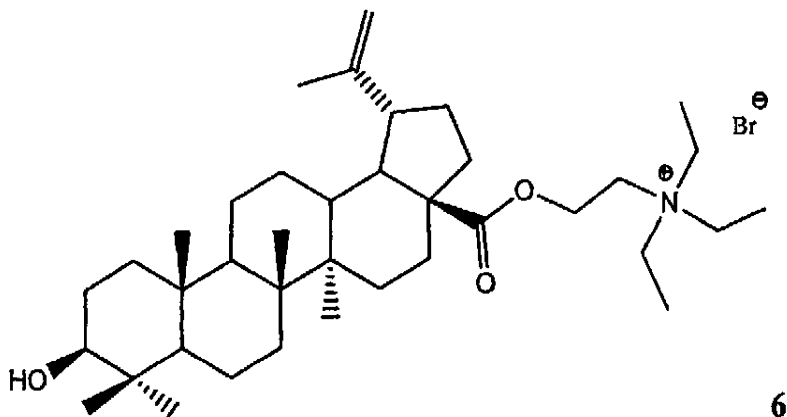
Příklad 7

10

Příprava kvartérní soli 6:

15

K roztoku bromethylesteru 10 (9,7 g, 16,11 mmol) v N,N' -dimethylformamidu (5 ml) byl přidán triethylamin (15 ml, 108,4 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 144 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 10,7 mg (99 %) bílých krystalů látky 6 o teplotě tání $255\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^{13}C NMR δ (ppm) = 15,1, 16,1, 16,7, 16,8, 19,4, 19,5, 22,0, 26,7, 28,0, 28,6, 30,9, 31,4, 32,8, 35,5, 37,5, 38,3, 39,5, 39,9, 40,0, 41,9, 43,5, 50,7, 51,9, 54,7, 56,1, 56,8, 57,8, 58,0, 79,5, 110,5, 151,5, 176,4.



20

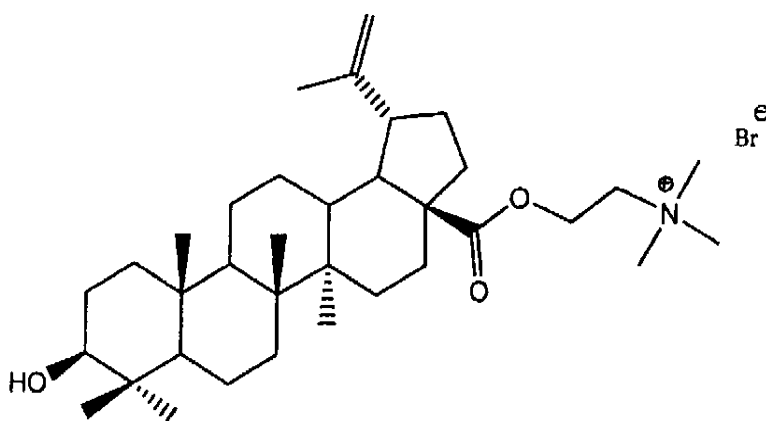
Příklad 8

Příprava kvartérní soli 7:

25

K roztoku bromethylesteru 10 (200 mg, 0,33 mmol) v N,N' -dimethylformamidu (5 ml) byl přidán trimethylamin (0,5 ml, 5,7 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 163 mg (79 %) bílých krystalů látky 7 o teplotě tání $279\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^{13}C NMR δ (ppm) = 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, 56,7, 57,7, 58,4, 66,0, 78,7, 79,1, 79,4, 79,5, 110,5, 128,1, 137,3, 151,3, 176,1.

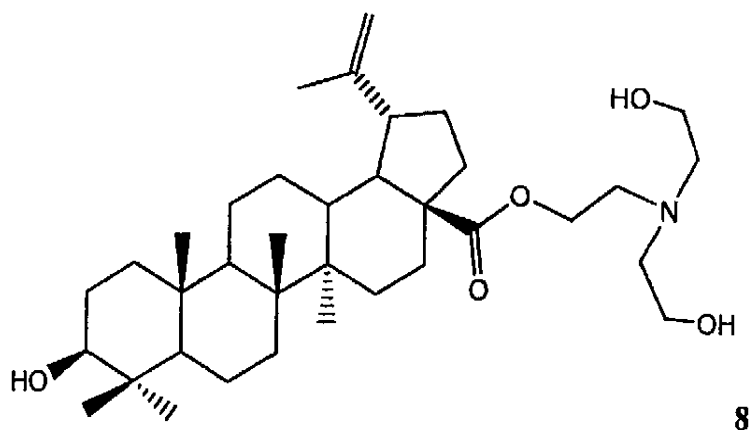


5 Příklad 9

Příprava terciárního aminu 8:

10 K roztoku bromethylesteru 10 (291 mg, 0,45 mmol) v N,N'-dimethylformamidu (5 ml) byl přidán triethanolamin (1 ml, 7,5 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 240 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 134 mg (39 %) bílých krystalů látky 8 o teplotě tání 146 °C. ¹³C NMR δ (ppm) = 15,2, 16,1, 16,7, 16,7, 19,3, 19,6, 21,9, 26,6, 27,8, 28,6, 30,7, 31,5, 33,0, 35,4, 37,8, 38,2, 39,4, 39,8, 39,9, 41,8, 43,4, 50,4, 51,7, 54,3, 56,6, 57,7, 57,8, 58,0, 60,5, 60,7, 61,0, 63,0, 78,7, 79,0, 79,4, 79,5, 110,3, 151,5, 177,4.

15

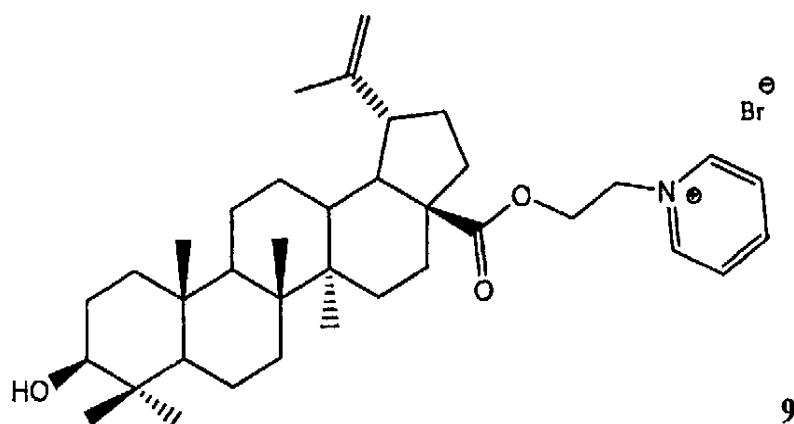


Příklad 10

20 Příprava kvartérní soli 9:

K roztoku bromethylesteru 10 (285 mg, 0,47 mmol) v N,N'-dimethylformamidu (5 ml) byl přidán triethylamin (1 ml, 12,66 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 120 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 257 mg (94 %) bílých krystalů látky 9 o teplotě tání 262 °C. ¹³C NMR δ (ppm) = 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, 3,4, 50,6, 51,8, 56,7, 57,9, 61,5, 63,6, 79,5, 110,5, 129,7, 146,6, 147,7, 151,4, 176,3.

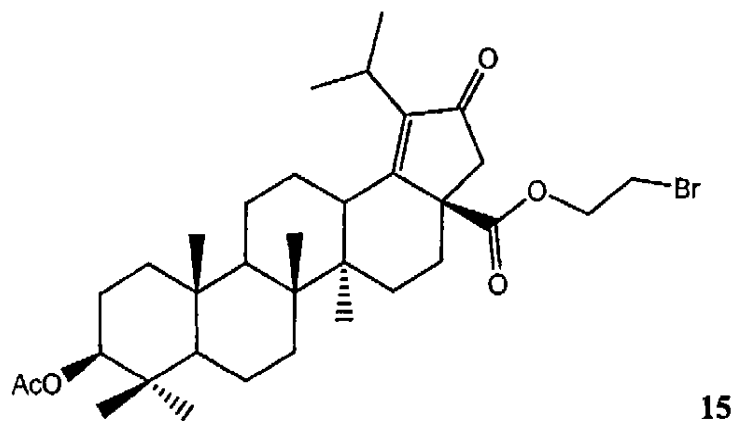
25



Příklad 11

5 Příprava bromethylesteru oxokyseliny 15:

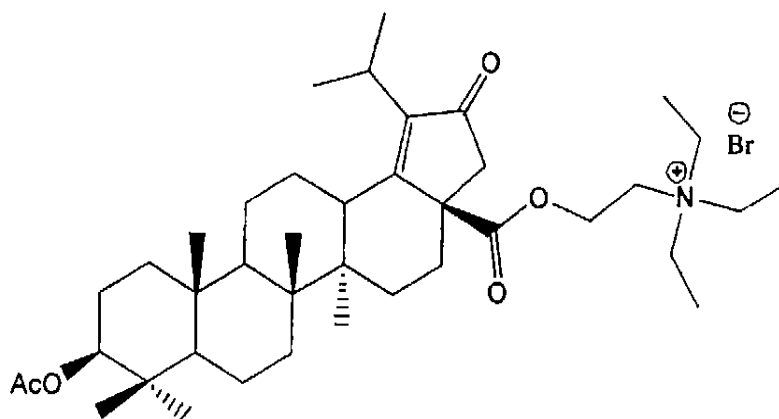
Do roztoku 3 β -acetoxy-21-oxolup-19-en-28-ové kyseliny (5 g, 9,76 mmol) ve směsi N,N'-di-
 10 methylformamidu (50 ml) a acetonitrilu (5 ml) byl suspendován uhlíčan draselný (2 g), přidán
 dibromethan (2,5 ml, 35,92 mmol) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu
 jednoho týdne. Světlý roztok obsahující suspenzi byl poté nalit do vody (500 ml), třikrát extrahová-
 15 ván chloroformem a spojené organické podíly byly odpařeny. Získaný žlutý odparek byl separo-
 ván kolonovou chromatografií v toluenu. Bylo získáno 3,48 g (58 %) bromethylesteru 15.
 ^{13}C NMR δ (ppm) = 15,9, 16,5, 16,7, 16,8, 18,1, 19,9, 20,2, 21,2, 21,3, 23,6, 25,1, 27,6, 27,9,
 29,0, 29,0, 33,4, 34,8, 37,1, 37,8, 38,6, 41,3, 45,1, 45,4, 47,5, 51,0, 53,0, 55,4, 64,3, 80,7, 145,9,
 171,0, 171,4, 174,0, 207,0.



Příklad 12

20 Příprava kvartérní soli 11:

K roztoku bromethylesteru 15 (285 mg, 0,46 mmol) v N,N'-dimethylformamidu (5 ml) byl při-
 25 dán triethylamin (1 ml, 12,66 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 55 °C
 po dobu 144 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen.
 Bylo získáno 68 mg (21 %) bílých krystalů látky 11 o teplotě tání 196 °C. ^{13}C NMR δ (ppm) =
 7,9, 15,0, 15,0, 16,1, 16,7, 19,4, 22,1, 23,4, 23,6, 28,0, 28,2, 28,6, 30,9, 31,0, 32,7, 35,6, 38,0,
 38,3, 39,3, 39,9, 40,1, 42,0, 43,7, 45,4, 50,3, 51,7, 54,7, 56,8, 57,9, 58,3, 59,6, 79,6, 176,5.



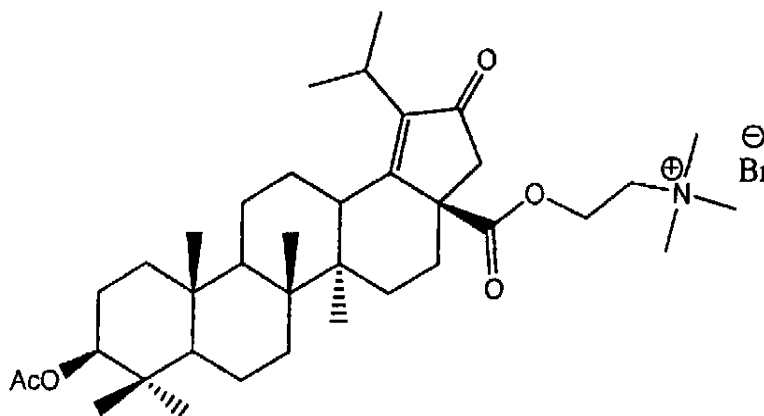
11

Příklad 13

5 Příprava kvartérní soli 12:

K roztoku bromylesteru 15 (191 mg, 0,31 mmol) v *N,N'*-dimethylformamidu (5 ml) byl přidán trimethylamin (0,5 ml, 5,7 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 2 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen.

10 Bylo získáno 182 mg (87 %) bílých krystalů látky 12 o teplotě tání 232 °C. ¹³C NMR δ (ppm) = 16,5, 17,0, 17,4, 17,4, 19,2, 20,3, 20,7, 21,1, 22,4, 24,6, 26,4, 28,4, 28,9, 30,1, 34,4, 36,0, 38,3, 38,9, 39,7, 42,6, 46,6, 46,9, 52,3, 54,5, 56,7, 59,8, 82,3, 147,2, 172,8, 173,6, 174,3, 209,3.



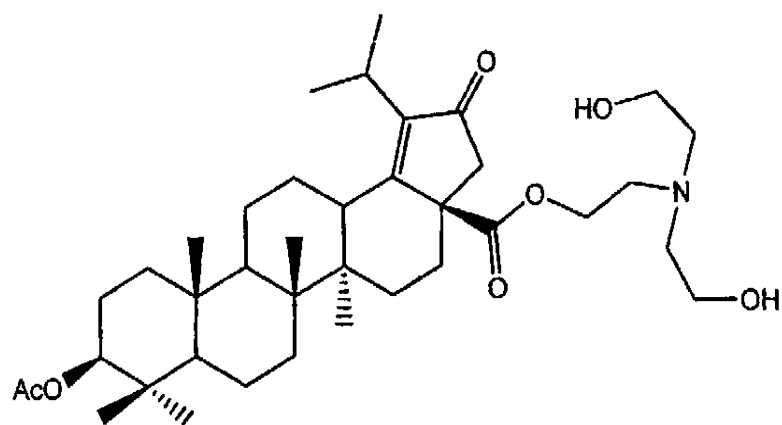
12

15 Příklad 14

Příprava terciárního aminu 13:

18 K roztoku bromylesteru 15 (250 mg, 0,40 mmol) v *N,N'*-dimethylformamidu (5 ml) byl přidán triethanolamin (1 ml, 7,5 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 240 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 125 mg (40 %) bílých krystalů látky 13 o teplotě tání 173 °C. ¹³C NMR δ (ppm) = 16,5, 17,0, 17,3, 17,4, 19,2, 20,3, 20,6, 21,1, 22,4, 24,6, 26,4, 28,4, 28,88, 30,2, 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, 64,7, 79,5, 146,8, 172,8, 174,4, 175,5, 209,7.

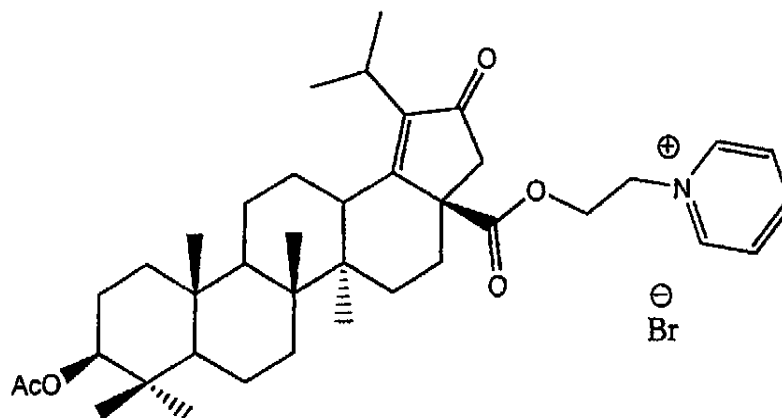
25



Příklad 15

5 Příprava kvartérní soli 14:

K roztoku bromethylesteru 15 (308 mg, 0,50 mmol) v N,N'-dimethylformamidu (5 ml) byl přidán pyridin (1 ml, 9,9 mmol) a roztok byl v uzavřené skleněné nádobě zahříván na 60 °C po dobu 120 hodin. Po ochlazení byl roztok přefiltrován, filtrát byl promyt vodou a vysušen. Bylo získáno 10 280 mg (80 %) bílých krystalů látky 14 o teplotě tání 249 °C. ¹³C NMR δ (ppm) = 16,5, 16,9, 17,2, 17,3, 19,0, 21,2, 20,8, 21,3, 22,1, 24,4, 26,1, 28,4, 28,6, 29,8, 34,2, 35,7, 38,1, 38,7, 39,5, 42,3, 46,3, 46,5, 52,0, 54,1, 56,5, 61,1, 64,3, 78,6, 78,9, 79,3, 82,1, 129,5, 146,1, 147,0, 147,6, 149,0, 172,7, 173,3, 174,1, 209,0.



15

Příklad 16

Protinádorová účinnost in vitro

20 K hodnocení protinádorové účinnosti nově připravených látek v *in vitro* podmínkách jsme použili cytotoxického MTT testu na buněčných liniích derivovaných z normálních tkání i nádorů. Konkrétně se jednalo o linii K562 (lidská myeloidní leukémie), CEM (T-lymfoblastická leukémie) a linii A549 (lidský adenokarcinom plic).

25 Cytotoxická aktivita byla testována následujícím způsobem: Testovaná sloučenina byla v šesti různých zředěních (250 – 10 μmol/l) přidána ke tkáňové kultuře buněk v jamkách kultivačního panelu. Konečná koncentrace buněk byla 50 000 buněk/ml. Každá koncentrace sloučeniny byla testována v dubletu. Inkubace buněčné suspenze v prostředí s analyzovanou sloučeninou trvala 72 h při 37 °C, v 5% atmosféře CO₂ a 100% vlhkosti. Poté byl do každé jamky panelu přidán 30 MTT, tedy 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid, a inkubace

5 pokračovala další 4 h. Inkubace byla ukončena přidáním 10% dodekansulfonátu sodného a procento přeživajících buněk bylo stanoveno spektrofotometricky při 540 nm. Z křivek dávkové závislosti je vypočítána koncentrace usmrcující 50 % nádorových buněk $-IC_{50}$. Expresní charakteristiky, profily vnímavosti na klasická protinádorová léčiva i metodologie cytotoxického MTT testu byly opakovaně publikovány (Noskova, V.; Dzubak, P.; Kuzmina, G.; Ludkova, A.; Stehlik, D.; Trojanec, R.; Janostakova, A.; Korinkova, G.; Mihal, V.; Hajduch, M., Neoplasma, 49, 418, (2002)., Sarek, J.; Klinot, J.; Dzubak, P.; Klinotova, E.; Noskova, V.; Krecek, V.; Korinkova, G.; Thomson, J. O.; Janostakova, A.; Wang, S.; Parsons, S.; Fischer, P. M.; Zhelev, N. Z.; Hajduch, M., Journal of Medicinal Chemistry, 46, 5402 (2003).

10

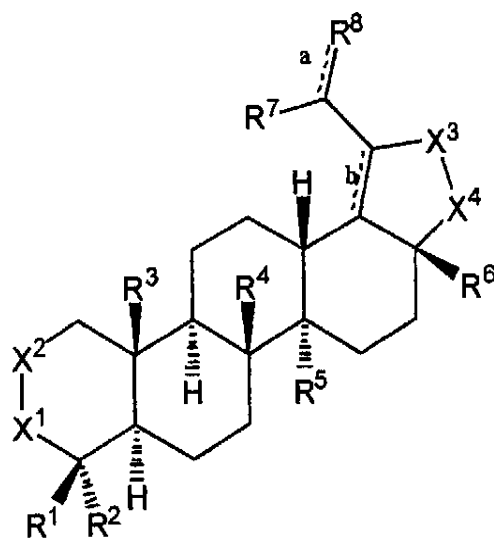
Výsledky testování jsou shrnuty v Tabulce 1. Testované látky vykazovaly obecně dobrou cytotoxicitu na širokém spektru nádorových linií různého histogenetického původu.

15 Tabulka 1

č. sl.	R ¹ - R ³	R ^a	R ^b	a	X ¹	X ²	X ³	X ⁴	b	IC ₅₀ (μmol/l)		
										CEM	A549	MCF - 7
1	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₂ CH ₃) ₃ Br ⁻	CH ₃	jednoduchá	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	3	9	30
2	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ Br ⁻	CH ₃	jednoduchá	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	13	22	16
3	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	CH ₃	jednoduchá	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	7	5	35
4	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ C ₆ H ₅ Br ⁻	CH ₃	jednoduchá	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	9	17	12
5	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ Br	CH ₃	jednoduchá	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	226	189	250
6	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₂ CH ₃) ₃ Br ⁻	CH ₃	dvojná, R ^a je CH ₂	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	7	8	8
7	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ Br ⁻	CH ₃	dvojná, R ^a je CH ₂	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	12	15	19
8	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	CH ₃	dvojná, R ^a je CH ₂	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	11	39	54
9	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ C ₆ H ₅ Br ⁻	CH ₃	dvojná, R ^a je CH ₂	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	8	12	12
10	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ Br	CH ₃	dvojná, R ^a je CH ₂	CHOH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	jednoduchá	64	89	112
11	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₂ CH ₃) ₃ Br ⁻	CH ₃	jednoduchá	CHOCOCH ₃	CH ₂	CO	CH ₂	dvojná	14	12	32
12	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ Br ⁻	CH ₃	jednoduchá	CHOCOCH ₃	CH ₂	CO	CH ₂	dvojná	12	26	18
13	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	CH ₃	jednoduchá	CHOCOCH ₃	CH ₂	CO	CH ₂	dvojná	22	17	18
14	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ N ⁺ C ₆ H ₅ Br ⁻	CH ₃	jednoduchá	CHOCOCH ₃	CH ₂	CO	CH ₂	dvojná	19	18	16
15	CH ₃	COO(CH ₂) ₂ Br	CH ₃	jednoduchá	CHOCOCH ₃	CH ₂	CO	CH ₂	dvojná	192	198	155

PATENTOVÉ NÁROKY

5 1. Použití sloučenin obecného vzorce I



(I),

kde:

10 R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 jsou nezávisle na sobě C_1 až C_4 alkyl,

R^6 je vybrán ze skupiny zahrnující $COO(CH_2)_nN[(CH_2)_mOH]_2$, $COO(CH_2)_nN^{\oplus}R^{1b}_3Y^{\ominus}$ a $COO(CH_2)_nR^{1c\oplus}Y^{\ominus}$, kde n a m jsou nezávisle na sobě rovny 1–10 a Y je halogenidový ion nebo triflát;

15 R^7 je vybrán ze skupiny zahrnující C_1 až C_4 alkyl, $COO(CH_2)_nN[(CH_2)_mOH]_2$, $(CH_2)_nN^{\oplus}R^{1b}_3Y^{\ominus}$, $(CH_2)_nR^{1c\oplus}Y^{\ominus}$, kde Y je halogenid nebo triflát a $n = 1-4$,

X^1 je vybrán ze skupiny zahrnující $CHOR^{1a}$, $CHO(C=O)R^{1a}$;

20 Y^2 je vybrán ze skupiny zahrnující CH_2 , $C=O$, $CHOH$;

X^3 a X^4 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny zahrnující CH_2 a $C=O$;

25 „a“ je dvojná nebo jednoduchá vazba;

pokud je „a“ dvojná vazba, R^8 je CH_2 nebo O ; pokud je „a“ jednoduchá vazba, R^8 je CH_3 ; „b“ je dvojná nebo jednoduchá vazba;

kde R^{1a} je C_1-C_{10} alkyl nebo vodík, s výhodou C_1-C_4 alkyl nebo vodík,

30 R^{1b} je C_1-C_{10} alkyl nebo vodík, s výhodou C_1-C_4 alkyl,

R^{1c} je dusíkatý heterocyklyl, s výhodou aromatický, obsahující 4 – 10 atomů uhlíku a 1 až 3 atomy dusíku,

35 halogenidový ion je vybrán ze skupiny zahrnující fluoridový, chloridový, bromidový a jodidový ion pro výrobu léčiva pro léčení nádorových onemocnění, zejména pro léčení nemocí vybrané ze skupiny zahrnující leukemická onemocnění a karcinomy plic a prsu.

2. Použití sloučenin podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 a R^7 znamenají methyl, R^{1a} je methyl nebo vodík, R^{1b} je methyl nebo ethyl, R^{1c} je pyridin.
- 5 3. Farmaceutická kompozice určená pro léčení nádorových onemocnění, zejména pro léčení nemoci vybrané ze skupiny zahrnující leukemická onemocnění a karcinomy plic a prsu, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I, jak je definován v nároku 1, přičemž když X^4 je CH_2 a X^1 je $CHOH$ nebo $CHO(C=O)CH_3$, R^6 není $COO(CH_2)_2-N^{\oplus}(CH_3)_3Br^{\ominus}$, $COO(CH_2)_2N^{\oplus}(CH_2CH_3)_3Br^{\ominus}$ nebo $COO(CH_2)_2N^{\oplus}C_2H_5Br^{\ominus}$, a farmaceuticky přijatelný nosič.
- 10 4. Farmaceutická kompozice podle nároku 3, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje sloučeninu obecného vzorce I ve formě inkluzní sloučeniny s cyklodextrinem.

15

Konec dokumentu
