

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 571

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07C 217/18 (2006.01)
C07C 213/08 (2006.01)
C07F 9/54 (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-66**
 (22) Přihlášeno: **29.01.2014**
 (40) Zveřejněno: **05.08.2015**
(Věstník č. 31/2015)
 (47) Uděleno: **04.11.2015**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **16.12.2015**
(Věstník č. 50/2015)

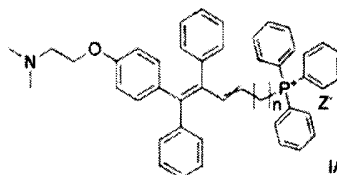
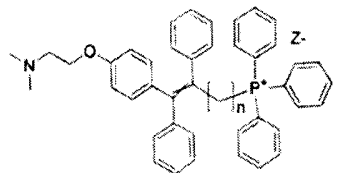
(56) Relevantní dokumenty:

CZ 2013-308 A; US 2007/0270381 A; US 2009/0220419 A; WO 92/06068 A; WO 00/18397 I; EP 0 702 961 A.

(73) Majitel patentu:
 Smart Brain s.r.o., Praha 4, CZ
 Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ
 prof. Ing. Jiří Neužil, CSc., Praha 4, CZ

(72) Původce:
 prof. Ing. Jiří Neužil, CSc., Praha 4, CZ
 Ing. Jan Štursa, Ph.D., Praha 4, CZ
 Ing. Lukáš Werner, Ph.D., Kadaň, CZ

(74) Zástupce:
 Advokátní kancelář JUDr. Kristina Škampová a
 spol., JUDr. Kristina Škampová, Pellicova 8a,
 602 00 Brno



(54) Název vynálezu:

**Deriváty tamoxifenu k léčbě neoplastických
 chorob, zejména s vyšší hladinou proteinu
 HER2**

(57) Anotace:
 Předmětem vynálezu je způsob přípravy mitochondriálně
 cílených E a/nebo Z izomerů přes alifatický řetězec
 vázaných trifenylofosfoniových derivátů tamoxifenu
 obecného vzorce I a IA, kde významy obecných
 substituentů jsou uvedeny v popisné části. Derivát vzorce
 IA nebo jeho odpovídající sole terciálního aminu. Použití
 tohoto derivátu pro léčbu nádorů zejména s vyšší
 hladinou proteinu HER2. Léčivo s jeho obsahem pro
 léčení neoplastických chorob. Použití derivátu vzorce IA
 nebo ve směsi s derivátem vzorce I pro léčení
 neoplastických chorob vybraných ze skupiny astrocytom,
 neuroblastom, glioblastom, mesotheliom, nádor prostaty,
 atd.

CZ 305571 B6

Deriváty tamoxifenu k léčbě neoplastických chorob, zejména s vyšší hladinou proteinu HER2

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových mitochondriálně cílených derivátů tamoxifenu k léčbě neoplastických chorob, zejména nádorů s vyšší hladinou proteinu HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), který ovlivňuje spontánní dělení buněk a růst nádorů.

10

Dosavadní stav techniky

Současné pokroky v molekulární medicíně vedly k určitému zlepšení v diagnose a léčbě neoplastických chorob. Přes tyto dílčí úspěchy je tato oblast onemocnění stále obrovským problémem. U některých typů nádorových onemocnění dokonce současná léčba selhává z řady důvodů. Jednak je to vrozená rezistence nádorových buněk, jejich schopnost neustále mutovat a léčbě se „vyhnout“, jednak velká heterogenita nádorového prostředí (Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144:646–674). Bylo ukázáno, že nádory téhož typu se u jednotlivých pacientů velmi liší z hlediska genomického profilu (Jones S et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. Science 2008;321:1801–1806. Parsons DW et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 2008;321:1807–1812), což ukazuje na nutnost tak zvané „personální“ léčby. Ještě větším problémem je heterogenita mutací v tomtéž nádoru, jak bylo nedávno ukázáno u nádoru ledvin (Gerlinger M et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med 2012;366:883–892.) a tento jev lze očekávat i u jiných typů nádorů. Proto je nutné hledat nové přístupy a neměnné zásahové místo, které by bylo společné všem či většině maligních buněk v nádoru a které přednostně ovlivňuje zásadní funkce v rakovinových buňkách. Takovým zásahovým místem se jeví mitochondrie, tedy organely, které jsou zásadní pro tvorbu energie nutné pro veškeré fyziologické i patofyziologické procesy v buňce. Přestože nádorové buňky z velké části pro tvorbu energie využívají tzv. aerobní glykolýzu, mitochondriální respirace (tedy spotřeba kyslíku spojená s tvorbou ATP) je vlastní většině (teoreticky všem) typům nádorů (Ralph SJ et al. The causes of cancer revisited: „mitochondrial malignancy“ and ROS-induced oncogenic transformation – why mitochondria are targets for cancer therapy. Mol Aspects Med 2010;31:145–170.).

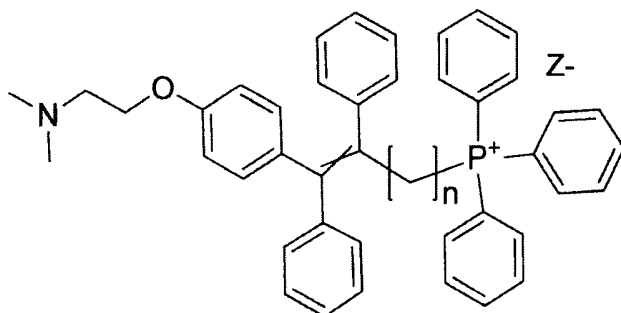
Skupina látek s protirakovinnou aktivitou byla definována pod názvem „mitokany“ (odvozeno od „mitochondria and cancer“) (Neuzil J et al. Molecular mechanism of „mitocan“-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. FEBS Lett 2008;580:5125–5129. Neuzil J et al. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. Mitochondrion 2013;13:199–208.). Tyto látky jsou rozděleny od několika skupin podle jejich mechanismu účinku. Jsou to: 1. Inhibitory hexokinázy; 2. Látky zacílené na proteiny z rodiny Bcl-2; 3. Redox-aktivní látky inhibující thioly; 4. Látky zacílené na proteiny VDAC a ANT; 5. Látky cílící na elektronový redoxní řetězec; 6. Lipofilní látky cílené na vnitřní mitochondriální membránu; 7. Látky cílené na Krebsův cyklus; 8. Látky cílené na mitochondriální DNA. 9. Látky nezařazené do žádné z těchto skupin. Příklady těchto látek a místo jejich působení jsou uvedeny v obrázku 1.

Nádor prsu je velmi těžko léčitelné neoplastické onemocnění postihující v současné době jednu z osmi žen. K léčbě rakoviny prsu se běžně používá tamoxifen (TAX). Pro zhruba 30 % případů této choroby je typická vysoká hladina proteinu HER2, který patří do skupiny receptorových tyrosinových kináz a který zvyšuje proliferační schopnost buněk zvyšující jejich maligní potenciál (Arteaga CL et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. Nat Rev Clin Oncol. 2011;9:16–32.). Zavedená léčba, kdy hlavním používaným lékem je TAX je neúčinná, protože jsou vůči ní nádory s vysokou hladinou HER2 resistantní. TAX

působí na estrogenní receptory v plazmatické membráně buněk rakoviny prsu, čímž inhibuje důležité procesy pro proliferační vlastnosti rakovinné buňky. V nedávné době bylo publikováno, že TAX při vyšší koncentraci působí nejen přes estrogenní receptor, ale také zasahuje do mitochondriální vnitřní membrány, kde interaguje s komplexem I respiračního řetězce, který je umístěn právě ve vnitřní mitochondriální membráně (Moreira PI et al. Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. J Biol Chem 2006;281:10143–10152.). K tomuto ovšem dochází při farmakologicky nesnadno dosažitelných dávkách. Navíc lze při těchto vysokých dávkách očekávat zvýšenou toxicitu látky TAX.

Momentálně jsou nádory prsu s vysokou hladinou proteinu HER2 léčeny humanizovanou protilátkou trastuzumab, který inhibuje aktivitu HER2. Tato léčba je ekonomicky velmi náročná a vyznačuje se sekundární toxicitou; navíc významné procento pacientek s vysokou hladinou proteinu HER2 je vůči látce trastuzumab rezistentní (odhaduje se kolem 30 %). Problematická je i nedávno zavedená látka lapatinib, která se vyznačuje inhibicí receptorových tyrozinových kináz (Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. Nat Rev Cardiol 2010;7:564–575. Lin SX et al. Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. Nat Rev Endocrinol 2010;6:485–493. Ahn ER et al. Is the improved efficacy of trastuzumab and lapatinib combination worth the added toxicity? Breast Cancer 2012;6:191–207.). Problémem je, že lapatinib není specifickým inhibitorem HER2, což může vést k inhibici i dalších receptorových tyrozinových kináz a k sekundární toxicitě a lze předpokládat i reálný vývoj rezistence vůči této léčbě (Wetterskog D et al. Identification of novel determinants of resistance to lapatinib in ERBB2–amplified cancers. Oncogene 2013; 1–11).

CZ patent 304 553 popisuje nové izomery alkyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu, obecného vzorce I,



(I),

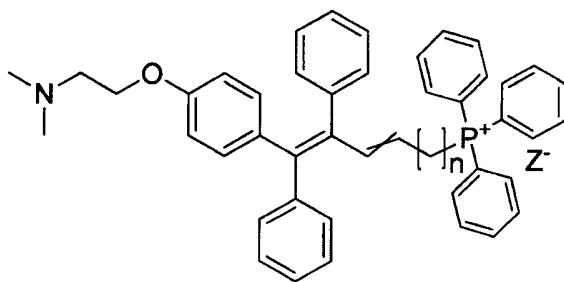
kde $n = 8$ až 12 , a kde Z je vybrané ze skupiny organických solí jako například citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganických solí jako například sulfát, halogenid, fosfát

a překřížená vazba v obecném vzorci I, nacházející se v subjednotce tamoxifenu zahrnuje uspořádání dvojné vazby jak v konfiguraci E tak Z,

které jsou účinné proti nádorům s vysokou hladinou proteinu HER2, a které cíleně působí přímo na mitochondrie, a které si poradí s výše uvedenými problémy.

Podstata vynálezu

Nyní autoři CZ patentu 304 553 připravili další novou skupinu látek, které jsou účinné proti nádorům s vysokou hladinou proteinu HER2, které cíleně působí přímo na mitochondrie, a které si poradí s výše uvedenými problémy. Jsou to E/Z izomery alkenyl trifenylfosfoniové deriváty tamoxifenu obecného vzorce IA,



(IA),

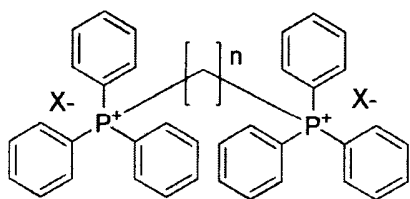
kde $n = 6$ až 10 ,

a Z je vybrané ze skupiny organických solí jako je citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganických solí jako je sulfát, halogenid nebo fosfát a/nebo jejich směsi,

a kde překřížená vazba v obecném vzorci IA, nacházející se v subjednotce tamoxifenu zahrnuje uspořádání dvojné vazby v konfiguraci E a/nebo Z,

a jejich odpovídající sole terciálního aminu vybrané ze skupiny organických solí jako je citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganických solí jako je sulfát, halogenid nebo fosfát a/nebo jejich směs.

Způsob přípravy alkenyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce IA podle vynálezu spočívá v tom, že se na alkyl bis(trifenylfosfonium) obecného vzorce VIII,

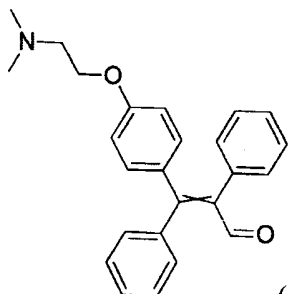


(VIII),

kde $n = 7$ až 11

a X je I, Br, Cl nebo mesyl nebo jejich kombinace,

ve směsi tetrahydrofuranu (THF) a dimethylsulfoxidu (DMSO) v atmosféře argonu při pokojové teplotě působí organickou bází (s výhodou lithium hexamethyldisilazanem). Vzniklý ylid se následně kondenzuje s aldehydem vzorce III



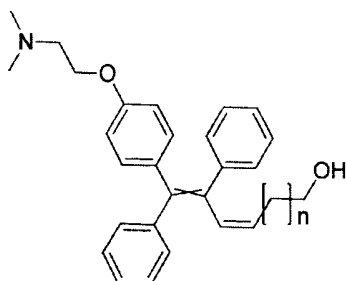
(III),

za vzniku alkenyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce IA.

Alkyl bis(trifenyl fosfonium) obecného vzorce VIII se připraví reakcí příslušného alkylu s tri-fenyl fosfinem za zvýšené teploty.

Autoři dále vylepšili způsob přípravy alkyl trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce I, a jejich odpovídajících solí terciálního aminu, vybraných ze skupiny organických solí

- jako například citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganických solí jako například sulfát, halogenid, fosfát a/nebo jejich směs, který podle tohoto vynálezu spočívá v tom, že se na aldehyd III působí (hydroxyalkyl)trifenylfosfonium bromidem v přítomnosti báze (s výhodou lithium hexamethyldisilazanem) při pokojové teplotě a při použití směsi THF a dimethylsulfoxidu (DMSO), která zvýší rozpustnost (hydroxyalkyl)trifenylfosfonium bromidu, za vzniku alkenolu obecného vzorce V,

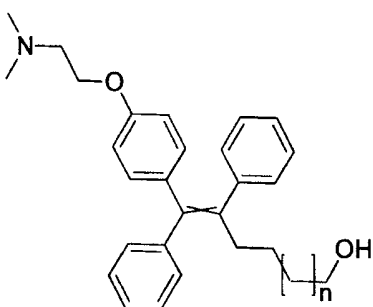


(V),

- kde $n = 5$ až 9 .

Jeho syntéza se tím oproti dříve navrženému postupu v patentu CZ 304 553 výrazně zkrátí a zlevní.

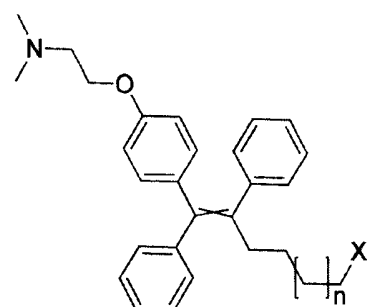
Alkenol obecného vzorce V se dále podle CZ patentu 304 553 v atmosféře vodíku a v přítomnosti katalyzátoru redukuje na alkohol obecného vzorce VI,



(VI),

kde $n = 5$ až 9 ,

alkohol obecného vzorce VI se substitucí převede na příslušný derivát obecného vzorce VII,

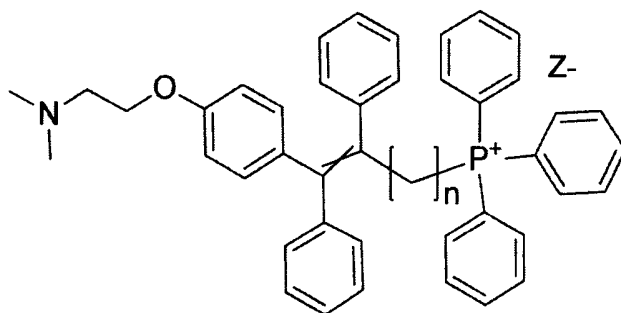


(VII),

kde $n = 5$ až 9

a X je I, Br, Cl nebo mesyl,

- který se zahříváním s trifenyl fosfinem převede na mitochondriálně cílený alkyl trifenylfosfoniový derivát tamoxifenu obecného vzorce I,



(I),

kde $n = 8$ až 12

a Z je citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganická sůl jako například sulfát, halogenid, fosfát a/nebo jejich směs

a překřížená vazba v obecném vzorci I, nacházející se v subjednotce tamoxifenu zahrnuje uspořádání dvojné vazby jak v konfiguraci E tak Z.

V případě použití alkenolu obecného vzorce V ve formě sole terciálního dusíku se zvýší výtěžek dalším výše uvedeným postupem získaného alkoholu obecného vzorce VI, ze kterého lze bez izolace látky obecného vzorce VII získat příslušnou sůl terciálního aminu trifenylyfosfoniového derivátu tamoxifenu obecného vzorce I.

Kationická skupina trifenylyfosfina (TPP^+) umožňuje interakci alkyl nebo alkenyl trifenylyfosfoniového derivátu tamoxifenu látky obecného vzorce I nebo IA s mitochondriemi. Tyto látky, které dále nazýváme MitoTAX byly připraveny adicí kationické skupiny alkyl- TPP^+ k látce TAX. V biologickém prostředí je pozitivní náboj na fosforu TPP^+ skupiny delokalizován, takže látka se chová neutrálně. Jedinou výjimkou jsou buněčné struktury s negativním potenciálem, což je vnitřní povrch plazmatické (buněčné) membrány a již výše zmíněná vnitřní mitochondriální membrána. V jejich blízkosti se náboj lokalizuje na fosforu a pozitivně nabitá TPP^+ skupina působí jako kotva, způsobující masivní koncentraci alkyl nebo alkenyl trifenylyfosfoniového derivátu tamoxifenu obecného vzorce I nebo IA (MitoTAX) na interfázi mitochondriální matrix a vnitřní membrány mitochondrie.

Část molekuly MitoTAXu, na jejímž konci je skupina TPP^+ , je orientována do mitochondriální matrix, přičemž biologicky aktivní část je ve vnitřní mitochondriální membráně, kde je lokalizováno molekulární zásahové místo látky MitoTAX, jímž je mitochondriální komplex I. Pro fyzickou interakci biologicky aktivní části MitoTAXu, s mitochondriálním komplexem I, který je součástí vnitřní mitochondriální membrány, je nutné, aby mezi biologicky aktivní částí molekuly MitoTAXu a TPP^+ skupinou byl alifatický řetězec o určité délce, zdá se, že není podstatné zda alifatický řetězec je alkyl nebo alkenyl- viz příklad 24. Z hlediska biologických a fyzikálně-chemických vlastností mitochondriální membrány se jako ideální jeví délka alifatického řetězce o délce 8 až 12 uhlíků.

MitoTAX je výrazně účinnější při zabíjení buněk nádoru prsu než původní TAX. Dalším velmi významným zjištěním je poznatek, že MitoTAX účinněji zabíjí buňky rakoviny prsu s vysokou expresí proteinu HER2 než buňky s nízkou expresí proteinu HER2. U TAXu je tomu přesně naopak, proto je klinicky vůči rakovině prsu s vysokým HER2 neúčinný. Důvodem zvýšené citlivosti látky MitoTAX vůči buňkám nádoru prsu s vysokou hladinou proteinu HER2 tkví pravděpodobně v lokalizaci tohoto proteinu HER2 také v mitochondriích, přičemž u buněk s nižší či velmi nízkou expresí HER2 je tento onkoprotein lokalizován v plazmatické membráně nádorové buňky.

Látka trastuzumab, která je používána k léčbě rakoviny prsu s vysokou hladinou proteinu HER2, je v řadě případů neúčinná. Pravděpodobným důvodem je skutečnost, že v případě vysoké hladiny proteinu HER2 je jeho značná část lokalizovaná v mitochondriích a při působení látky trastu-

zumab na nádorovou buňku se protein HER2 tím více přesouvá do mitochondrií. Rakovinná buňka tak „skrývá“ HER2 před látkou trastuzumab, který inhibuje jeho aktivitu. Mitochondriální asociace HER2 také mění mitochondriální metabolismus tak, že rakovinná buňka přechází na glykolýzu a lépe přežívá v prostředí chudém na živiny a kyslík.

Na rozdíl od látky trastuzumab MitoTAX vstupuje do buňky a akumuluje se v mitochondriích na základě negativního potenciálu na vnitřním povrchu vnitřní mitochondriální membrány. Buňky rakoviny prsu s vysokou hladinou proteinu HER2, v mnoha případech rezistentní k látce trastuzumab, jsou vůči látce MitoTAX citlivější.

Důležitou vlastností MitoTAXu, je účinná inhibice růstu spontánního nádoru prsu s vysokým HER2 v myším modelu, kdy je růst inhibován asi z 90 %, přičemž účinnost látky TAX je zhruba 20– až 30krát nižší. MitoTAX je vůči myším netoxický.

Nádory prsu jsou heterogenní z hlediska exprese proteinů HER2. Lze očekávat, že pouze část nádoru bude odpovídat na léčbu látkou trastuzumab, přičemž MitoTAX bude účinný. Zabíjí buňky jak s nízkou tak i s vysokou expresí proteinu HER2.

Jako mitokan, který působí na mitochondriální komplex II byl popsán vitamin E sukcinát (Dong LF et al. α -Tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II. *Oncogene* 2008;27:4324–4335. Dong LF et al. Suppression of tumour growth *in vivo* by the mitocan α -tocopheryl succinate requires respiratory complex II. *Clin Cancer Res* 2009;15:1593–1600.). V nedávné době jsme připravili a testovali látku, která vznikla adicí TPP+ skupiny k vitamin E sukcinátu. Tato nová látka cílí na stejné molekulární zásahové místo, jeho aktivita je ale vyšší než aktivita původního vitamin E sukcinátu díky zvýšené koncentraci této látky na interfázi vnitřní mitochondriální membrány a mitochondriální matrix. (Dong LF et al. Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J Biol Chem* 2011;286:3717–3728. Dong LF et al. Mitochondrial targeting of α -tocopheryl succinate enhances its pro-apoptotic efficacy: A new paradigm of efficient anti-cancer therapy. *Free Radic Biol Med* 2011;50:1546–1555. Rohlena J et al Mitochondrially targeted α -tocopheryl succinate is antiangiogenic: Potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing. *Antiox Redox Signal* 2011;15:2923–2935.). Podobně jako vitamin E sukcinát s adicí TPP+ skupiny se i látka MitoTax zvýšenou měrou akumuluje na interfázi vnitřní mitochondriální membrány a mitochondriální matrix. MitoTAX podle předkládaného vynálezu však zasahuje do mitochondriálního komplexu I, čímž se mění jeho spektrum účinků oproti TAX, který působí převážně na estrogenní receptory v plazmatické membráně buněk rakoviny prsu, čímž inhibuje jejich aktivitu důležitou pro proliferaci vlastnosti rakovinné buňky.

MitoTAX obecného vzorce IA stejně jako obecného vzorce I se akumuluje v mitochondriích, vyvolává buněčnou smrt selektivně v rakovinných buňkách, jejichž mitochondrie mají vyšší negativní potenciál ve srovnání s mitochondriemi normálních buněk. Zabíjí velmi účinně buňky rakoviny prsu s vysokým HER2 a je účinný proti rakovině prsu s vysokým HER2, kdy cílovým místem pro MitoTAX je mitochondriální komplex I (viz Obr. 1).

MitoTax lze použít k přípravě léčiva pro léčbu neoplastických chorob, zejména karcinomů, sarkomů, lymfomů a leukemií, pro onemocnění vybraná ze skupiny:

astrocytom, neuroblastom, glioblastom, mesotheliom, nádor prostaty, nemalobuněčný nádor plic, nádor děložního čípku, osteosarkoma, kolorektální nádor, hepatokarcinoma, leukémie.

Seznam použitých zkratk:

DCM	dichlormethan
DMSO	dimethylsulfoxid
ER α	estrogenní receptor- α

ESI MS hmotnostní spektrometrie s ionizací elektron sprejem

HER2 human epidermal growth factor receptor 2

LiHMDS lithium hexamethyldisilazan

MitoTAX mitochondriálně cílený tamoxifen

5 NMR nukleární magnetická rezonance

TAX tamoxifen

THF tetrahydrofuran

TLC chromatografie na tenké vrstvě

10

Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje klasifikaci jednotlivých tříd mitokanů, potenciálně protirakovinných látek působících na mitochondrie.

15

Obr. 2 znázorňuje vliv účinků různých derivátů MitoTAXu na apoptózu rakovinných buněk MCF7 (A) a MCF7 HER2⁺ (B).

20

Příklady uskutečnění vynálezu

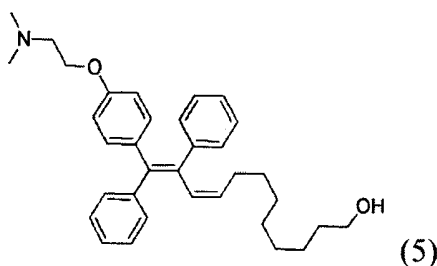
Příklad 21

25

Látku vzorce V lze získat přímo z látky vzorce III reakcí s (9-hydroxynonyl)trifenylfosfonium bromidem místo s (9-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)nonyl)trifenylfosfonium bromidem. Syntéza se proti CZ patentu 304 553 zkrátí a zlevní. Hlavní změnou je použití směsi THF a DMSO, čímž se zvýší rozpustnost a reakci lze provést přímo s (9-hydroxynonyl)trifenylfosfonium bromidem, což bylo v samotném THF nemožné. Postup je proveden za pokojové teploty místo -78 °C. Vý-

30

Příprava látky vzorce 5



35

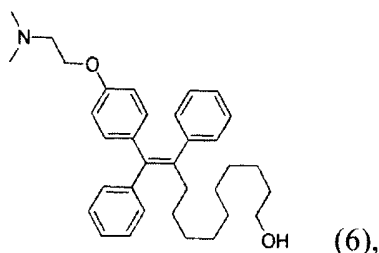
(9-hydroxynonyl)trifenylfosfonium bromid (3,920 g, 8,082 mmol) se rozpustí v DMSO (10 ml) a poté se přidá THF (30 ml). Do reakční směsi se po dobu 3 minut přikapává roztok LiHMDS (14,800 ml, 1M v THF). Barva reakční směsi se změní na výrazně oranžovou. Poté se do reakční směsi přikape roztok aldehydu vzorce III (1,000 g, 2,694 mmol) v THF (15 ml) a reakce se nadále míchá po dalších deset minut při laboratorní teplotě. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC ve směsi chloroform – methanol (10:1). Reakční směs se nalije do studeného nasyceného roztoku chloridu amonného (100 ml) a extrahuje se diethyletherem (5x 100 ml). Spojené organické vrstvy se suší nad síranem hořečnatým. Sušidlo se zfiltruje a produkt se zakoncentruje pod vakuem. Surový materiál se rozpustí v diethyletheru (10 ml) a po kapkách se přidá nasycený éterový roztok HCl (5 ml). Precipitovaný produkt se zfiltruje a extrahuje roztokem NaOH (5 ml, 1M) a diethyletherem (25 ml). Organická vrstva se suší nad síranem hořečnatým. Sušidlo se zfiltruje a

45

produkt se zakoncentruje pod vakuem. Tímto postupem, se získá 1,102 g (82 %) produktu vzorce 5 ve formě slabě nažloutlého oleje, který je tak připraven pro další reakce.

5 Příklad 22

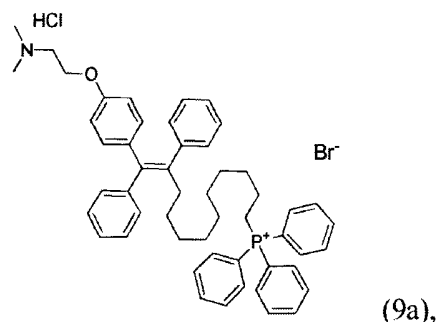
V případě použití alkenolu vzorce 5 ve formě sole terciálního dusíku se redukcí získá alkohol vzorce 6,



ze kterého lze bez izolace jednotlivých stupňů získat příslušnou sůl terciálního aminu trifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu vzorce 9a. Zvýší se výtěžek a zkrátí se doba přípravy proti CZ patentu 304 553.

15 Příprava látky vzorce 9a

K alkoholu vzorce 6 (300 mg, 0,600 mmol) rozpuštěnému v diethyléteru (6 ml) se přidá nasycený éterový roztok HCl (6 ml), směs se zakoncentruje pod vakuem a znovu rozpustí v DCM (6 ml). K reakční směsi se přidá CBr₄ (298 mg, 0,901 mmol) a po jeho úplném rozpuštění se přidá ještě trifenylfosfin (252 mg, 960 mmol). Reakce se ukončí za 5 minut přidáním methanolu (1 ml) a nasyceného éterového roztoku HCl (3 ml). Roztok se zakoncentruje pod vakuem a přidá se trifenylfosfin (2,000 g, 7,625 mmol). Reakční směs se míchá přes noc při teplotě 100 °C. Směs se zchladí na pokojovou teplotu a rozpustí se v DCM (10 ml). Roztok se za stálého míchání přikape do ledovou lázní chlazeného roztoku diethyléteru (100 ml). Vzniklý precipitát se zfiltruje a usuší pod vakuem. Takto se získá 334 mg (74 %) produktu vzorce 9a ve formě bílé slabě olejovité pevné látky. Produkt může být přečištěn opakovaným rozpuštěním v DCM (2 ml) a následným vysrážením v diethyléteru (20 ml).

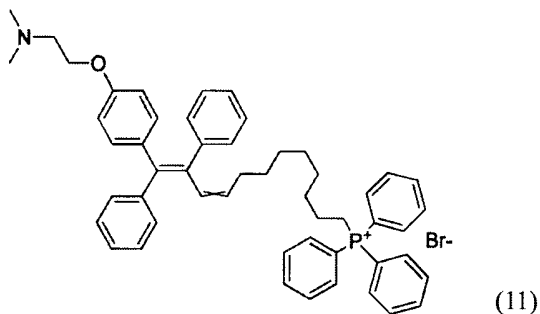


Příklad 23

35 Příprava látky vzorce 11 – isomerního decenyl trifenylfosfoniového derivátu tamoxifenu

Nonan-1,9-diylbis(trifenylfosfonium)bromid se připraví působením trifenylfosfinu na 1,9-dibromnonan v roztoku dimethylformamidu při teplotě 100 °C po dobu 16 hodin a následnou krystalizací z ethylacetátu.

- Nonan-1,9-diylbis(trifenylfosfonium)bromid (545 mg, 674 mmol) se rozpustí v DMSO (1 ml) a poté se přidá THF (3 ml). Do reakční směsi se po dobu 3 minut přikapává roztok LiHMDS (670 μ l, 1M v THF). Barva reakční směsi se změní na výrazně oranžovou. Poté se do reakční směsi přikape roztok aldehydu vzorce III (100 g, 2,269 mmol) v THF (1 ml) a reakce se nadále
 5 míchá po dalších deset minut při pokojové teplotě. Průběh reakce se monitoruje pomocí TLC ve směsi chloroform – methanol (10:1). Reakční směs se nalije do studeného nasyceného roztoku chloridu amonného (10 ml) a extrahuje se dichlormethanem (5x 20 ml). Spojené organické vrstvy se suší nad síranem hořečnatým. Sušidlo se zfiltruje a produkt se zakoncentruje pod vakuem. Chromatografií koncentráту na sloupci silikagelu v systému chloroform/metanol (gradient 0 až
 10 10 %) se získá 56 mg (30 %) požadovaného produktu vzorce 11.



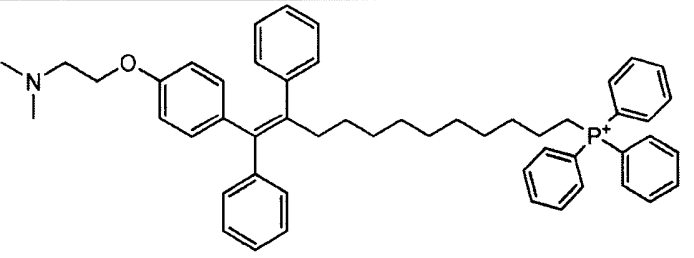
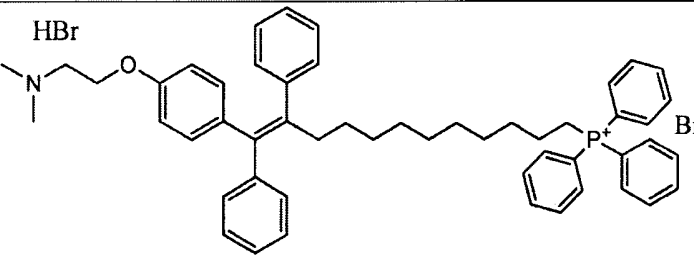
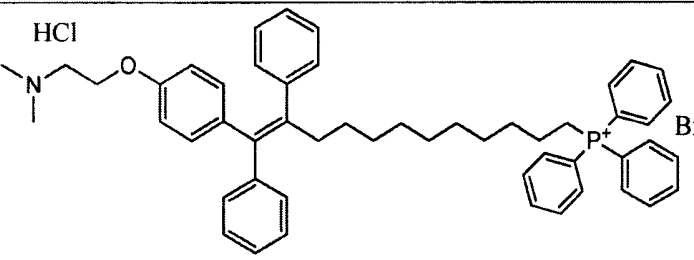
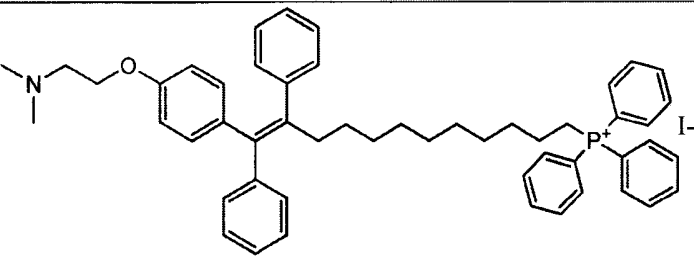
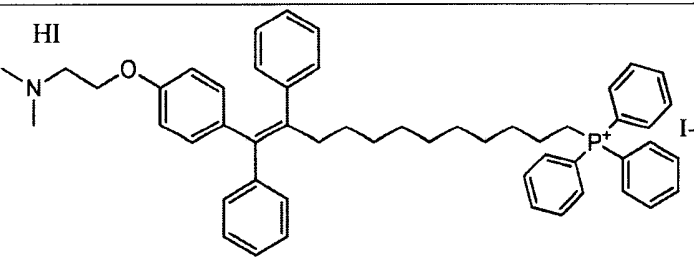
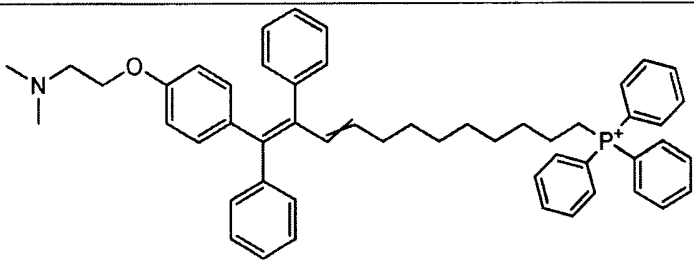
- ^1H NMR (400 MHz, cdCl_3) δ 8,00 – 7,52 (m, 15H), 7,25 – 7,11 (m, 6H), 7,11 – 6,96 (m, 4H),
 15 6,72 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 6,53 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 6,00 (d, J = 11,5 Hz, 1H), 5,26 (dt, J = 11,5,
 7,4 Hz, 1H), 4,02 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 3,80 – 3,53 (m, 2H), 2,88 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 2,42 (s, 6H),
 2,06 – 1,79 (m, 2H), 1,64 – 1,36 (m, 4H), 1,38 – 1,05 (m, 4H), 1,06 – 0,73 (m, 4H). ESI MS: 742.

- Biologické srovnávací testy mitochondriálně cíleného alkyl a alkenyl trifenylfosfoniového deri-
 20 vátu tamoxifenu (MitoTAX).

Příklad 24

- Na obr. 2 je znázorněn účinek alkyl a alkenyl trifenylfosfoniových derivátů MitoTAXu, jak je
 25 ukázáno v Tabulce 3, na apoptózu buněk rakoviny prsu MCF7 (A) a sublinie buněk MCF7 se
 zvýšenou hladinou proteinu HER2 (B). Procento apoptotických buněk bylo stanoveno na základě
 barvení indikátoru apoptózy annexinu V metodou průtokové cytometrie. Buňky MCF7 a MCF7
 HER2⁺ byly vystaveny jednotlivým derivátům MitoTAXu v koncentraci 2 μ M po dobu 24 hodin.
 30 Sloupec „CTRL“ označuje procento apoptotických buněk v populaci buněk bez přidání testova-
 ných látek a odpovídá tak bazální hladině apoptózy v testovaných liniích. Všechny testované
 deriváty MitoTAXu vyvolávají apoptózu.

Tabulka 3

Látka vzorce 9	
Látka vzorce 9a	
Látka vzorce 9b	
Látka vzorce 10	
Látka vzorce 10a	
Látka vzorce 11	

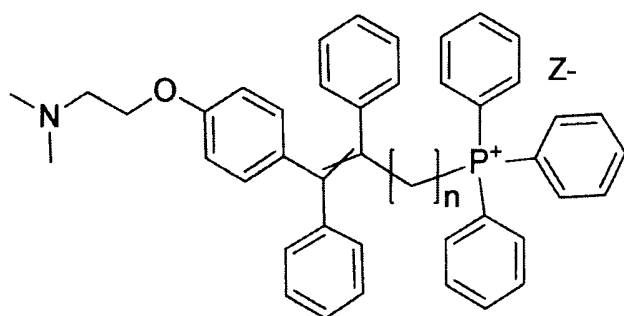
Závěrem lze říci, že jsme připravili zcela nové látky, které vycházejí z látky TAX, což je běžně používané terapeutikum k léčbě rakoviny prsu, onemocnění, které je na vzestupu (DeSantis C et al. Breast cancer statistics, 2011. CA Cancer J Clin 2011;1:409–4018.). Výše popsané alkyl a alkenyl trifenylofosfoniové deriváty tamoxifenu (MitoTAX) dle vynálezu se přednostně akumulují v mitochondriích, kde je jejich zásahové místo komplex I. Interakcí MitoTaxu s komplexem I dojde k přerušení toku elektronů, které reagují s molekulárním kyslíkem. Tím dojde ke vzniku kyslíkových radikálů, které pak vyvolají buněčnou smrt. MitoTAX je účinný vůči nádorům prsu s nízkou i vysokou hladinou proteinu HER2, který velmi komplikuje dosavadní způsoby léčby. MitoTAX může doplnit či nahradit v léčbě nádorů jak látku TAX tak i látku trastuzumab.

Průmyslová využitelnost

Nové deriváty tamoxifenu, obecného vzorce I a IA podle vynálezu jsou využitelné k léčbě rakoviny ve zdravotnictví a ve farmaceutickém průmyslu k přípravě léků pro léčbu rakoviny.

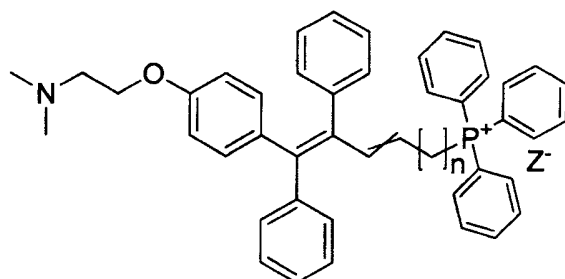
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy mitochondriálně cílených E a/nebo Z izomerů přes alifatický řetězec vázaných trifenylofosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce I



(I),

kde $n = 8$ až 12 ,
a obecného vzorce IA



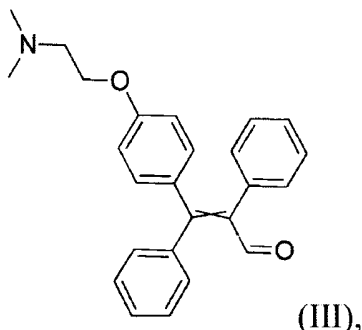
(IA),

kde $n = 6$ až 10 ,
a Z je vybrané ze skupiny organických solí jako je citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganických solí jako je sulfát, halogenid nebo fosfát a/nebo jejich směs,
a kde překřížená vazba v obecném vzorci I a IA, nacházející se v subjednotce tamoxifenu zahrnuje uspořádání dvojné vazby v konfiguraci E a/nebo Z,

a jejich odpovídající sole terciálního aminu vybrané ze skupiny organických solí jako je citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganických solí jako je sulfát, halogenid nebo fosfát a/nebo jejich směs,

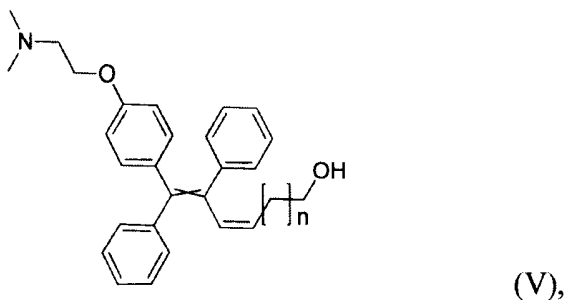
vyznačující se tím, že se na aldehyd vzorce III

5



působí (hydroxyalkyl)trifenylfosfonium bromidem a bází při pokojové teplotě ve směsi tetrahydrofuranu a dimethylsulfoxidu, za vzniku alkenolu obecného vzorce (V)

10

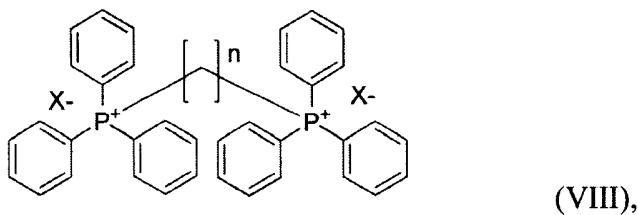


kde $n = 5$ až 9 ,

který se dále v atmosféře vodíku v přítomnosti katalyzátoru redukuje na alkohol, který se působením CBr_4 a trifenylfosfinu převede na alkyl trifenylfosfoniový derivát tamoxifenu obecného vzorce I,

15

nebo se aldehyd vzorce III kondenzuje s ylidem, který se připraví působením organické báze na alkyl bis(trifenylfosfonium) obecného vzorce VIII



20

kde $n = 7$ až 11

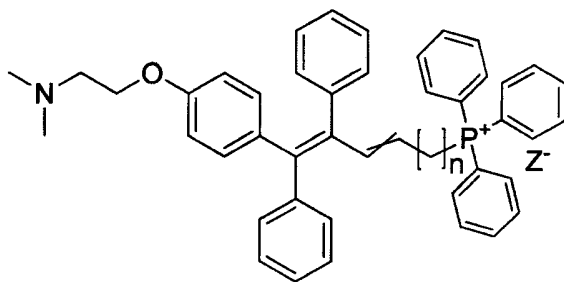
a X je I, Br, Cl nebo mesyl nebo jejich kombinace,

ve směsi tetrahydrofuranu a dimethylsulfoxidu v atmosféře argonu při pokojové teplotě, výsledkem kondenzace aldehydu vzorce III s ylidem je alkenyl trifenylfosfoniový derivát tamoxifenu obecného vzorce IA.

25

2. Mitochondriálně cílený E a/nebo Z izomer přes alifatický řetězec vázaných trifenylfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce IA

30



(IA),

kde $n = 6$ až 10 ,

a Z je vybrané ze skupiny organických solí jako je citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganických solí jako například sulfát, halogenid nebo fosfát a/nebo jejich směs,

a kde překřížená vazba v obecném vzorci IA, nacházející se v subjednotce tamoxifenu zahrnuje uspořádání dvojné vazby v konfiguraci E a/nebo Z,

a jejich odpovídající sole terciálního aminu vybrané ze skupiny organických solí jako je citrát, acetát, laktát, tartarát, oxalát, askorbát, mesylát, tosylát nebo anorganických solí jako je sulfát, halogenid nebo fosfát a/nebo jejich směs.

3. Použití mitochondriálně cílených E a/nebo Z izomerů alkenyl trifenylyfosfoniového derivátu tamoxifenu obecného vzorce IA podle nároku 2, nebo jejich směsi s alkyl trifenylyfosfoniovými deriváty tamoxifenu obecného vzorce I k přípravě léčiva pro léčbu neoplastických chorob.

4. Použití podle nároku 3 k přípravě léčiva pro léčbu karcinomů, sarkomů, lymfomů a leukemií.

5. Použití podle nároku 3 k přípravě léčiva pro léčbu nádorových onemocnění vybraných ze skupiny: astrocytom, neuroblastom, glioblastom, mesotheliom, nádor prostaty, nemalobuněčný nádor plic, nádor děložního čípku, osteosarkoma, kolorektální nádor, hepatokarcinoma, leukémie.

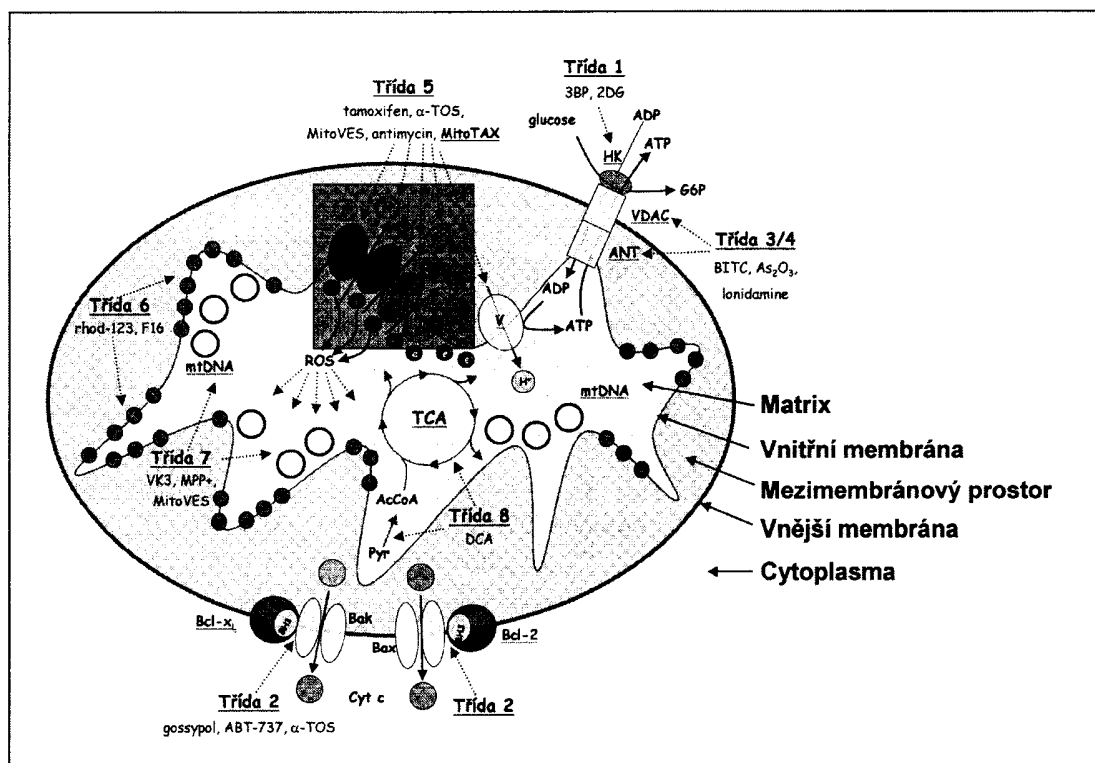
6. Použití mitochondriálně cílených E/Z izomerů alkenyl trifenylyfosfoniových derivátů tamoxifenu obecného vzorce IA podle nároku 2, nebo jejich směsi s alkyl trifenylyfosfoniovými deriváty tamoxifenu obecného vzorce I k přípravě léčiva pro zabíjení rakovinných buněk v různých oblastech nádoru prsu bez ohledu na rozdílnou hladinu proteinů jako jsou HER2, ER α , GATA3 či Ki67.

7. Léčivo pro léčení neoplastických chorob, **vyznačující se tím**, že obsahuje nejméně jeden E/Z izomer alifatického trifenylyfosfoniového derivátu tamoxifenu obecného vzorce IA, podle nároku 2.

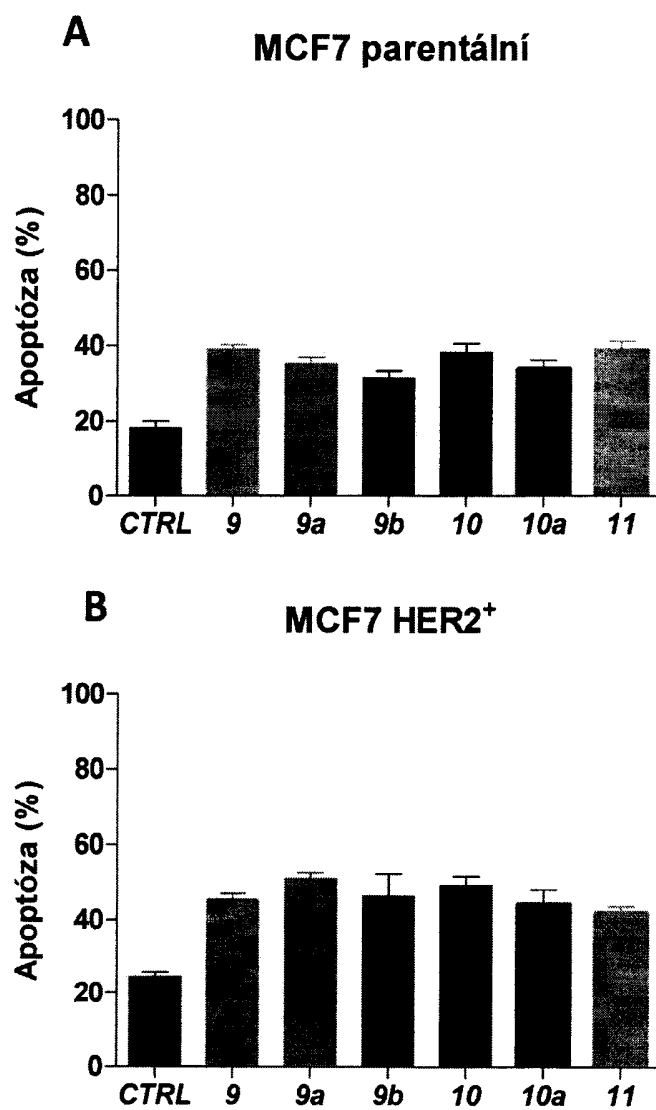
8. Léčivo podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že neoplastickou chorobou je rakovina s nízkou a/nebo vysokou hladinou proteinu HER2 v nádorových buňkách jiných než jsou nádory prsu.

2 výkresy

Obr 1.



Obr. 2



Konec dokumentu
