

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227790**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **413516**

(22) Data zgłoszenia: **13.08.2015**

(51) Int.Cl.

C07F 9/40 (2006.01)

C07J 63/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Fosfoniany acetylenowych pochodnych betuliny o działaniu przeciwnowotworowym,
sposób ich wytwarzania i zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
27.02.2017 BUP 05/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:

**ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W KATOWICACH, Katowice, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**STANISŁAW BORYCZKA, Sosnowiec, PL
ELWIRA CHROBAK, Katowice, PL
MAŁGORZATA LATOCHA, Katowice, PL
MONIKA KADELA, Katowice, PL
EWA BĘBENEK, Dąbrowa Górnicza, PL**

(74) Pełnomocnik:

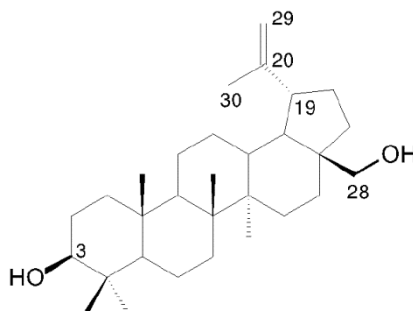
rzecz. pat. Michał Wróblewski

PL 227790 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są fosfoniany acetylenowych pochodnych betuliny o działaniu przeciwnowotworowym, sposób ich wytwarzania i zastosowanie.

Betulina [lup-20(29)-en-3 β ,28-diol] jest powszechnie występującym w przyrodzie triterpenem pentacyklicznym typu lupanu. Duże jej ilości znajdują się w zewnętrznej warstwie kory białych gatunków brzozy (zawartość 25–30%), stąd też kora stanowi łatwo dostępny surowiec, jako produkt uboczny w fabrykach papieru, do otrzymywania betuliny w procesie ekstrakcji nie wymagającym wielkich nakładów finansowych, nawet na skalę przemysłową (US Pat 6392070B1). Betulina i łatwo otrzymywane z niej pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, takie jak: przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, hepatoprotective, przeciwkamicze i inne, które pojawiają się przy bardzo niskich stężeniach przy braku toksyczności zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (T.G. Tolstikova, I.V. Sorokina, G.A. Tolstikov, O.B. Flekhter, Russ. J. Bioorg. Chem., 2006, 32, 37–49; T.G. Tolstikova, I.V. Sorokina, G.A. Tolstikov, O.B. Flekhter, Russ. J. Bioorg. Chem., 2006, 32, 261–276; S. Alakurtti, T. Mäkelä, S. Koskimies, J. Yli-Kauhaluoma, Eur. J. Pharm. Sci., 2006, 29, 1–13). Dzięki tym cechom betulina (wzór 1), znana od ponad 200 lat, posiadająca dwie grupy hydroksylowe przy C-3 i C-28 oraz grupę izopropenylową przy C-19, stanowi bardzo dobry materiał wyjściowy do otrzymywania nowych pochodnych o lepszych właściwościach farmakologicznych i prace takie podejmowane są w wielu ośrodkach naukowych na świecie, o czym świadczy ilość ukazujących się publikacji.



Wzór 1

Betulinę można łatwo utlenić do kwasu betulonowego, z którego po selektywnej redukcji grupy ketonowej przy atomie C-3 otrzymuje się kwas betulinowy (kwas 3 β -hydroksy-lup-28(29)en-28-owy) o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej (ED₅₀ = 0,5-4,0 μ g/ml), szczególnie na niektóre chemiooporne nowotwory, takie jak czerniaki i glejaki. Mechanizm działania kwasu betulinowego polega na indukowaniu apoptozy tylko w komórkach chorych. Dzięki temu wykluczona może być część niekorzystnych efektów ubocznych związanych z chemioterapią przeciwnowotworową (R. Mukherjee, V. Kumar, S. K.Srivastava, S.K. Agarwal, A.C. Burman, Anti-Cancer Agents Med. Chem., 2006, 6, 271–279, EP1266658A2, US6048847A).

Znane syntetyczne modyfikacje betuliny, kwasu betulinowego i kwasu betulonowego obejmują otrzymywanie takich pochodnych jak: monoftalan, diftalan, bursztynian, dioctan, dipropionian, dimaślan, mono- i dinikotynian, acetylosalicylan, cynamonian, a także pochodne amidowe, cukrowe, aminokwasowe, karbaminianowe i N-acyloheterocykliczne, które zostały opisane m.in. w publikacjach: O.B. Flekhter, L.T. Karachurina, L.R. Nigmatullina, T.A. Sapozhnikova, L.A. Baltina, F.S. Zarudii, F.Z. Galin, L.V. Spirikhin, G.A.Tolstikov, O.A.Plyasunova, A.G.Pokrovskii, Russ. J. Bioorg. Chem., 2002, 28, 494–500; O.B. Flekhter, N.I. Medvedeva, L.T. Karachurina, L.A. Baltina, F.Z. Galin, F.S. Zarudii, G.A. Tolstikov, Pharm. Chem. J., 2005, 39, 401–404; S. Alakurtti, T. Mäkelä, S. Koskimies, J. Yli-Kauhaluoma, Eur. J. Pharm. Sci., 2006, 29, 1–13; D.S.H.L. Kim, J.M. Pezzuto, E. Pisha, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 1707–1712; F. Soler, C. Poujade, M. Evers, J-C. Carry, Y. Henin, A. Bousseau, T. Huet, R. Pauwels, E. De Clercq, J-F. Mayaux, J-B. Fe Pecq, N. Dereu, J. Med. Chem., 1996, 39, 1-69-1083; Y. Kashiwada, J. Chiyo, Y. Ikeshiro, T. Nagao, H. Okabe, L.M. Cosentino, K. Fowke, K.H. Lee, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2001, 11, 183–185; Y. Kashiwada, M. Sekiya, Y. Ikeshiro, T. Fujioka, N.R. Kilgore, C.T. Wild, G.P. Allaway, K.H. Lee, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004, 14, 5851–585; M. Kvasnica, J. Sarek, E. Klinotova, P. Dzubak, M. Hajduch, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, 13,

3447–3454: R.H. Cichewicz, S.A. Kouzi, *Med. Chem. Rev.*, 2003, 24, 90–114; I. Baglin, A-C. Mitaine-Offer, M. Nour, K. Tan, C. Cave, M-A. Lacaille-Dubois, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2003, 3, 525–539; G.A. Tolstikov, O.B. Flekhter, E.E. Shultz, L.A. Baltina, A.G. Tolstikov, *Chem. Sustain. Develop.*, 2005, 13, 1–29, H. Kommera, G.N. Kaluderović, S. Dittrich, J. Kalbitz, B. Dräger, T. Mueller, R. Paschke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20, 3409–3412, R.C. Santos, J.A.R. Salvador, S. Marin, M. Cascante, J.N. Moreira, T.C.P. Dinis, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18, 4385–4396, a także przedstawione w opisach patentowych: US5679828, US5468888, Jap.01143 832, US6172110, WO 2004/028455A2, US6048841, WO2006/105356A2, US6407270B1, WO 2006/133314A2, WO2007/141392A2, WO2008/070347A2, US2003/0181429A1, US6403816 B1, US6228850 B1, WO2006/085334A2.

Pomimo, że betulina i jej syntetycznie zmodyfikowane pochodne posiadają interesujące właściwości farmakologiczne, dotychczas nie udało się opracować i wprowadzić na rynek farmaceutyczny skutecznych leków przeciwnowotworowych z tej grupy związków. Jednym z najbardziej obiecujących cytostatyków jest kwas betulinowy, który obecnie znajduje się w fazie zaawansowanych badań klinicznych (G.A. Tolstikov, O.B. Flekhter, E.E. Shultz, L.A. Baltina, A.G. Tolstikov, *Chem. Sustain. Develop.*, 2005, 13, 1-29).

Wiązanie potrójne węgiel-węgiel uważane jest za jedną z ważniejszych grup funkcyjnych w chemii organicznej i chemii medycznej. Wynika to z faktu, że tego typu farmakofores łatwo ulega wielu przemianom, występuje w związkach pochodzenia naturalnego, a także w znaczący sposób modyfikuje właściwości biologiczne związku. Na szczególną uwagę zasługują mono- lub dipodstawione pochodne otrzymane w wyniku reakcji betuliny z kwasem propiolowym lub chloromrówczanem propargilu o wysokiej aktywności cytotoksycznej na komórki CCRF/CEM białaczki ludzkiej i P388 białaczki mysiej, w porównaniu z cisplatyną (S. Boryczka, E. Bębenek, J. Wietrzyk, K. Kempieńska, M. Jastrzębska, J. Kusz and M. Nowak, *Molecules*, 2013, 18, 4526–4543). W pracy Y. Bi, J. Xu, X. Wu, W. Ye, S. Yuan, L. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, 17, 1475–1478 opisano estry: propargilowy i 2-butylny kwasu 23-hydroksybetulinowego o aktywności cytotoksycznej zbliżonej do kwasu 23-hydroksybetulinowego.

R. Csuk i współpracownicy opisali syntezę 3-propargiloaminowych pochodnych kwasu betulinowego, które wykazują wyższą aktywność cytotoksyczną w stosunku do linii komórek A549 raka płuc niż wyjściowy kwas betulinowy (R. Csuk, C. Nitsche, R. Szepek, S. Schwarz, and B. Siewert, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2013, 346, 232–246). Pochodne acetylenowe betuliny zostały przekształcone w nowe triazolowe pochodne, które również wykazują aktywność cytotoksyczną (R. Csuk, A. Barthel, R. Kluge, D. Ströhlet, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18, 7252–7259, R. Csuk, A. Barthel, R. Szepek, B. Siewert, S. Schwarz, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2011, 1, 37–49).

Kolejny znany opis literaturowy: S.F. Vasilevsky, A.I. Govdi, E.E. Shults, M.M. Shakirov, I.V. Sorokina, T.G. Tolstikova, D.S. Baev, G.A. Tolstikov, I.V. Alabugin, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17, 5164–5169; S.F. Vasilevsky, A.I. Govdi, E.E. Shults, M.M. Shakirov, I.V. Alabugin, G.A. Tolstikov, *Doklady Chem.*, 2009, 424, 39-42 dotyczy syntezy amidów aryloalkinylowych kwasu betulonowego o właściwościach hepatoprotekcyjnych i przeciwpalnych.

Aktywność przeciwwirusową porównywalną z AZT opisano dla estru propargilowego berivimatu (I.D. Bori, H-Y. Hung, K. Qian, C-H. Chen, S. L. Morris-Natschke, K-H. Lee, *Tetrahedron Lett.*, 2012, 53, 1987–1989).

Amerykański opis patentowy US2003/0181429A1 przedstawia pochodne kwasu 3-alkinyloaminobetulinowego i kwasu 3-(alkinyloksymino)-betulinowego jako składniki mieszanin mogących mieć zastosowanie w prewencji i hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych o aktywnościach zbliżonych do kwasu betulonowego.

Opisy patentowe WO2006/105356A2, US6407270B1, US6867314 B2 i US2003/0073858A1 dotyczą syntezy mono- i diestrów kwasu betulonowego, aldehydu betulonowego zawierających również grupy alkinyłowe (C₂-C₁₀). Jako czynniki acylujące wykorzystuje się trudno dostępne chlorki, bezwodniki i kwasy acetylenowe. Reakcje przeprowadza się w temperaturach podwyższonych, co może niekorzystnie wpływać na stabilność podstawników acetylenowych w końcowych produktach.

Fosfoniany są związkami powszechnie występującymi w organizmach żywych pełniąc różnorodne funkcje, między innymi stanowią grupę związków o działaniu antybiotycznym. Ważnym antybiotykiem o szerokim zastosowaniu jest fosfomycyna wyizolowana z różnych szczepów *Streptomyces*. Wykazuje ona silne działanie na bakterie Gram-ujemne i bakterie Gram-dodatnie (N. Roussos, D.E. Karageorgopoulos, G. Samonis, M.F. Falagas, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009, 34, 506–515). Antybiotykiem posiadającym aktywność przeciwmalaryczną jest fosmidomycyna (B. Lell, R. Ruangweeraayut,

J. Wiesner, M. Anoumou Missinou, A. Schindler, T. Baranek, M. Hintz, D. Hutchinson, H. Jomaa, and P.G. Kremsner, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 735–738).

W efekcie poszukiwań nowych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym otrzymano i opisano fosfonowe pochodne chromenu (M. Rajasekhar, K.U.M. Rao, C.S. Sundar, N.B Reddy, S.K Nayak, C.S Reddy, *Chem. Pharm. Bull.* 2012; 60, 854–858), a także estry difenylowe α -hydroksy alkilo- i arylofosfonianów (A.M.F. Phillips, M.T. Barros, M. Pacheco, R. Dias, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24, 49–53).

Do leczenia wprowadzono fosfoniany o działaniu przedwirusowym, takie jak: cidofowir, foscarnet, tenofowir czy adefowir (K.K. Biron, *Antiviral. Research* 2006, 71, 154–163; M. Dracinsky, M. Krecmerova, A. Holy, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 6778–6782). Cidofowir wykazuje aktywność przeciwko szerokiemu spektrum wirusów DNA, jest aktywny przeciwko HSV-1, HSV-2, wirusowi Epstein-Barr, silnie hamuje rozwój ludzkich Herpes wirusów (HHV-6, HHV-7, HHV-8), TK- HSV, TK-Vari-cella-Zoster. Jest również aktywny przeciwko adenowirusom, papilomawirusom, pokswirusom i parapokswirusom (P. Broganelli, A. Chiaretta, B. Fragnelli, M.G. Bernengo, *Dermatol. Ther.*, 2012, 25, 468–471.)

Amerykański opis patentowy (US2013/0225532A1) przedstawia związki fosfonowe aktywne przeciwko dzikim szczepom wirusa grypy ludzkiej i ptasiej H1N1, H5N1 i H3N2 opornym na oseltamiwir.

Od wielu lat w leczeniu osteoporozy stosuje się pochodne bisfosfonianów takie jak: alendronian, etidronian, ibandronian, kłodronian, pamidronian, rizedronian, tiludronian i zoledronian (H. Fleisch., *Endocr. Rev.*, 19 1998 80–100).

Ważną grupę pochodnych fosfonowych stanowią hydroksyfosfoniany wśród których opisano inhibitory ludzkiej reniny wykazujące działanie obniżające ciśnienie tętnicze (J.F. Dellaria, Jr., R.G. Maki, H.H. Stein, J. Cohen, D. Whittern, K. Marsh, D.J. Hoffman, J.J. Plattner, T.J. Perun, *J. Med. Chem.*, 1990, 33, 534–542; D.V. Patel, K. Rielly-Gauvin, D.E. Ryono, C.A. Free, W.L. Rogers, S.A. Smith, J.M. DeForrest, E.W. Oehl, E.W. Petrillo Jr., *J. Med. Chem.*, 1995, 38, 4557–4569).

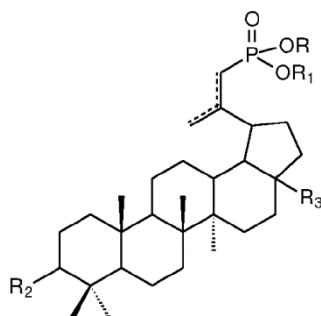
W ostatnich latach prowadzone są także badania aktywności przeciwnowotworowej pochodnych α -aminofosfonowych, a także fosfonianów, które są już stosowane jako leki np. foscarnet i bisfosfoniany (K.A. Mungara, Y-K. Park, K.D. Lee, *Chem. Pharm. Bull.*, 2012; 60, 1531–1537; C.B. Reddy, K.S. Kumar, M.A Kumar, M.V.N. Reddy, B.S. Krishna, M. Naveen, M.K. Arunasree, C.N. Reddy, C.N. Raju, C.D. Reddy, *Eur J. Med. Chem.* 2012; 47, 553–559; K. Rose, *Biomed. Pharmacother.* 2013, 67:53-57, E.D. Carlo, P. Bocca, L. Emionite, M. Cilli, G. Cipollone, F. Morandi, L. Raffaghello, V. Pistoia, I. Prigione, *Am. Soc. Gen. Cell Ther.* 2013; 21:1034–1043).

Pomimo tych cennych właściwości fosfonianów, mało uwagi poświęcono dotychczas modyfikacjom chemicznym betuliny i jej pochodnych z wykorzystaniem fosfonowych grup farmakoforowych. Jak dotąd nie opisano w literaturze chemicznej żadnych pochodnych betuliny zawierających w swojej strukturze ugrupowania fosfonowe. Wprowadzenie grupy fosfonowej, jako bioizosterycznej do fosforanowej, pozwala uniknąć pierwszego etapu fosforylacji i zapewnić jednocześnie trwałość fosfonianów w warunkach hydrolizy enzymatycznej. Wolne kwasy fosfonowe ze względu na duży ładunek ujemny ugrupowania fosforylowego słabiej przenikają przez błony biologiczne w porównaniu do odpowiednich estrów fosfonowych. Dlatego coraz większego znaczenia w projektowaniu nowych fosfonianów ma synteza estrów kwasów fosfonowych.

Celem niniejszego wynalazku jest wytworzenie nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym, których budowa oparta jest o strukturę cząsteczki betuliny i jej pochodnych z grupami fosfonowymi a także, dodatkowo z acetylenowymi ugrupowaniami farmakoforowymi. Celem, a zarazem zaletą tej metody według wynalazku jest wykorzystanie dostępnych w handlu odczynników, prowadzenie procesu w łagodnych warunkach z wysokimi wydajnościami, a przede wszystkim użycie jako głównego substratu betuliny, którą w prosty sposób można otrzymać, na przykład z kory brzozy, stanowiącej odpad przy produkcji papieru.

W wyniku przeprowadzonych badań okazało się niespodziewanie, że wprowadzenie grupy fosfonowej w pozycję 29 lub 30 betuliny, a następnie jednego lub dwóch takich samych lub różnych podstawników acetylenowych w pozycje 3 i/lub 28 betuliny i jej pochodnych, pozwala uzyskać związki o wysokiej aktywności cytotoksycznej *in vitro*, wobec komórek ludzkich i mysich linii nowotworowych w porównaniu z opisanymi dotychczas związkami betuliny.

Związki według wynalazku mają strukturę chemiczną opisaną wzorem 2:



Wzór 2

w którym z atomami węgla C29 lub C30 grupy izopropenyłowej związana jest grupa (reszta) fosfonowa, gdzie przerywane linie między C20 a C29 i C30 wskazują, że wiązanie pomiędzy nimi może być podwójne bądź pojedyncze, a poszczególne podstawniki oznaczają:

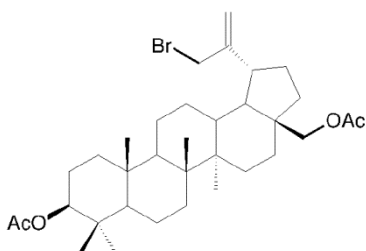
R – oznacza grupę alkilową (C₁-C₄),

R₁ – oznacza grupę alkilową (C₁-C₄),

R₂ – oznacza grupę hydroksylową, grupę propynoiloksylową, cyklopropylopropynoiloksylową, 2-butynoiloksylową, propargiloksykarbonyloksylową,

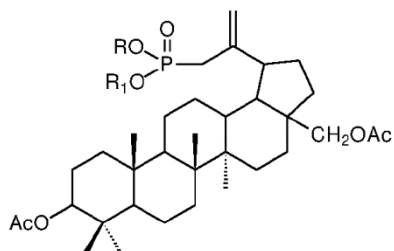
R₃ – oznacza grupę hydroksymetylową, propynoiloksylometylową, cyklopropylopropynoiloksymetylową, 2-butynoiloksymetylową, propargiloksykarbonyloksymetylową,

W sposobie wytwarzania związków oznaczonych wzorem 2 według wynalazku jako substrat do syntezy fosfonowych pochodnych betuliny stosuje się związek o wzorze 3 uzyskiwany z betuliny, wydzielonej z kory brzozy.



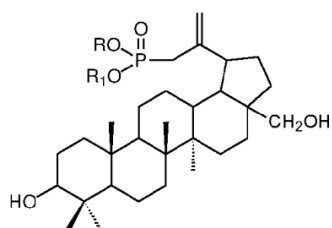
Wzór 3

Sposób wytwarzania fosfonianów acetylenowych pochodnych betuliny według wynalazku o wzorze 2, w którym z atomami węgla C29 lub C30 grupy izopropenyłowej związana jest grupa fosfonowa, gdzie przerywane linie między C20 a C29 i C30 wskazują, że wiązanie pomiędzy nimi może być podwójne bądź pojedyncze polega na tym, że związek o wzorze 3 poddaje się reakcji z fosforem trialkilowym, w temperaturze 100°C–165°C otrzymując produkt o wzorze 4 (R=R₁=alkil).

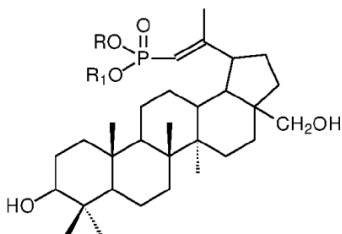


Wzór 4

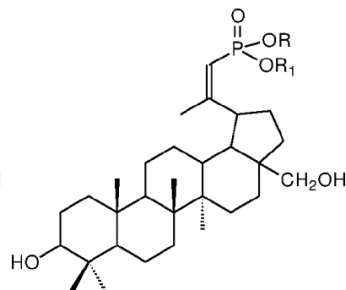
Otrzymany związek poddaje się reakcji hydrolizy w środowisku alkalicznym wobec KOH w roztworze etanolowym, w temperaturze wrzenia, otrzymując mieszaninę produktów przegrupowania alilo-winyłowego o wzorze 2B (trans) i 2C (cis), w których R=R₁=alkil lub wobec NaOH w roztworze CH₃OH/THF/H₂O w temperaturze pokojowej otrzymując związek bez przegrupowania o wzorze 2A, w którym R=R₁=alkil.



Wzór 2A



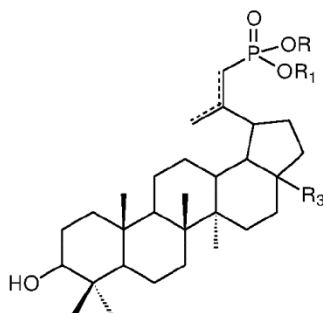
Wzór 2B



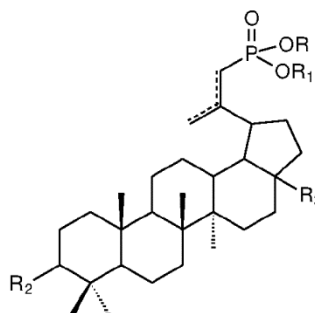
Wzór 2C

Związki o wzorach 2A, 2B i 2C, w których $R = R_1 =$ alkil, poddane reakcji z kwasem acetyleno-karboksylowym wybranym z grupy obejmującej: kwas propiolowy, cyklopropylopropiolowy, 2-buty-nowy, w rozpuszczalniku organicznym w obecności DCC (N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu) i DMAP (4-dimetyloaminopirydyny) w temperaturze od -10°C do 20°C dają mieszaninę monoestrów o wzorze 5A, w którym $R = R_1 =$ alkil, $R_3 =$ grupa propynoiloksylometylowa, cyklopropylopropynoiloksylometylowa, 2-buty-noiloksylometylowa, i diestrów fosfonianu betuliny o wzorze 5B, w którym $R = R_1 =$ alkil, $R_2 =$ grupa propynoiloksylowa, cyklopropylopropynoiloksylowa, 2-buty-noiloksylowa, propynoiloksylometylowa, cyklopropylopropynoiloksylometylowa, 2-buty-noiloksylometylowa. Jako rozpuszczalnik organiczny stosuje się chlorek metylenu, chloroform, toluen lub eter dietylowy.

Związki o wzorach 2A, 2B i 2C, w których $R = R_1 =$ alkil, poddane reakcji z chloromrówczanem propargilowym w rozpuszczalniku organicznym w obecności aminy, najlepiej: trietyloaminy, pirydyny, cykloheksyloaminy w temperaturze od 5°C do 20°C dają mieszaninę monoestrów o wzorze 5A, w którym $R = R_1 =$ alkil, $R_3 =$ grupa propargiloksykarbonyloksymetylowa i diestrów fosfonianu betuliny o wzorze 5B, w którym $R = R_1 =$ alkil, $R_2 =$ propargiloksykarbonyloksylowa, $R_3 =$ grupa propargiloksykarbonyloksymetylowa. Jako rozpuszczalnik organiczny stosuje się benzen, toluen.



Wzór 5A



Wzór 5B

Sposób wytwarzania acetylenowych pochodnych betuliny o wzorze 2 według wynalazku wykorzystuje łatwo dostępne substraty, daje dobre wydajności prowadzonych reakcji tj. 61–90% (w odniesieniu do monoestrów) i 7–20% (w odniesieniu do diestrów), a ponadto sposób wyodrębniania jest prosty. Budowa związków została potwierdzona w oparciu o spektroskopię ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR oraz IR.

Związki według wynalazku wykazują aktywność cytotoksyczną wobec komórek różnych linii nowotworowych: glejak mózgu (SNB19), rak piersi (T47D) i czerniak (C32). Ze względu na osiąganą aktywność związki te mogą być korzystnie stosowane osobno jako związki hamujące proliferację komórek nowotworowych.

Dodatkowo związki objęte wynalazkiem mogą stanowić prekursorzy w otrzymywaniu dalszych skutecznych cytostatyków na drodze funkcjonalizowania podstawników acetylenowych, co stanowi ich dodatkową zaletę.

Sposób według wynalazku, przedstawiony jest dokładniej w przykładach wykonania nie ograniczających w żadnym stopniu jego zakresu.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie fosfonianów 4 ($R = R_1 = \text{Me, Et}$).

W kolbie okrągłodennej zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, w atmosferze argonu umieszcza się 0,606 g (1 mmol) 30-bromo-3,28-diacetylobetuliny 3 i 20 mmoli fosforynu (trimetylu lub trietylu).

Reakcję prowadzi się w temperaturze wrzenia mieszaniny przez 6 godzin. Następnie oddestylowuje się nadmiar fosforynu, a pozostałość zateża się do sucha na wyparce próżniowej. Otrzymany produkt przemywa się heksanem, po czym oczyszcza metodą chromatografii kolumnowej (SiO₂, chloroform/aceton, 7:3 v/v). Otrzymuje się produkt 4 (R = R₁ = Me, Et).

a) 3,28-Diacetylo-30-dimetoksyfosforylobetulina 4 (R = R₁ = Me)

Wydajność: 70%. T.top. 90–94°C.

TLC (chloroform/octan etylu, 7:3, v/v); R_f = 0,19.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0,80 (m, 1H, H-5), 0,85 (s, 3H, CH₃), 0,86 (s, 6H, 2xCH₃), 0,98 (s, 3H, CH₃), 1,05 (s, 3H, CH₃), 0,81-2,10 (m, 23H, CH, CH₂), 2,07 (s, 3H, COCH₃), 2,09 (s, 3H, COCH₃), 2,44 (m, 1H, H-19), 2,62 (m, 2H, H-30), 3,76 (s, 3H, POCH₃), 3,78 (s, 3H, POCH₃), 3,82 (d, J=10,8 Hz, 1H, H-28), 4,28 (d, J=10,8 Hz, 1H, H-28), 4,49 (m, 1H, H-3), 5,03 (br. s., 1H, H-29), 5,07 (br. s., 1H, H-29).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 14,2, 14,7; 16,0; 16,2; 16,5; 18,2; 20,9; 21,0; 21,1, 21,3; 23,7; 26,4, 27,0; 27,9; 29,8; 34,1; 34,3; 37,0; 37,4; 37,8; 38,4; 40,9; 42,7; 46,3; 50,0; 50,2; 52,6, 52,7, 55,4; 60,4; 62,7; 80,9; 113,2; 144,4; 171,1; 171,6.

³¹P-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 30,26.

IR (KBr, cm⁻¹) v: 1734 (C=O), 1246 (P=O), 1031(P-O-R), 800 (P-C).

b) 3,28-Diacetylo-30-dietoksyfosforylobetulina 4 (R = R₁ = Et)

Wydajność: 76%. T.top 152–155°C.

TLC (chloroform/octan etylu, 7:3, v/v); R_f = 0,38.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0,80 (m, 1H, H-5), 0,85 (s, 3H, CH₃), 0,86 (s, 6H, 2xCH₃), 0,99 (s, 3H, CH₃), 1,05 (s, 3H, CH₃), 1,34 (m, 6H, 2x OCH₂CH₃), 0,81-2,10 (m, 23H, CH, CH₂), 2,06 (s, 3H, COCH₃), 2,09 (s, 3H, COCH₃), 2,46 (m, 1H, H-19), 2,60 (m, 2H, H-30), 3,83 (d, J=10,8 Hz, 1H, H-28), 4,13 (m, 4H, 2x OCH₂CH₃), 4,28 (d, J=10,8 Hz, 1H, H-28), 4,49 (m, 1H, H-3), 5,01 (br. s, 1H, H-29), 5,07 (br. s, 1H, H-29).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 14,1; 14,8; 16,0; 16,1; 16,4; 16,5; 18,2; 20,9; 21,0; 21,3; 23,7; 26,4; 27,0; 27,9; 29,8; 31,6; 34,1; 34,2; 37,0; 37,4; 37,8; 38,4; 40,9; 42,7; 46,3; 49,9; 50,2; 55,4; 61,8; 61,9; 62,7; 80,9; 112,8; 144,6; 171,0; 171,5.

³¹P-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 27,73.

IR (KBr, cm⁻¹) v: 1741 (C=O), 1248 (P=O), 961 (P-O-R), 784 (P-C).

P r z y k ł a d 2. Otrzymywanie fosfonianów trans-2B i cis 2C (R=R₁=Et)

W kolbie umieszcza się 0,663 g (1 mmola) związku 4 (R=R₁=Et), 10 ml etanolu i 0,308 g wodorotlenku potasu i całość ogrzewa się w temperaturze wrzenia przez 2 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zateża się do sucha na wyparce próżniowej. Surowy produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej (SiO₂, chlorek metylenu/etanol, 15:1 v/v) otrzymując czyste izomery trans-2B i cis-2C (R=R₁=Et).

a) E-29-dietoksyfosforylobetulina (trans-2B)

(R=R₁=Et)

Wydajność: 64%. T.top 120–123°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v); R_f = 0,31

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0,70 (m, 1H, H-5), 0,78 (s, 3H, CH₃), 0,84 (s, 3H, CH₃), 0,99 (s, 3H, CH₃), 0,994 (s, 3H, CH₃), 1,07 (s, 3H, CH₃), 1,33 (m, 6H, 2x OCH₂CH₃), 0,88-2,08 (m, 25H, CH, CH₂), 2,07 (d, J=3Hz, 3H, H-30), 2,45 (m, 1H, H-19), 3,21 (m, 1H, H-3), 3,32 (d, J=10,8 Hz, 1H, H-28), 3,81 (d, J=10,8 Hz, 1H, H-28), 4,05 (m, 4H, 2x OCH₂CH₃) 5,42 (d, 1H, ²J_{PH}=18,6 Hz, H-29).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 14,7; 15,4; 15,9; 16,1; 16,4; 16,9; 18,3; 20,8; 25,8; 26,9; 27,3; 28,0; 29,2; 29,9; 34,1; 34,2; 37,1; 38,6; 38,9; 40,9; 42,7; 47,9; 49,7; 50,3; 51,5; 55,3; 60,4; 61,1; 61,2; 78,9; 111,0; 167,6.

³¹P-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 18,54.

IR (KBr, cm⁻¹) v: 3416 (OH), 1230 (P=O), 962 (P-O-R), 750 (P-C).

b) Z-29-dietoksyfosforylobetulina (cis-2C) (R=R₁=Et)

Wydajność: 13%. T.top 126–128°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v); R_f = 0,28.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,70 (m, 1H, H-5), 0,78 (s, 3H, CH_3), 0,84 (s, 3H, CH_3), 0,987 (s, 3H, CH_3), 0,99 (s, 3H, CH_3), 1,07 (s, 3H, CH_3), 1,33 (m, 6H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 0,85-2,10 (m, 25H, CH, CH_2), 1,87 (br.s, 3H, H-30), 3,50 (m, 1H, H-19), 3,20 (m, 1H, H-3), 3,43 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 3,81 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 4,06 (m, 4H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 5,28 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=19,2$ Hz, H-29).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 14,7; 15,4; 15,9; 16,1; 16,4; 16,5; 18,3; 20,8; 21,4; 24,9; 27,0; 27,4; 28,0; 29,2; 29,3; 34,2; 34,3; 37,1; 37,2; 38,7; 38,9; 40,9; 42,7; 43,8; 47,9; 49,8; 50,5; 55,3; 60,5; 61,1; 61,2; 78,9; 111,9; 167,5.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 17,91.

IR (KBr, cm^{-1}) ν : 3416 (OH), 1227 (P=O), 963 (P-O-R), 747 (P-C).

P r z y k ł a d 3. Otrzymywanie fosfonianu 2A

($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$)

W kolbie okrągłodennej umieszcza się 8 ml 0,47 M roztworu wodorotlenku sodu w układzie woda/tetrahydrofuran/metanol (w stosunku 1:2:1 v/v) i 0,133 g (0,2 mmola) związku 4 ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$), całość miesza się w temperaturze pokojowej przez 5 godzin. Następnie lotne składniki odparowuje się na wyparce próżniowej. Do pozostałości dodaje się 15 ml chlorku metylenu i przemywa się 10% HCl oraz wodą. Warstwę organiczną suszy się bezwodnym siarczanem sodu, a następnie zateża do sucha. Produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej (SiO_2 , chlorek metylenu/etanol, 15:1 v/v) otrzymując związek 2A ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$).

a) 30-Dietoksyfosforylobetulina 2A

b) ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$)

Wydajność: 68%. T.top. 160–162°C.

TLC (chloroform/etanol, 15:1, v/v); $R_f = 0,38$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,70 (m, 1H, H-5), 0,78 (s, 3H, CH_3), 0,84 (s, 3H, CH_3), 0,99 (s, 3H, CH_3), 1,00 (s, 3H, CH_3), 1,04 (s, 3H, CH_3), 1,35 (m, 6H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 0,80-2,20 (m, 25H, CH, CH_2), 2,42 (m, 1H, H-19), 2,60 (m, 2H, H-30), 3,21 (m, 1H, H-3), 3,34 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 3,81 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 4,13 (m, 4H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 5,01 (br s., 1H, H-29), 5,05 (br s., 1H, H-29).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 14,8; 15,4; 16,0; 16,1; 16,4; 16,5; 18,3; 20,8; 20,9; 26,5; 26,9; 27,0; 27,4; 28,0; 29,5; 30,7; 33,6; 34,2; 37,1; 38,7; 38,9; 40,9; 42,7; 47,8; 50,0; 50,3; 55,3; 61,5; 61,8; 61,9; 79,0; 112,7; 145,0.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 27,81.

IR (KBr, cm^{-1}) ν : 3450 (OH), 1234 (P=O), 966 (P-O-R).

P r z y k ł a d 4. Otrzymywanie acetylenowych pochodnych 29-fosfonianów betuliny 5

($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_2=\text{HC}=\text{CC}(\text{O})\text{O}$, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{O})\text{O}$, cyclo-PrC=CC(O)O, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CCH}_3$, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{C-Pr-cyclo}$)

Związek 2B ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$) w ilości 0,29 g (0,5 mmola) rozpuszcza się w 2,5 ml chlorku metylenu. Otrzymany roztwór schładza się w łaźni lodowo-wodnej do -10°C, po czym dodaje się 0,585 mmola odpowiedniego kwasu acetylenokarboksylowego (propiolowego, 2-butynowego, cyklopropylopropiolowego), a następnie wkrapla roztwór 0,123 g (0,595 mmola) DCC (N,N'-dicykloheksylokarbodiimid) i 0,005 g (0,04 mmola) DMAP (4-dimetyloaminopirydyna) w 0,5 ml chlorku metylenu. Reakcję prowadzi się w atmosferze argonu przez 5 godzin w łaźni chłodzącej, a następnie w temperaturze pokojowej. Po 24 godzinach mieszaninę reakcyjną sączy się, przesącz zateża do sucha na wyparce próżniowej. Surowy produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej (SiO_2 , chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v) otrzymując diester 5B ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_2=\text{HC}=\text{CC}(\text{O})\text{O}$, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{O})\text{O}$, cyclo-PrC=CC(O)O, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CCH}_3$, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{C-Pr-cyclo}$) i monoester 5A ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CCH}_3$, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{C-Pr-cyclo}$).

a) 29-Dietoksyfosforylo-28-propynoilobetulina 5A ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CH}$)

Wydajność: 74%. T.top 190–191°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v); $R_f = 0,52$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,81 (m, 1H, H-5), 0,78 (s, 3H, CH_3), 0,84 (s, 3H, CH_3), 0,99 (s, 3H, CH_3), 1,04 (s, 3H, CH_3), 1,20 (s, 3H, CH_3), 1,33 (m, 6H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1,06-2,01 (m, 24H, CH, CH_2), 2,07 (d, $J=3$ Hz, 3H, H-30), 2,47 (m, 1H, H-19), 2,93 (s, 1H, C=CH), 3,20 (m, 1H, H-3), 3,97 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 4,05 (m, 4H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 4,39 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 5,43 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=18$ Hz, H-29).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 14,7; 15,4; 16,0; 16,1; 16,4; 18,2; 20,7; 25,4; 25,8; 26,9; 27,3; 28,0; 29,6; 34,1; 34,6; 37,1; 37,5; 38,6; 38,9; 40,8; 42,7; 46,6; 49,7; 50,2; 51,4; 55,3; 61,1; 61,2; 64,6; 74,6; 74,9; 78,9; 111,9; 153,2; 166,8.

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18,25

IR (KBr, cm^{-1}): 3360 (O-H), 2107 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1713 ($\text{C}=\text{O}$), 1230 ($\text{P}=\text{O}$), 961 (P-O-R), 753 (P-C).

b) 29-Dietoksyfosforylo-3,28-dipropynoilobetulina 5B ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_2=\text{HC}=\text{CC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}\equiv\text{CH}$)

Wydajność: 10%. T.top 129–133°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v) $R_f = 0,74$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0,81 (m, 1H, H-5), 0,87 (s, 3H, CH_3), 0,90 (s, 3H, CH_3), 0,91 (s, 3H, CH_3), 0,99 (s, 3H, CH_3), 1,04 (s, 3H, CH_3), 1,33 (m, 6H, 2x OCH_2CH_3), 0,95–2,01 (m, 22H, CH, CH_2), 2,08 (d, $J=3\text{Hz}$, 3H, H-30), 2,47 (m, 1H, H-19), 2,88 (br. s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 2,93 (br. s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 3,97 (d, $J = 10,8\text{ Hz}$, 1H, H-28), 4,05 (m, 4H, 2x OCH_2CH_3), 4,39 (d, $J = 10,8\text{ Hz}$, 1H, H-28), 4,62 (m, 1H, H-3), 5,43 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=18,6\text{ Hz}$, H-29).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 14,7; 16,0; 16,1; 16,4; 18,1; 20,7; 23,5; 24,8; 25,5; 26,9; 27,9; 29,6; 33,7; 34,0; 34,6; 37,0; 37,4; 37,9; 38,3; 40,9; 42,7; 46,6; 49,4; 49,7; 50,1; 51,3; 55,3; 61,1; 61,2; 64,6; 74,1; 74,6; 74,9; 75,1; 83,6; 111,5; 152,8; 153,2; 166,7.

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18,20.

IR (KBr, cm^{-1}): 3326 ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$), 2115 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1715 ($\text{C}=\text{O}$), 1232 ($\text{P}=\text{O}$), 963 (P-O-R), 754 (P-C).

c) 28-(2-Butynilo)-29-dietoksyfosforylobetulina 5A

($\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CCH}_3$)

Wydajność: 84%. T.top 150–153°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v) $R_f = 0,46$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0,69 (m, 1H, H-5), 0,77 (s, 3H, CH_3), 0,83 (s, 3H, CH_3), 0,98 (s, 6H, 2x CH_3), 1,03 (s, 3H, CH_3), 1,32 (m, 6H, 2x OCH_2CH_3), 0,8–2,10 (m, 24H, CH, CH_2), 2,01 (s, 3H, $\text{C}=\text{CCH}_3$), 2,06 (d, $J=3\text{Hz}$, 3H, H-30), 2,47 (m, 1H, H-19), 3,20 (m, 1H, H-3), 3,94 (d, $J=10,8\text{ Hz}$, 1H, H-28), 4,04 (m, 4H, 2x OCH_2CH_3), 4,33 (d, $J=10,8\text{ Hz}$, 1H, H-28), 5,42 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=18\text{ Hz}$, H-29).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 3,9; 11,4; 14,7; 15,4; 16,0; 16,1; 16,4; 18,3; 20,7; 25,3; 25,8; 26,9; 27,3; 28,0; 29,1; 29,6; 34,1; 34,6; 37,1; 37,4; 38,6; 38,9; 40,9; 42,7; 46,5; 49,7; 50,2; 55,3; 61,1; 61,2; 64,0; 72,4; 78,9; 85,8; 111,0; 154,3; 167,0.

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18,33.

IR (KBr, cm^{-1}): 3414 (O-H), 2243 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1707 ($\text{C}=\text{O}$), 1247 ($\text{P}=\text{O}$), 1026 (P-O-C), 750 (P-C).

d) 3,28-Di(2-butynilo)-29-dietoksyfosforylobetulina 5B

($\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CCH}_3$)

Wydajność: 7%. T.top 229–304°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v) $R_f = 0,71$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0,79 (m, 1H, H-5), 0,86 (s, 3H, CH_3), 0,89 (s, 6H, 2x CH_3), 0,97 (s, 3H, CH_3), 1,03 (s, 3H, CH_3), 1,32 (m, 6H, 2x OCH_2CH_3), 0,8–2,10 (m, 23H, CH, CH_2), 1,997 (s, 3H, $\text{C}\equiv\text{CCH}_3$), 2,01 (s, 3H, $\text{C}\equiv\text{CCH}_3$), 2,07 (d, $J=3\text{Hz}$, 3H, H-30), 2,47 (m, 1H, H-19), 3,93 (d, $J=11,1\text{ Hz}$, 1H, H-28), 4,04 (m, 4H, 2x OCH_2CH_3), 4,33 (d, $J=11,1\text{ Hz}$, 1H, H-28), 4,59 (m, 1H, H-3), 5,42 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=18\text{ Hz}$, H-29).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 3,9; 14,1; 14,7; 16,0; 16,1; 16,4; 16,5; 18,1; 20,7; 23,5; 25,5; 25,7; 26,9; 27,9; 29,6; 34,0; 34,6; 37,0; 37,4; 37,9; 38,3; 40,9; 42,7; 46,5; 49,7; 50,1; 50,2; 55,4; 61,1; 61,2; 64,0; 72,4; 72,8; 82,7; 85,0; 85,8; 111,4; 153,9; 154,3; 167,3.

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18,30.

IR (KBr, cm^{-1}): 2241 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1710 ($\text{C}=\text{O}$), 1242 ($\text{P}=\text{O}$), 1059 (P-O-C), 748 (P-C).

e) 28-Cyklopropylopropynoilo-29-dietoksyfosforylo-betulina 5A

($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{C}-\text{Pr-cyclo}$)

Wydajność: 87%. T.top 150–153°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v) $R_f = 0,50$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0,69 (m, 1H, H-5), 0,70 (s, 3H, CH_3), 0,77 (s, 3H, CH_3), 0,98 (s, 6H, 2x CH_3), 1,02 (s, 3H, CH_3), 1,32 (m, 6H, 2x OCH_2CH_3), 0,8–2,10 (m, 29H, CH, CH_2), 2,06 (d, $J=2,7\text{ Hz}$,

3H, H-30), 2,47 (m, 1H, H-19), 3,20 (m, 1H, H-3), 3,92 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 4,04 (m, 4H, 2x OCH_2CH_3), 4,31 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 5,42 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=18$ Hz, H-29).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): -0,1; 1,6; 9,8; 14,7; 15,3; 15,9; 16,5; 16,6; 16,9; 16,9 18,8; 21,3; 23,2; 26,3; 27,5; 27,9; 28,5; 30,2; 32,1; 34,7; 35,2; 37,7; 38,0; 39,2; 39,4; 41,4; 43,2; 47,1; 50,3; 50,8; 55,8; 61,7; 61,7; 64,4; 69,0; 79,5; 94,2; 112,5; 154,9; 167,9.

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18,35.

IR (KBr, cm^{-1}) ν : 2243 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1707 ($\text{C}=\text{O}$), 1278 ($\text{P}=\text{O}$), 1038 ($\text{P}-\text{O}-\text{R}$), 750 ($\text{P}-\text{C}$).

f) 3,28-Di(cyklopropylopropynoilo)-29-dietoksyfosforylobetulina 5B

($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_2=\text{cyclo-PrC}\equiv\text{CC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}\equiv\text{C-Pr-cyclo}$)

Wydajność: 13%. T.top. 144–147°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v) $R_f = 0,76$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0,79 (m, 1H, H-5), 0,85 (s, 3H, CH_3), 0,88 (s, 6H, 2x CH_3), 0,97 (s, 3H, CH_3), 1,02 (s, 3H, CH_3), 1,32 (m, 6H, 2x OCH_2CH_3), 0,82,10 (m, 33H, CH, CH_2), 2,06 (d, $J=3$ Hz, 3H, H-30), 2,46 (m, 1H, H-19), 3,91 (d, $J=11,1$ Hz, 1H, H-28), 4,07 (m, 4H, 2x OCH_2CH_3), 4,31 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 4,57 (m, 1H, H-3), 5,41 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=18,6$ Hz, H-29).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): -1,6; -0,1; 8,1; 8,2; 8,5; 13,7; 15,0; 15,1; 15,3; 15,4; 15,5; 17,1; 19,7; 22,5; 24,7; 25,8; 25,9; 26,9; 28,6; 29,5; 30,6; 33,0; 33,6; 36,0; 36,4; 36,9; 37,3; 39,8; 41,6; 45,5; 48,7; 49,1; 54,4; 60,1; 60,1; 62,8; 67,4; 67,9; 81,6; 91,7; 92,6; 111,9; 152,9; 153,4; 166,0.

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18,33.

IR (KBr, cm^{-1}) ν : 2223 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1710 ($\text{C}=\text{O}$), 1265 ($\text{P}=\text{O}$), 1014 ($\text{P}-\text{O}-\text{R}$), 799 ($\text{P}-\text{C}$).

P r z y k ł a d 5. Otrzymywanie 29 - fosfonianów alkinyloksykarbonylobetuliny 5

($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_2=\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}$)

Związek 2B ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$) (0,29 g, 0,5 mmola) rozpuszcza się w 3 ml benzenu, dodaje 1,5 ml pirydyny i schładza w łaźni lodowo-solnej do temperatury ok -5°C .

Następnie wkrapla się roztwór 1 mmola chloromrówczanu propargilu w 2,5 ml benzenu i miesza się przez 18 godzin w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu lotnych składników pozostałość rozpuszcza się w 3 ml chloroformu i przemywa 10% kwasem siarkowym i wodą. Ekstrakty suszy się bezwodnym siarczanem sodu i zatęża pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej (SiO_2 , chloroform/etanol 15:1, v/v) otrzymując diestry 5B ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_2, \text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{O}$, $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}$) i monoestry 5A ($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}$).

a) 29-Dietoksyfosforylo-28-propargiloksykarbonylobetulina 5A

($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}$)

Wydajność: 63%. T.top. 140–142°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v) $R_f=0,49$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0,70 (m, 1H, H-5), 0,78 (s, 3H, CH_3), 0,84 (s, 3H, CH_3), 0,99 (s, 6H, 2x CH_3), 1,05 (s, 3H, CH_3), 1,33 (m, 6H, 2x OCH_2CH_3), 0,862,10 (m, 24H, CH, CH_2), 2,08 (br. s, 3H, H-30), 2,47 (m, 1H, H-19), 2,56 (t, $J=2,4$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3,21 (m, 1H, H-3), 3,95 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 4,05 (m, 4H, 2x OCH_2CH_3), 4,38 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 4,76 (m, 2H, $\text{OCH}_2-\text{C}\equiv\text{C}$), 5,43 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=18$ Hz, H-29).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 13,7; 14,3; 14,9; 15,0; 15,1; 15,4; 17,2; 19,7; 24,8; 25,9; 26,3; 27,0; 28,5; 28,6; 33,1; 33,5; 36,0; 36,1; 36,4; 37,6; 37,8; 39,8; 41,7; 45,7; 48,7; 49,2; 50,4; 54,2; 54,3; 60,1; 60,1; 66,0; 74,7; 77,9; 110,9; 154,0.

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18,30.

IR (KBr, cm^{-1}) ν : 3437 ($\text{O}-\text{H}$), 2128 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1750 ($\text{C}=\text{O}$), 1250 ($\text{P}=\text{O}$), 969 ($\text{P}-\text{O}-\text{R}$), 789 ($\text{P}-\text{C}$).

b) 29-Dietoksyfosforylo-3,28-di(propargiloksykarbonylo)betulina 5B

($\text{R}=\text{R}_1=\text{Et}$, $\text{R}_2=\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3=\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}$)

Wydajność: 7%. T.top. 150–153°C.

TLC (chlorek metylenu/etanol, 15:1, v/v) $R_f = 0,70$.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

^1H -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0,80 (m, 1H, H-5), 0,87 (s, 3H, CH_3), 0,88 (s, 3H, CH_3), 0,94 (s, 3H, CH_3), 0,99 (s, 3H, CH_3), 1,05 (s, 3H, CH_3), 1,33 (m, 6H, 2x OCH_2CH_3), 0,82-2,10 (m, 23H, CH, CH_2), 2,08 (br. s, 3H, H-30), 2,48 (m, 1H, H-19), 2,54 (br. s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2,56 (br. s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3,95 (d, $J=10,8$ Hz, 1H, H-28), 4,06 (m, 4H, 2x OCH_2CH_3), 4,38 (m, 2H, H-3, H-28), 4,74 (m, 2H, $\text{OCH}_2-\text{C}\equiv\text{C}$), 4,76 (m, 2H, $\text{OCH}_2-\text{C}\equiv\text{C}$), 5,43 (d, 1H, $^2J_{\text{PH}}=18$ Hz, H-29).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 13,7; 14,9; 15,1; 15,3; 15,4; 17,0; 19,7; 22,5; 24,7; 25,9; 26,8; 28,5; 8,7; 33,0; 33,5; 36,0; 36,4; 37,0; 37,3; 39,8; 41,7; 45,7; 48,7; 49,1; 54,0; 54,3; 60,1; 66,0; 74,4; 74,7; 76,4; 79,2; 85,1; 110,9; 153,5; 154,0.

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 18,27.

IR (KBr, cm^{-1}): 2131 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1757 ($\text{C}=\text{O}$), 1263 ($\text{P}=\text{O}$), 1026 ($\text{P}-\text{O}-\text{R}$), 800 ($\text{P}-\text{C}$).

Ocenę aktywności cytotoksycznej związków opisanych wzorem 2 przeprowadzono wobec ludzkich komórek nowotworowych [glejak mózgu SNB-19, rak gruczołu sutkowego T47D, czerniak C32] z zastosowaniem testów WST1 (tabela 1).

Tabela 1

Symbol związku	Aktywność cytotoksyczna in vitro w postaci IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]		
	T47D	SNB-19	C32
Betulina	77,9 $\pm$ 4,7	23,5 $\pm$ 2,0	-
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{AcO}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OAc}$	58,0 $\pm$ 3,4	51,9 $\pm$ 0,8	-
trans $\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{OH}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OH}$	6,2 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,4	-
cis $\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{OH}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OH}$	0,9 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,1	-
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{HC}\equiv\text{CC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{C}\equiv\text{CH}$	2,8 $\pm$ 0,6	0,6 $\pm$ 0,1	-
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{HO}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{C}\equiv\text{CH}$	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	-
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3\text{C}\equiv\text{CC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}\equiv\text{CCH}_3$	13,9 $\pm$ 3,4	7,6 $\pm$ 1,0	4,9 $\pm$ 0,3
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{HO}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}\equiv\text{CCH}_3$	9,6 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,1
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	Neg	0,5 $\pm$ 0,1	51,7 $\pm$ 4,8
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{HO}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	49,4 $\pm$ 6,1	24,5 $\pm$ 12,6	5,9 $\pm$ 0,3
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{cyclo-PrC}\equiv\text{CC}(\text{O})\text{O}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}\equiv\text{C-cycloPr}$	79,5 $\pm$ 1,9	40,4 $\pm$ 6,8	9,4 $\pm$ 0,2
$\text{R} = \text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = \text{HO}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}\equiv\text{C-cycloPr}$	8,2 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,8	4,7 $\pm$ 0,7
cisplatyna	55,9 $\pm$ 4,5	5,3 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,6

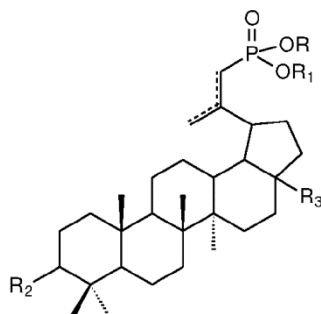
Neg – brak aktywności w zastosowanym zakresie stężeń

- - brak oznaczeń

Otrzymane według wynalazku fosfoniany acetylenowych pochodnych betuliny można korzystnie zastosować do hamowania proliferacji komórek nowotworowych, osobno lub w mieszaninie z betulina lub z kwasem betulinowym lub z innymi znanymi związkami przeciwnowotworowymi szczególnie na niektóre chemiooporne nowotwory, takie jak czerniaki i glejaki.

Zastrzeżenia patentowe

1. Fosfoniany acetylenowych pochodnych betuliny o wzorze 2,



Wzór 2

w którym z atomami węgla C29 lub C30 grupy izopropenylowej związana jest reszta fosfonowa, przerywane linie między C20 a C29 i C30 wskazują, że wiązanie pomiędzy nimi może być podwójne bądź pojedyncze, a poszczególne podstawniki oznaczają:

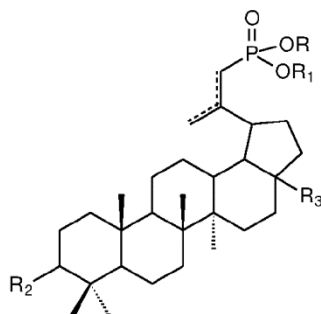
R oznacza grupę alkilową (C₁-C₄),

R₁ oznacza grupę alkilową (C₁-C₄),

R₂ oznacza grupę hydroksylową, grupę propynoiloksylową, cyklopropylopropynoiloksylową, 2-butyloiloksylową, propargiloksykarbonyloksylową,

R₃ oznacza grupę hydroksymetylową, propynoiloksymetylową, cyklopropylopropynoiloksymetylową, 2-butyloiloksymetylową, propargiloksykarbonyloksymetylową.

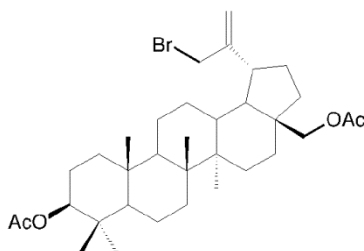
2. Sposób wytwarzania fosfonianów acetylenowych pochodnych betuliny o wzorze 2



Wzór 2

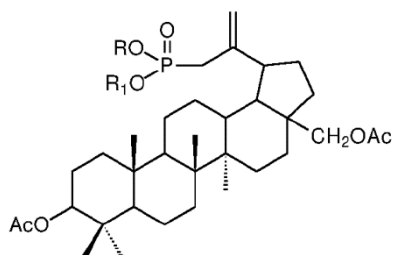
w którym podstawniki R, R₁, R₂ i R₃ określono w zastrzeżeniu 1, obejmujący następujące etapy:

- a) związek o wzorze 3



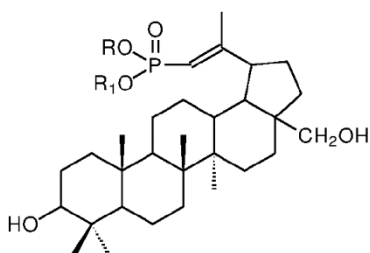
Wzór 3

Poddaje się reakcji z fosforem trialkilowym w temperaturze 100°C–165°C, otrzymując związek o wzorze 4

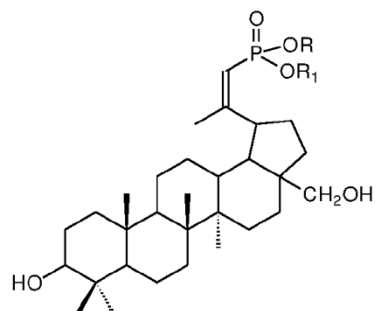


Wzór 4

(b) produkt etapu (a) poddaje się reakcji hydrolizy w środowisku alkalicznym wobec KOH w roztworze etanolowym, w temperaturze wrzenia, otrzymując mieszaninę związków o wzorach 2B i 2C, w których $R=R_1$ =alkil,

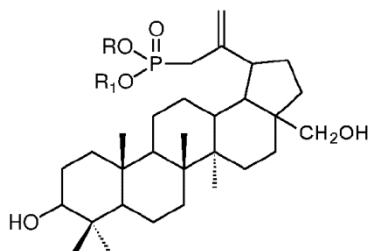


Wzór 2B



Wzór 2C

lub wobec NaOH w roztworze $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ w temperaturze pokojowej otrzymując związek o wzorze 2A, w którym $R=R_1$ =alkil,



Wzór 2A

(c) produkty etapu (b) poddaje się reakcji z kwasem acetylenokarboksylowym, wybranym z grupy obejmującej: kwas propiowy, cyklopropylopropiowy, 2-butynewy lub z chloromrówczanem propargilu.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję związków o wzorze 2A, 2B lub 2C z kwasem acetylenokarboksylowym prowadzi się w rozpuszczalniku organicznym wybranym z grupy obejmującej chlorek metylenu, chloroform, toluen lub eter dietylowy, w obecności DCC (*N,N*-dicykloheksylokarbodiimidu) i DMAP (4-dimetyloaminopirydyny) w temperaturze od -10 do $+20^\circ\text{C}$.

4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję związków o wzorze 2A, 2B lub 2C z chloromrówczanem propargilu prowadzi się w rozpuszczalniku organicznym wybranym z grupy obejmującej benzen i toluen, przy czym reakcję prowadzi się w obecności aminy wybranej z grupy obejmującej trietyloaminę, pirydynę, cykloheksyloaminę w temperaturze od 5°C do 20°C .

5. Zastosowanie fosfonianów acetylenowych pochodnych betuliny o wzorze 2 określonym w zastrz. 1, do wytwarzania środków farmaceutycznych przeznaczonych do hamowania proliferacji komórek nowotworowych.

