

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 242212 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **432858**

(22) Data zgłoszenia: **2020.02.07**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.08.09 BUP 19/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.01.30 WUP 05/2023**

(51) MKP:

**C07D 493/20** (2006.01)

**A61K 31/351** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**FILECLO SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ  
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Łódź, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ADAM HUCZYŃSKI, Poznań, PL  
MICHAŁ ANTOSZCZAK, Biedrusko, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Sylwia Błażej-Sosnowska, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

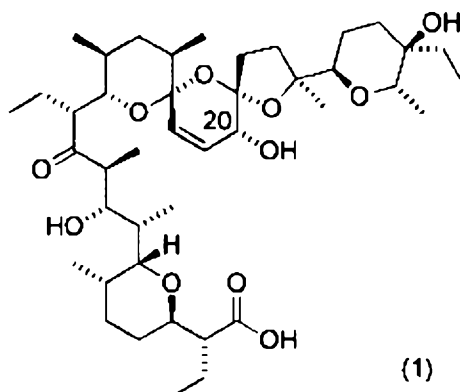
**Związki stanowiące C20-modyfikowane pochodne salinomycyny, sposób ich otrzymywania, kompozycja je zawierająca, zastosowanie tych związków oraz sposób otrzymywania produktu pośredniego**

**PL 242212 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pojedynczo modyfikowane pochodne salinomycyny modyfikowane w pozycji C-20, sposób ich otrzymywania, kompozycja je zawierająca, jak również ich zastosowanie jako leku, zwłaszcza jako środka przeciwnowotworowego. Przedmiotem wynalazku jest także sposób otrzymywania produktu pośredniego w sposobie otrzymywania modyfikowanych w pozycji C-20 pochodnych salinomycyny.

Jednym z najbardziej eksploatowanych sposobów poszukiwania nowych leków onkologicznych jest chemiczna modyfikacja związków pochodzenia naturalnego o udowodnionej, wysokiej aktywności biologicznej. Salinomycyna jest powszechnie stosowanym w weterynarii naturalnym polieteryowym antybiotykiem jonoforowym izolowanym ze *Streptomyces albus* o wzorze (1):



Salinomycyna znana jest z wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ale także przeciwnowotworowej. W testach *in vitro* oraz *in vivo* salinomycyna wykazuje skuteczność w walce z różnorodnymi komórkami nowotworowymi, w tym komórkami lekoopornymi oraz macierzystymi komórkami nowotworowymi. Mechanizm biologicznego działania salinomycyny związany jest ze zdolnością tego związku do selektywnego kompleksowania kationów metali, głównie kationów sodu oraz potasu, a następnie do przenoszenia ich poprzez błony biologiczne. Prowadzi to do zaburzenia równowagi kationowej w komórce, zmian wewnątrzkomórkowego pH, a finalnie skutkuje śmiercią komórki. Wysoka aktywność przeciwnowotworowa salinomycyny związana jest również z oddziaływaniem tego związku na różnorodne cele molekularne oraz szlaki sygnalizacyjne, w tym AMPK, MAPK, VEGF czy też Wnt/ $\beta$ -katenina. Salinomycyna została z powodzeniem zastosowana na niewielkiej grupie pacjentów z zaawansowanym nowotworem głowy, szyi, piersi oraz jajników. Terapia z użyciem salinomycyny skutkowało zahamowaniem postępu choroby nowotworowej z jednoczesnym brakiem ostrych skutków ubocznych jej stosowania, co udowadnia wysoki potencjał terapeutyczny tego związku.

W zgłoszeniu patentowym EP3191493 oraz publikacji naukowej [Mai *et al.*, *Nature Chemistry*, 9, 2017, 1025–1033] ujawniono aminowe pochodne salinomycyny otrzymane w pozycji C-20. W testach *in vitro* niektóre związki charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwnowotworową oraz selektywnością działania wobec macierzystych komórek nowotworowych CD24, a także zdolnością do hamowania tworzenia mammosfer w porównaniu do wyjściowej salinomycyny. Użycie aminowych pochodnych salinomycyny w pozycji C-20 skutkowało również zmniejszeniem objętości oraz masy guzów u myszy ze wszczepionym ludzkim nowotworem piersi MCF-7. Wysoka aktywność przeciwnowotworowa tych pochodnych związana jest z ich zdolnością do wywoływania ferroptozy – programowanej śmierci komórki zależnej od zawartości kationów żelaza. Wyniki badań zamieszczone w zgłoszeniu patentowym EP3191493 oraz publikacji naukowej [Mai *et al.*, *Nature Chemistry*, 9, 2017, 1025–1033] odnoszą się wyłącznie do badań *in vivo* przeprowadzonych na myszach. Organizm myszy istotnie różni się od organizmu człowieka, a więc niemożliwe jest proste przełożenie rezultatów tych badań na rzeczywisty potencjał terapeutyczny otrzymanych pochodnych salinomycyny.

Z kolei w publikacji naukowej [Li *et al.*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 148, 2018, 279–290] autorzy ujawnili *N*-amidowe oraz *N*-kARBAMINIANOWE (uretanowe) pochodne C20-*epi*-salinomycyny o odwróconej konfiguracji absolutnej (konfiguracji absolutnej *S* zamiast *R*) na asymetrycznym atomie

węgla w pozycji C-20. Aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* tych związków sprawdzona została wobec serii nowotworowych linii komórkowych: 4T1 (mysi nowotwór sutka), A549 (ludzki gruczolakorak płuc), HL-60 (ludzka białaczka promielocytowa), HeLa (ludzki nowotwór szyjki macicy), MCF-7 (ludzki nowotwór piersi), SMMC-7721 (ludzki nowotwór wątroby) oraz SW480 (ludzki gruczolakorak okrężnicy). Z danych ujawnionych w publikacji naukowej [Li *et al.*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 148, 2018, 279–290] wynika, że większość otrzymanych pochodnych C20-*epi*-salinomycyny charakteryzuje się wyższą aktywnością przeciwnowotworową w porównaniu ze związkiem wyjściowym. Badania przeprowadzone na prawidłowej linii komórkowej BEAS-2B (ludzkie komórki nabłonkowe oskrzeli) ujawniły ponadto, że najaktywniejsze przeciwnowotworowo pochodne C20-*epi*-salinomycyny cechują się również wysoką selektywnością działania, która w niektórych przypadkach jest kilkakrotnie wyższa od tej wykazywanej przez niemodyfikowaną chemicznie salinomycynę. Informacje zawarte w publikacji naukowej [Li *et al.*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 148, 2018, 279–290] ograniczają się jedynie do badań *in vitro*, zatem nieznanne jest działanie tych związków „w żywym organizmie” (badania *in vivo*). Niewiadomą jest również zdolność otrzymanych pochodnych C20-*epi*-salinomycyny do przełamania lekooporności komórek nowotworowych.

Aktywność przeciwnowotworowa związków biologicznie czynnych, w tym salinomycyny oraz jej pochodnych, ściśle zależy od rodzaju użytych w badaniach linii komórkowych. Niemniej, żadna ze zsyntezowanych dotychczas pochodnych salinomycyny nie znalazła praktycznego zastosowania medycznego, co związane było między innymi z niską bioaktywnością, niską selektywnością działania, brakiem szczegółowych badań dotyczących mechanizmów biologicznego działania czy też właściwości farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych. Z tego powodu prowadzone są wciąż intensywne prace zmierzające do otrzymania pochodnych salinomycyny o wysokim indeksie terapeutycznym, które znalazłyby zastosowanie w terapii onkologicznej.

Otrzymywanie nowych pochodnych salinomycyny związane jest z szeregiem problemów syntetycznych, które należy rozwiązać. Salinomycyna oraz produkty pośrednie do otrzymania jej pochodnych mogą być niestabilne w medium reakcyjnym, zwłaszcza w obecności środków kwasowych i/lub zasadowych. Salinomycyna jak i jej pochodne są wrażliwe na wysokie temperatury, przez co mogą ulegać nieodwracalnemu rozpadowi. Obecność wielu grup funkcyjnych stanowi dodatkowe wyzwanie dla selektywnej modyfikacji cząsteczki salinomycyny, w tym dla wszelkich chemo- oraz regioselektywnych modyfikacji jednej z trzech grup hydroksylowych obecnych w obrębie jej struktury. Problem stanowi także niezwykle wysoka cena handlowo dostępnej salinomycyny, co znacząco utrudnia opracowywanie nowych i wydajnych metod chemicznej modyfikacji tego związku.

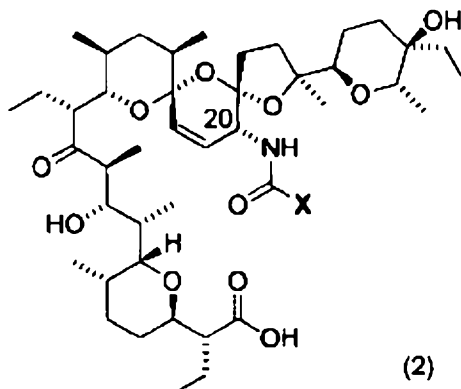
Wobec powyższego wynalazek wychodzi naprzeciw problemom ze stanu techniki w zakresie otrzymywania pochodnych salinomycyny modyfikowanych w pozycji C-20 z zachowaniem konfiguracji absolutnej *R* na asymetrycznym atomie węgla C-20 (jak w wyjściowej salinomycynie). Celem wynalazku było zatem otrzymanie nowych pochodnych salinomycyny modyfikowanych w pozycji C-20 z wykorzystaniem sposobu według wynalazku. Sposób ten obejmuje otrzymywanie produktu pośredniego w szczególnych przemianach obejmujących dobrane reakcje, reagenty oraz środki, jak i warunki reakcji, które umożliwiają otrzymanie wspomnianych pochodnych z zachowaniem konfiguracji absolutnej *R* na asymetrycznym atomie węgla w pozycji C-20 w relatywnie łatwym i wydajnym procesie.

Ponadto, celem wynalazku było wytworzenie nowych pochodnych naturalnego jonoforu – salinomycyny, zarówno w formie kwasowej, jak i jej soli, modyfikowanych w pozycji C-20, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Celem wynalazku jest również zapewnienie takich pochodnych salinomycyny modyfikowanych przy atomie węgla C-20, które wykazują aktywność względem komórek nowotworowych z wyjątkowo korzystną selektywnością.

Nieoczekiwanie okazało się, że pochodne salinomycyny według wynalazku wykazują wyjątkową aktywność i selektywność wobec schorzeń nowotworowych, w szczególności wobec nowotworów wybranych z grupy, takich jak: czerniak, nowotwór okrężnicy, nowotwór piersi czy białaczka bifenotypowa.

#### **Istota wynalazku**

Przedmiotem wynalazku są związki stanowiące C20-*N*-acylowe pochodne salinomycyny o wzorze ogólnym (2):



, gdzie:

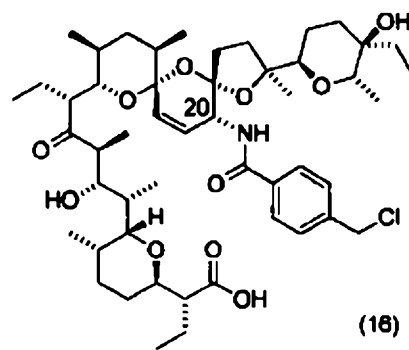
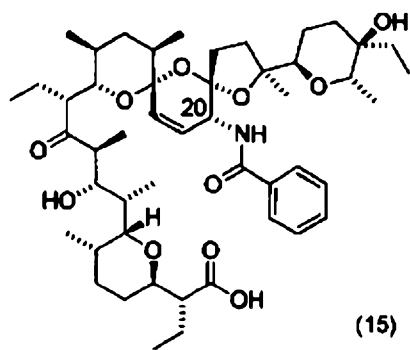
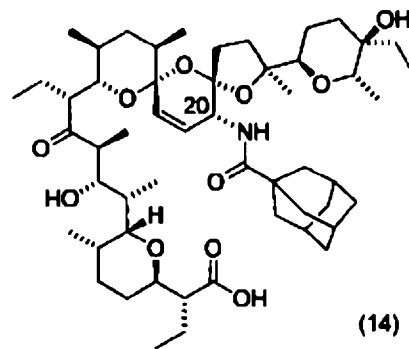
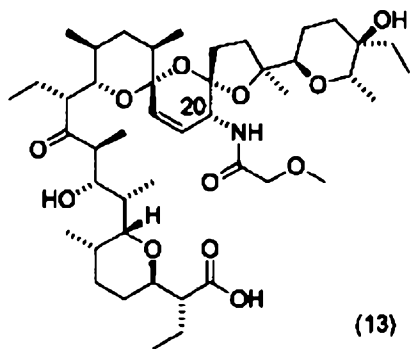
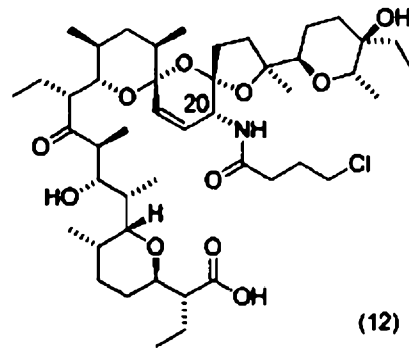
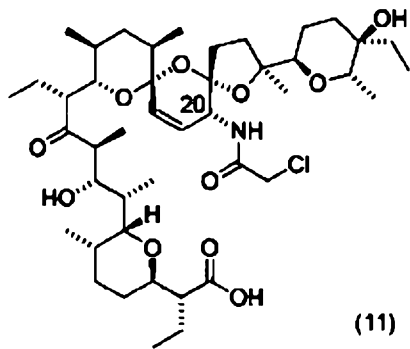
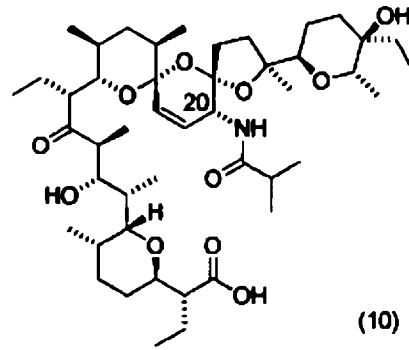
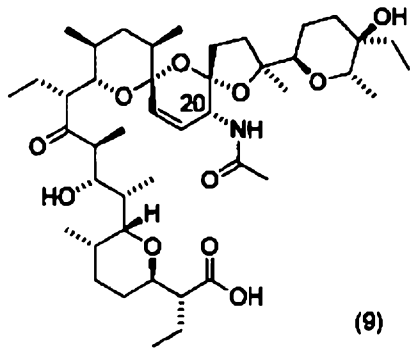
– X oznacza odpowiednio R, O-R lub NH-R;

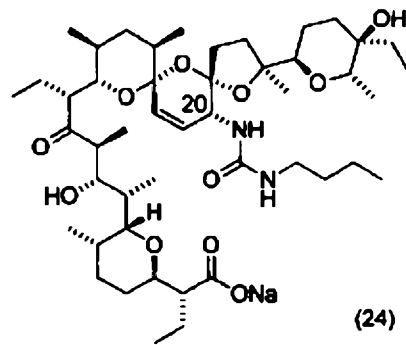
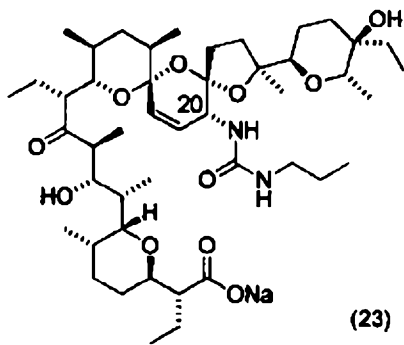
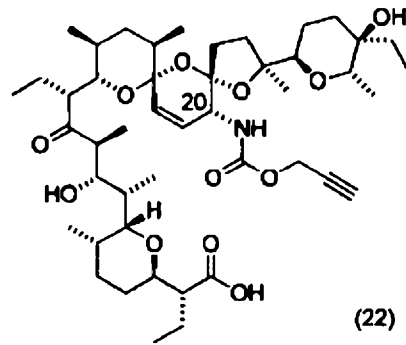
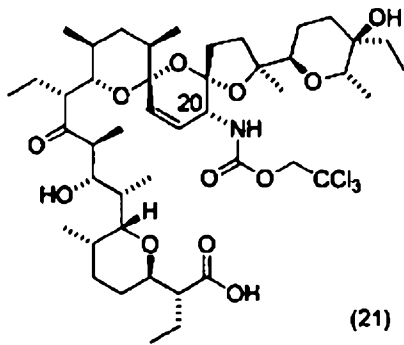
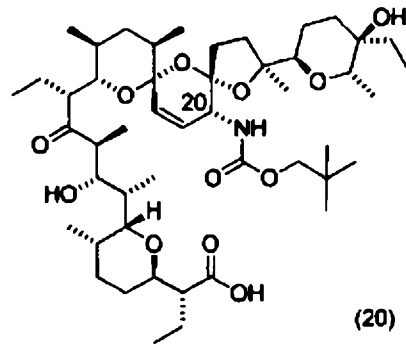
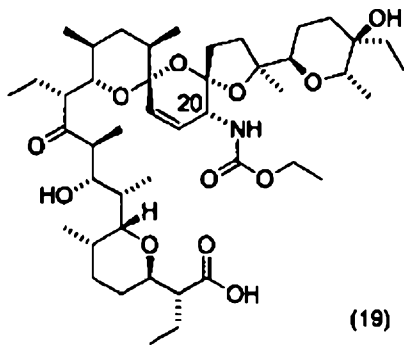
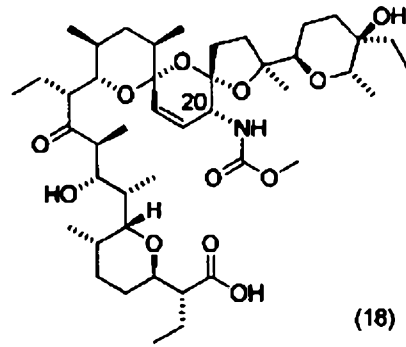
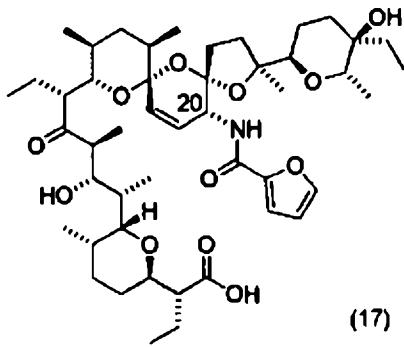
– R oznacza:

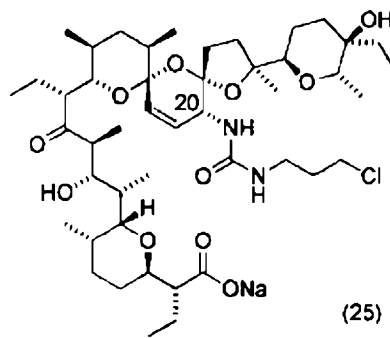
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha węglowego od 1 do 5 atomów halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym atomie węgla, jak również przy różnych atomach węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania eterowe,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 3 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania wielokrotne, zarówno podwójne, jak i potrójne,
- monocykliczną, dicykliczną lub tricykliczną grupę alkilową zawierającą od 5 do 10 atomów węgla,
- aromatyczną grupę arylową, przy czym preferowane są te zawierające sześciocząłkowy pierścień aromatyczny,
- aromatyczną grupę arylową podstawioną przez 1 do 3 podstawników wybranych niezależnie spośród grup alkilowych, alkoksylowych, hydroksylowych, nitrowych oraz nitrylowych, a także atomów halogenów,
- aromatyczną grupę heteroarylową, w której 1 lub więcej atomów węgla zostało zastąpionych przez 1 lub więcej heteroatomów z grupy zawierającej atomy tlenu, azotu lub siarki,
- grupę alkilowo-arylową, w której zdefiniowana powyżej aromatyczna grupa arylowa połączona jest z cząsteczką salinomycyny przy pomocy łańcucha węglowego zawierającego od 1 do 5 atomów węgla;

oraz ich sole.

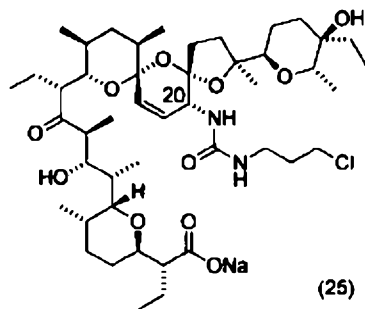
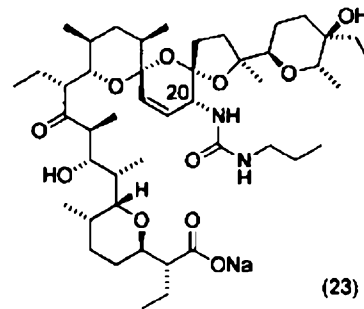
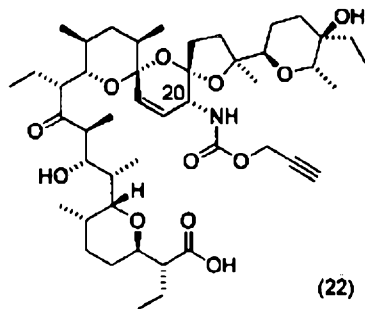
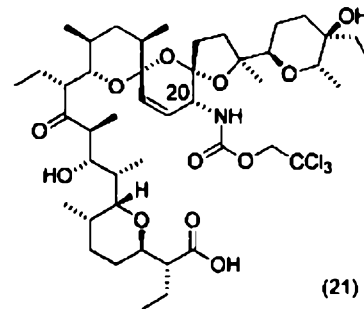
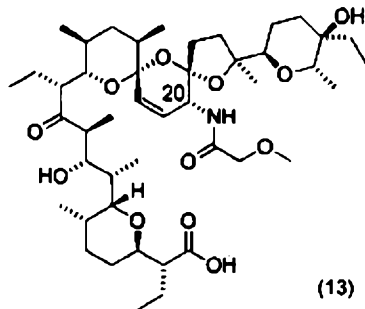
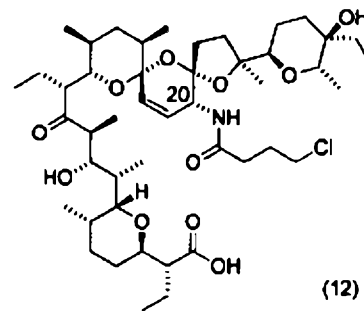
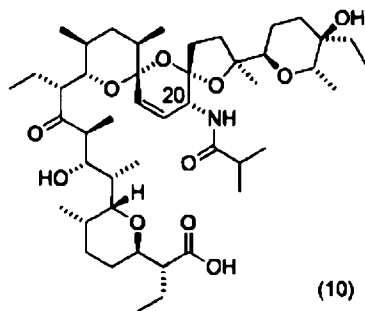
Korzystnie związkami tymi są pochodne o wzorach:



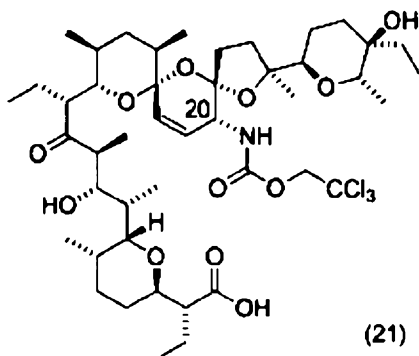




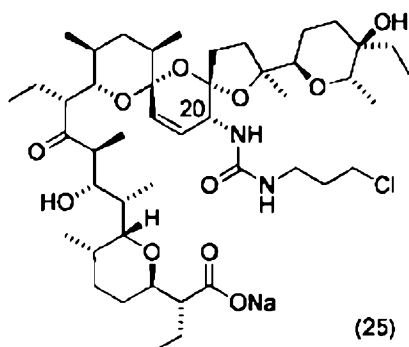
Korzystniejsze związki według wynalazku mają wzory:



Korzystny jest związek o wzorze:

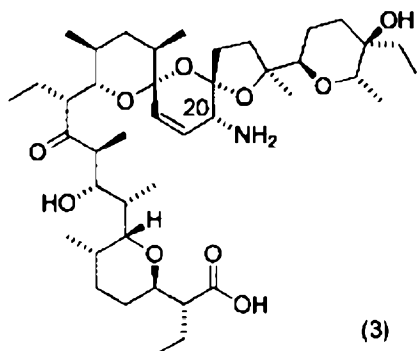


Również korzystny jest związek o wzorze:



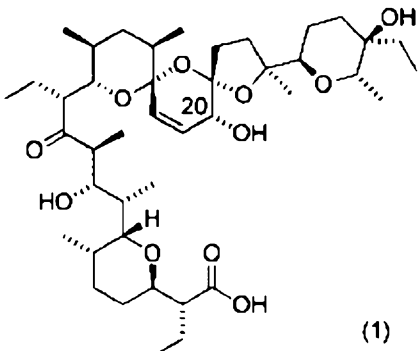
Przedmiotem wynalazku jest również kompozycja farmaceutyczna zawierająca powyższy związek oraz co najmniej jedną farmaceutycznie akceptowalną substancję pomocniczą.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania produktu pośredniego do otrzymywania związków określonych powyżej. Produkt pośredni stanowi C20-aminosalinomycynę o wzorze (3):

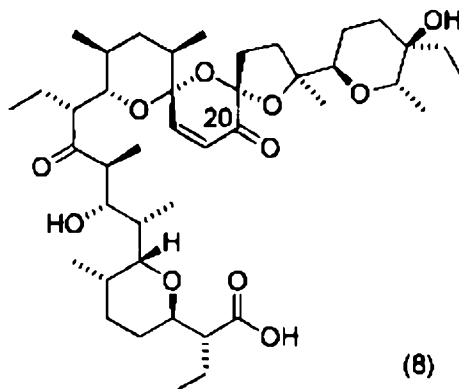


lub jej sól. Sposób otrzymywania tego produktu pośredniego obejmuje etapy:

a) chemoselektywnego utlenienia grupy C20-hydroksylowej salinomycyny o wzorze (1):

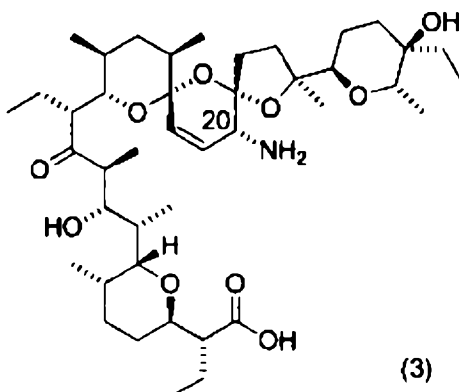


b) po którym następuje stereoselektywne aminowanie redukcyjne otrzymanej C20-oksosalinomy-  
cyny o wzorze (8):

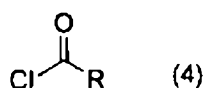


, gdzie jako środek aminujący stosuje się alkoholowy roztwór amoniaku, co prowadzi do utworzenia *in situ* iminowej pochodnej, która redukowana jest następnie borowodorkiem sodu lub pochodną borowodoru sodu, zwłaszcza cyjanoborowodorkiem sodu, w obecności soli ceru.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania związków określonych powyżej w reakcji pomiędzy C20-aminosalinomycyną o wzorze (3):



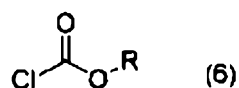
a:  
chlorkiem kwasowym o wzorze ogólnym (4):



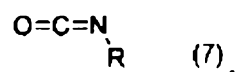
albo  
kwasem karboksylowym o wzorze ogólnym (5):



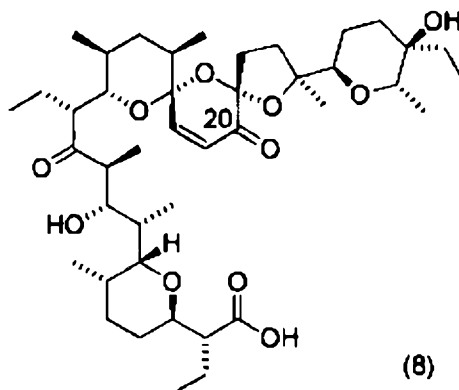
albo  
chloromrówczanem o wzorze ogólnym (6):



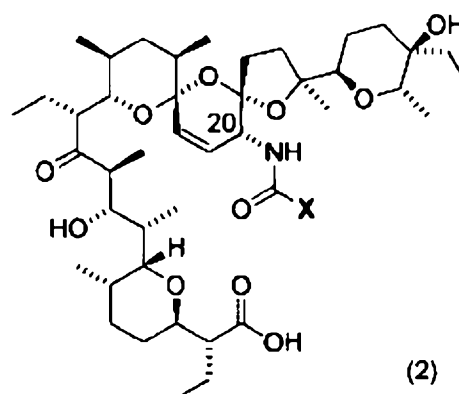
albo  
izocyjanianem o wzorze ogólnym (7):







b) w drugim etapie otrzymywanie związku o wzorze ogólnym (2):



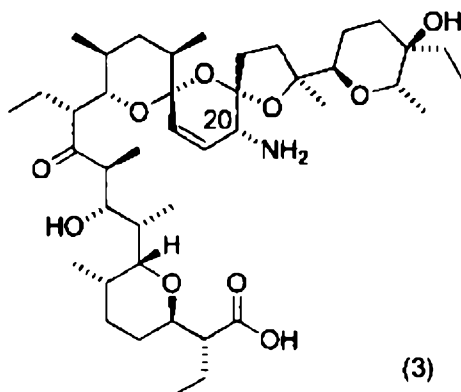
, gdzie:

– X oznacza odpowiednio R, O-R lub NH-R;

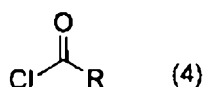
– R oznacza:

- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha węglowego od 1 do 5 atomów halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym atomie węgla, jak również przy różnych atomach węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania eterowe,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 3 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania wielokrotne, zarówno podwójne, jak i potrójne,
- monocykliczną, dicykliczną lub tricykliczną grupę alkilową zawierającą od 5 do 10 atomów węgla,
- aromatyczną grupę arylową, przy czym preferowane są te zawierające sześcioczkłony pierścień aromatyczny,
- aromatyczną grupę arylową podstawioną przez 1 do 3 podstawników wybranych niezależnie spośród grup alkilowych, alkoksylowych, hydroksylowych, nitrowych oraz nitylowych, a także atomów halogenów,
- aromatyczną grupę heteroarylową, w której 1 lub więcej atomów węgla zostało zastąpionych przez 1 lub więcej heteroatomów z grupy zawierającej atomy tlenu, azotu lub siarki,
- grupę alkilowo-arylową, w której zdefiniowana powyżej aromatyczna grupa arylowa połączona jest z cząsteczką salinomycyny przy pomocy łańcucha węglowego zawierającego od 1 do 5 atomów węgla,

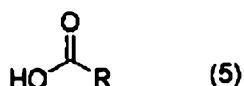
w wyniku reakcji pomiędzy C20-aminosalinomycyną o wzorze (3):



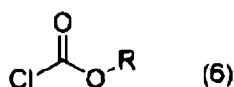
a:  
chlorkiem kwasowym o wzorze ogólnym (4):



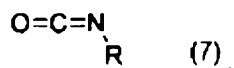
albo  
kwasem karboksylowym o wzorze ogólnym (5):



albo  
chloromrówczanem o wzorze ogólnym (6):



albo  
izocyjanianem o wzorze ogólnym (7):



, gdzie R oznacza jak wskazano powyżej;  
opcjonalnie obejmuje etap przekształcania otrzymanego związku w formie kwasowej w jego sól.

Przedmiotem wynalazku jest również związek określony powyżej do zastosowania jako lek. Korzystnie związek ten jest do zastosowania jako środek przeciwnowotworowy. Korzystnie związek określony powyżej jest do zastosowania w schorzeniach wybranych z grupy: białaczka w tym nieograniczająco ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, szpiczak mnogi; niedrobnokomórkowy rak płuc, w tym nieograniczająco rak komórek nabłonkowych płuc, gruczolakorak płuc, rak płaskonabłonkowy ludzkiego płuca; rak jelita grubego (okrężnicy), w tym nieograniczająco gruczolakorak jelita grubego, rak nabłonka okrężnicy; nowotwór ośrodkowego układu nerwowego, w tym nieograniczająco rak mózgu, taki jak glejak; czerniak, w tym nieograniczająco czerniak złośliwy, czerniak nabłonka, czerniak nienabłonkowy; nowotwór jajnika, w tym nieograniczająco nabłonkowy rak jajnika, torbielakogruczolakorak jajnika; nowotwór nerki, w tym nieograniczająco rak nerkowokomórkowy; nowotwór prostaty, w tym nieograniczająco gruczolakorak prostaty; nowotwór piersi, w tym nieograniczająco gruczolakorak piersi, zapalny rak piersi, gruczolakorak z przerzutami; rak żołądka; rak trzustki; mięsak i rak trzonu macicy, jak i jego lekooporny wariant; rak szyjki macicy; rak pęcherza. Korzystnie związek ten jest do zastosowania w schorzeniach wybranych z grupy: czerniak, nowotwór okrężnicy, nowotwór piersi oraz białaczka bifenotypowa.

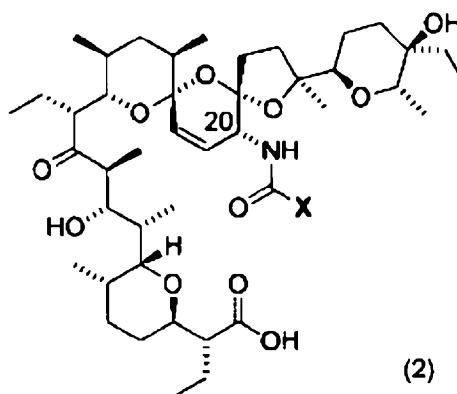
#### Szczegółowy opis wynalazku

Korzystne wykonania wynalazku są ujawnione w poniższym szczegółowym opisie oraz w załączonych zastrzeżeniach. Zdefiniowano tu bardziej szczegółowo różne przykłady wykonania wynalazku. Każdy z tak zdefiniowanych aspektów może być łączony z dowolnym innym aspektem lub aspektami,

chyba że wyraźnie wskazano inaczej. W szczególności, dowolna z cech wskazanych jako preferowane lub korzystne może być połączona z dowolną inną cechą lub cechami wskazanymi jako korzystne lub preferowane.

Odniesienie w całym opisie do „przykładu wykonania” lub „aspektu” wynalazku oznacza, że określona cecha, struktura lub charakterystyka opisana w połączeniu z tym wykonaniem jest zawarta w co najmniej jednym wykonaniu niniejszego wynalazku. Tak więc wystąpienia zwrotów „przykład wykonania” lub „aspekt” w różnych miejscach tego opisu niekoniecznie odnoszą się do tego samego wykonania, ale mogą. Ponadto, szczególne cechy, struktury lub charakterystyki mogą być łączone w jakikolwiek odpowiedni sposób, co jest oczywiste dla znawcy w dziedzinie tego ujawnienia, w jednym lub większej liczbie przykładów wykonania. Ponadto, chociaż niektóre opisane tu aspekty wynalazku obejmują niektóre, ale nie inne cechy niż zawarte w innych przykładach wykonania, kombinacje cech z różnych przykładów wykonania mają być objęte zakresem wynalazku i tworzą różne przykłady wykonania, co jest zrozumiałe przez znawców w dziedzinie. Dowolne z zastrzeganych przykładów wykonania mogą być używane w dowolnej kombinacji.

Przedmiotem wynalazku, w najbardziej ogólnym aspekcie, są związki stanowiące C20-N-acylowe (*N*-amidowe, *N*-karbaminianowe (uretanowe) oraz mocznikowe) pochodne salinomycyny o wzorze ogólnym (2):



, gdzie:

- X oznacza odpowiednio R, O-R lub NH-R;
- R oznacza:
  - grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
  - grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha węglowego od 1 do 5 atomów halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym atomie węgla, jak również przy różnych atomach węgla,
  - grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania eterowe,
  - grupę alkilową prostą zawierającą od 3 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania wielokrotne, zarówno podwójne, jak i potrójne,
  - monocykliczną, dicykliczną lub tricykliczną grupę alkilową zawierającą od 5 do 10 atomów węgla,
  - aromatyczną grupę arylową, przy czym preferowane są te zawierające sześciocząłkowy pierścień aromatyczny,
  - aromatyczną grupę arylową podstawioną przez 1 do 3 podstawników wybranych niezależnie spośród grup alkilowych, alkoksylowych, hydroksylowych, nitrowych oraz nitrylowych, a także atomów halogenów,
  - aromatyczną grupę heteroarylową, w której 1 lub więcej atomów węgla zostało zastąpionych przez 1 lub więcej heteroatomów z grupy zawierającej atomy tlenu, azotu lub siarki,
  - grupę alkilowo-arylową, w której zdefiniowana powyżej aromatyczna grupa arylowa połączona jest z cząsteczką salinomycyny przy pomocy łańcucha węglowego zawierającego od 1 do 5 atomów węgla;

oraz ich sole.

Związki według wynalazku mają konfigurację absolutną *R* na asymetrycznym atomie węgla C-20. Konfiguracja absolutna nowych pochodnych na asymetrycznym atomie węgla C-20 jest tożsama z konfiguracją absolutną na asymetrycznym atomie węgla C-20 wyjściowej salinomycyny. Otrzymywanie nowych pochodnych salinomycyny według wynalazku zapewnia zatem retencję konfiguracji na asymetrycznym atomie węgla C-20 salinomycyny.

Ugrupowaniem *X* w związkach według wynalazku może być *R*, *O*–*R* lub *NH*–*R*. Korzystnie, jeśli *X* oznacza *R*. Wówczas pochodne salinomycyny nazwać można pochodnymi *N*-amidowymi. Korzystnie również, gdy *R* oznacza *O*–*R*. Wówczas pochodne salinomycyny nazwać można pochodnymi *N*-karbaminianowymi (uretanowymi). Również korzystnie *R* może oznaczać *NH*–*R*. Wówczas pochodne salinomycyny nazwać można pochodnymi mocznikowymi. Dla wszystkich tutaj wymienionych typów nowych pochodnych salinomycyny podstawnik *R* jest jak zdefiniowano nieograniczająco szczegółowo poniżej. Znacząca będzie wiedział, iż inne podstawniki *R* podobne do wymienionych poniżej, nawet do wymienionych jako konkretne grupy, znajdują się również w zakresie wynalazku.

W korzystnym przykładzie wykonania wynalazku podstawnikiem *R* we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest grupa alkilowa prosta lub rozgałęziona zawierająca od 1 do 10 atomów węgla. Korzystnie podstawnikiem *R* jest grupa alkilowa prosta. Korzystnie również, gdy *R* stanowi grupę alkilową rozgałęzioną. Korzystnie grupa alkilowa zawiera 1 do 10 atomów węgla, bardziej korzystnie 1–5 atomów węgla, również korzystnie 1–3 atomów węgla. Korzystnie *R* stanowi resztę metylową, etylową, *n*-butylową, izopropylową, neopentylową.

W innym korzystnym przykładzie wykonania podstawnikiem *R* we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest grupa alkilowa prosta lub rozgałęziona zawierająca od 1 do 10 atomów węgla podstawiona w dowolnej pozycji łańcucha węglowego od 1 do 5 atomami halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym atomie węgla, jak również przy różnych atomach węgla. Halogen oznacza atom fluoru (*F*), chloru (*Cl*), bromu (*Br*) lub jodu (*I*), zwłaszcza atom chloru. Korzystnie podstawnikiem *R* jest grupa alkilowa prosta. Korzystnie również, gdy *R* stanowi grupę alkilową rozgałęzioną. Korzystnie grupa alkilowa zawiera 1 do 10 atomów węgla, bardziej korzystnie 1–5 atomów węgla, również korzystnie 1–3 atomów węgla. Korzystnie *R* jest monohalogenoalkilem. Korzystnie również *R* jest dihalogenoalkilem lub trihalogenoalkilem. Korzystnie *R* stanowi reszta chlorometylowa, 3-chloropropylowa, 2,2,2-trichloroetylowa.

W kolejnym korzystnym przykładzie wykonania podstawnikiem *R* we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest grupa alkilowa prosta zawierająca od 2 do 10 atomów węgla, zawierająca w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania eterowe (ugrupowanie eterowe, –*O*–). Korzystnie podstawnikiem *R* jest grupa alkilowa prosta. Korzystnie również, gdy *R* stanowi grupę alkilową rozgałęzioną. Korzystnie grupa alkilowa zawiera 2 do 10 atomów węgla, bardziej korzystnie 2–5 atomów węgla, również korzystnie 2–3 atomów węgla. Grupa alkilowa może zawierać od 1 do 3 ugrupowań eterowych, korzystnie 2, a jeszcze korzystniej jedną grupę –*O*–. Korzystnie *R* stanowi reszta eteru dimetylowego.

W korzystnych wariantach wynalazku możliwe są również grupy *R* stanowiące grupę alkilową jak zdefiniowano powyżej, zawierające zarówno podstawnik/i halogenowe, jak i ugrupowanie eterowe. Halogen oznacza atom fluoru (*F*), chloru (*Cl*), bromu (*Br*) lub jodu (*I*), zwłaszcza atom chloru. Korzystnie *R* stanowi alkil podstawiony jednym atomem halogenu i zawierający jedno ugrupowanie eterowe.

W kolejnym korzystnym przykładzie wykonania podstawnikiem *R* we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest grupa alkilowa prosta zawierająca od 3 do 10 atomów węgla zawierająca w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania wielokrotne, zarówno podwójne, jak i potrójne. Korzystnie grupa alkilowa zawiera 3 do 10 atomów węgla, bardziej korzystnie 3–5 atomów węgla, również korzystnie 3 atomy węgla. Korzystnie grupę *R* stanowi reszta propargilowa (prop-2-ynowa).

W kolejnym korzystnym przykładzie wykonania podstawnikiem *R* we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest monocykliczna, dicykliczna lub tricykliczna grupa alkilowa zawierająca od 5 do 10 atomów węgla. Korzystnie cykliczna grupa alkilowa może być podstawiona halogenem. Halogen oznacza atom fluoru (*F*), chloru (*Cl*), bromu (*Br*) lub jodu (*I*), zwłaszcza atom chloru. Korzystnie *R* jest adamantylem. *R* może być również podstawnikiem cyklopentylowym lub cykloheksylowym.

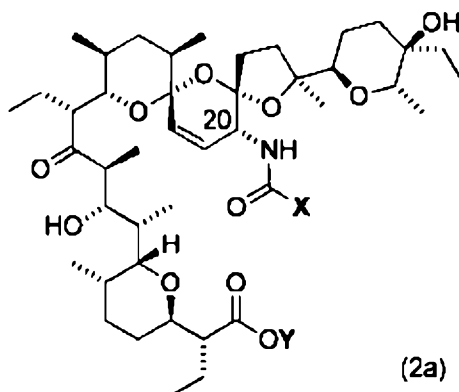
W kolejnym korzystnym przykładzie wykonania podstawnikiem *R* we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest aromatyczna grupa arylowa. Korzystnie *R* stanowi sześciocząłkowy pierścień aromatyczny. Korzystnie *R* jest podstawnikiem fenylowym.

W kolejnym korzystnym przykładzie wykonania podstawnikiem R we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest aromatyczna grupa arylova podstawiona przez 1 do 3 podstawników wybranych niezależnie spośród grup alkilowych, alkoksylowych, hydroksylowych, nitrowych lub nitylowych, a także atomów halogenów. Halogen oznacza atom fluoru (F), chloru (Cl), bromu (Br) lub jodu (I), zwłaszcza atom chloru. Korzystnie grupa arylova zawiera dwa spośród wymienionych wyżej podstawników. Mogą nimi być dwa halogeny. Mogą nimi być również dwie grupy nitrowe. Korzystnie również, gdy grupa arylova zawiera alkil podstawiony jednym halogenem lub dwoma, jak i trzema halogenami. Powyższe grupy mogą być w pozycji *orto*, *meta* lub *para* grupy arylowej. Korzystnie podstawnikiem R jest podstawnik *para*-chlorometylofenylovy,

W kolejnym korzystnym przykładzie wykonania podstawnikiem R we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest aromatyczna grupa heteroarylova, w której 1 lub więcej atomów węgla zostało zastąpionych przez 1 lub więcej heteroatomów z grupy zawierającej atomy tlenu, azotu lub siarki. Korzystnie heteroatomem jest atom tlenu. Korzystnie heteroatomem jest atom siarki. Korzystnie heteroatomem jest atom azotu. Korzystnie podstawnikiem R jest reszta 1-furylova.

W kolejnym korzystnym przykładzie wykonania podstawnikiem R we wzorze ogólnym (2) definiującym związki według wynalazku jest grupa alkilowo-arylova, w której zdefiniowana powyżej aromatyczna grupa arylova połączona jest z cząsteczką salinomycyny przy pomocy łańcucha węglowego zawierającego od 1 do 5 atomów węgla. Korzystnie łańcuch węglowy jest prosty lub rozgałęziony.

Związki według wynalazku korzystnie mogą występować również w postaci soli. Wzór ogólny soli pochodnych salinomycyny według wynalazku przedstawia wzór ogólny (2a):



Korzystnymi solami związków według wynalazku są: sól sodowa, potasowa, litowa. Wówczas Y we wzorze ogólnym (2a) jest odpowiednio: Na, K, Li. Korzystnie Y oznacza Na. W zakresie wynalazku są również sole z metalami dwuwartościowymi, takimi jak np. magnez.

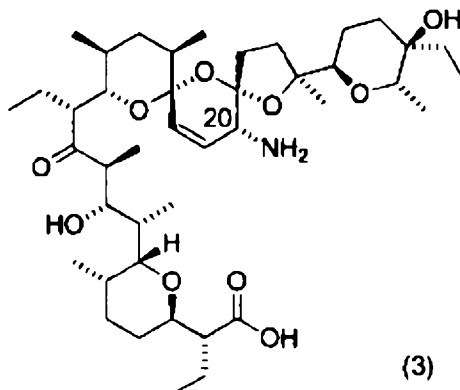
W zakresie wiedzy znawcy w dziedzinie będzie wybór i dostosowanie warunków do otrzymania pochodnej kwasowej lub jej żądanej soli. Ekstrakcja salinomycyny oraz jej pochodnych z wodnym roztworem kwasu siarkowego(VI) lub kwasu solnego powoduje otrzymanie formy kwasowej (Y=H). Z drugiej strony, ekstrakcja salinomycyny oraz jej pochodnych z wodnym roztworem odpowiedniej soli nieorganicznej skutkuje otrzymaniem związków w postaci soli (Y=Na, K, Li). Korzystnie dla otrzymania sodowej, potasowej lub litowej soli związku według wynalazku stosuje się ekstrakcję z węglanem sodu, potasu lub litu.

Przedmiotem wynalazku jest również kompozycja zawierająca związek według wynalazku oraz co najmniej jedną farmaceutycznie akceptowalną substancję pomocniczą. Farmaceutycznie akceptowalne substancje pomocnicze są znane w dziedzinie i przedstawione przykładowo w Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edycja E. W. Martin, Mack Publishing Company, wydanie 19, Easton, Pa. Korzystnie kompozycja zawiera jeden związek według wynalazku oraz co najmniej jedną farmaceutycznie akceptowalną substancję pomocniczą.

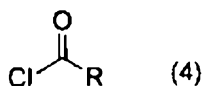
Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania nowych związków według wynalazku, C20-modyfikowanych pochodnych salinomycyny, w reakcji pomiędzy C20-aminosalinomycyną (3) a związkami o wzorach ogólnych (4), (5), (6) lub (7) zgodnie z zastrzeżeniami. Dla przedstawienia szczegółów, sposób ten wyjaśniony będzie dla dwóch korzystnych aspektów:

- gdzie reagentami są związki o wzorach ogólnych (4), (5) lub (6),
- gdzie reagentem jest związek o wzorze ogólnym (7).

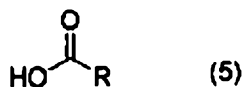
Tak więc korzystnym przykładem wykonania wynalazku jest sposób otrzymywania związków według wynalazku, takich jak: C20-*N*-amidowe oraz C20-*N*-karbaminianowe (uretanowe) pochodne salinomycyny o wzorze ogólnym (2), w którym X oznacza odpowiednio R lub O-R, zaś R ma wyżej podane znaczenie, w reakcji pomiędzy C20-aminosalinomycyną o wzorze (3):



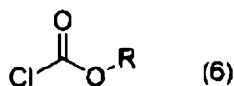
oraz  
chlorkiem kwasowym o wzorze ogólnym (4):



albo  
kwasem karboksylowym o wzorze ogólnym (5):



albo  
chloromrówczanem o wzorze ogólnym (6):



, w których R ma wyżej podane znaczenie.

Sposób ten opcjonalnie obejmuje etap przekształcania otrzymanego związku w formie kwasowej w jego sól. W zakresie wiedzy znawcy będzie wybór warunków reakcji dla konwersji pochodnej salinomycyny w formie kwasowej w jej sól.

Kluczowe dla powodzenia reakcji otrzymywania C20-*N*-amidowych oraz C20-*N*-karbaminianowych (uretanowych) pochodnych salinomycyny o wzorze ogólnym (2), w których X oznacza odpowiednio R lub O-R, zaś R ma wyżej podane znaczenie, jest odpowiednia kolejność dodawania poszczególnych reagentów. Ze względu na dużą wrażliwość salinomycyny na działanie chlorków kwasowych o wzorze ogólnym (4), chloromrówczanów o wzorze ogólnym (6) oraz tworzący się w wyniku reakcji chlorowódór, zarówno chlorek kwasowy o wzorze ogólnym (4), jak i chloro mrówczan o wzorze ogólnym (6) miesza się początkowo z 4-dimetyloaminopirydyną (DMAP) oraz odpowiednią aminą alifatyczną, po czym do całości dodaje się na samym końcu C20-aminosalinomycynę o wzorze (3) zgodnie z procedurą opisaną szczegółowo poniżej.

W przypadku zastosowania chlorków kwasowych o wzorze ogólnym (4) lub chloromrówczanów o wzorze ogólnym (6) reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie, najkorzystniej w chloroformie lub chlorku metylenu, lub w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym – prostym nitrilu, korzystnie w acetonitrilu, lub w prostym trzeciorzędowym amidzie, korzystnie w *N,N*-dimetyloformamidzie, w obecności 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) pełniącej rolę aktywatora reakcji oraz aminy alifatycznej. Korzystne jest także prowadzenie reakcji w warunkach bezwodnych. Jako aminę alifatyczną stosuje się trietyloaminę, tripropyloaminę, tributylloaminę, diizopropyloaminę, tri-

izopropylloaminę, triizobutylloaminę, *N,N*-diizopropylloetyloaminę, najkorzystniej trietyloaminę. Aminy alifatyczne kompleksują tworząc się w wyniku reakcji produkt uboczny, czyli chlorowódor. Wiązanie chlorowodoru przez aminę alifatyczną uniemożliwia zajście niepożądanych reakcji ubocznych oraz zapobiega nieodwracalnemu rozpadowi związku o wzorze (3).

W początkowym etapie trwania reakcji, do roztworu 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie, najkorzystniej w chloroformie lub chlorku metylenu, lub w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym – prostym nitylu, korzystnie w acetonitrylu, lub w prostym trzeciorzędowym amidzie, korzystnie w *N,N*-dimetyloformamidzie, w temperaturze 0°C dodaje się aminę alifatyczną, korzystnie trietyloaminę, a następnie chlorek kwasowy o wzorze ogólnym (4) lub chloromrówczan o wzorze ogólnym (6). Całość miesza się w obniżonej temperaturze (<5°C) przez 30 minut, po czym dodaje się C20-aminosalinomycynę o wzorze (3) uprzednio rozpuszczoną w minimalnej ilości apolarnego rozpuszczalnika chloroalifatycznego, aromatycznego lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie, najkorzystniej w chloroformie lub chlorku metylenu, lub w minimalnej ilości rozpuszczalnika polarnego aprotycznego – prostym nitylu, korzystnie w acetonitrylu, lub w prostym trzeciorzędowym amidzie, korzystnie w *N,N*-dimetyloformamidzie. Z uwagi na ryzyko zajścia reakcji ubocznych oraz możliwość nieodwracalnego rozpadu związku o wzorze (3) reakcja powinna być prowadzona w obniżonej temperaturze (<5°C) przez kolejne 30 minut. Po tym czasie zaprzestaje się chłodzenia układu reakcyjnego, mieszaninę reakcyjną pozostawia się do ogrzania do temperatury pokojowej i mieszanie kontynuuje się do momentu zakończenia reakcji, korzystnie stopień przereagowania reagentów kontroluje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC.

Mieszaninę reakcyjną przemywa się z kolei przy pomocy wodnego roztworu węglanu sodu (0,1 M). Warstwę organiczną odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszcza przy użyciu chromatografii kolumnowej, korzystnie przy pomocy chromatografu CombiFlash® z detektorem ELS, stosując kolumnę wypełnioną krzemionką oraz mieszaninę rozpuszczalników organicznych, korzystnie mieszaniny octanu etylu:*n*-heksan ze wzrastającym gradientem stężenia octanu etylu od 0% do 100%. Połączone frakcje zawierające C20-*N*-amidowy lub C20-*N*-karbaminianowy (uretanowy) produkt reakcji odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza się w apolarnym rozpuszczalniku chloroalifatycznym, korzystnie w chlorku metylenu lub chloroformie, po czym ekstrahuje z wodnym roztworem odpowiedniej soli (0,1 M), bądź z wodnym roztworem kwasu siarkowego(VI) lub solnego (pH = 1,0) i na końcu z wodą. Połączone warstwy organiczne odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie kilkakrotnie odparowuje z *n*-pentanem.

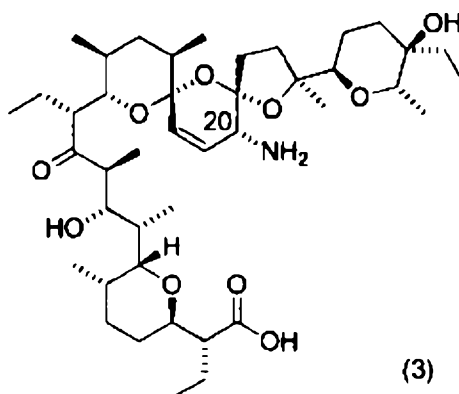
W przypadku zastosowania kwasów karboksylowych o wzorze ogólnym (5) dla powodzenia reakcji konieczne jest ich odpowiednie wstępne zaktywowanie przy pomocy odpowiednich czynników sprzęgających/aktywatorów według procedury opisanej szczegółowo poniżej. Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie, najkorzystniej w chloroformie lub chlorku metylenu, lub w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym – prostym nitylu, korzystnie w acetonitrylu, lub w prostym trzeciorzędowym amidzie, korzystnie w *N,N*-dimetyloformamidzie. Korzystne jest także prowadzenie reakcji w warunkach bezwodnych oraz w obecności czynnika sprzęgającego. Jako czynnik sprzęgający stosuje się *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), *N,N'*-diizopropyllokarbodiimid (DIC), 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI), chlorowodorek 1-etylo-3-(3'-dimetyloaminopropyllo)karbodiimidu (EDC), heksafluorofosforan 2-(7-aza-1*H*-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylomocznika (HATU), przy czym w przypadku użycia *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) korzystne jest stosowanie dodatkowo kwasu *p*-toluenosulfonowego, *N*-hydroksysukcynoimidu, 3-hydroksy-4-keto-1,2,3-benzotriazyny, *N*-hydroksybenzotriazolu (HOBt), 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) lub 4-pirolidynopirydyny.

W początkowym etapie trwania reakcji, do roztworu kwasu karboksylowego o wzorze ogólnym (5) w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie, najkorzystniej w chloroformie lub chlorku metylenu, lub w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym – prostym nitylu, korzystnie w acetonitrylu, lub prostym trzeciorzędowym amidzie, korzystnie w *N,N*-dimetyloformamidzie, w temperaturze pokojowej dodaje się czynnik sprzęgający. Całość miesza się w temperaturze pokojowej przez 30 minut, po czym dodaje się C20-aminosalinomycynę o wzorze (3) uprzednio rozpuszczoną w minimalnej ilości apolarnego rozpuszczalnika chloroalifatycznego, aromatycznego lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie, najkorzystniej w chloroformie

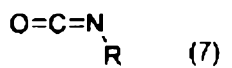
lub chlorku metylenu, lub w minimalnej ilości rozpuszczalnika polarnego aprotycznego – prostym nitylu, korzystnie w acetonitrylu, lub w prostym trzeciorzędowym amidzie, korzystnie w *N,N*-dimetyloformamidzie. Mieszanie kontynuuje się w temperaturze pokojowej do momentu zakończenia reakcji, korzystnie stopień przereagowania reagentów kontroluje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC.

Mieszaninę reakcyjną odparowuje się następnie pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszcza przy użyciu chromatografii kolumnowej, korzystnie przy pomocy chromatografu CombiFlash® z detektorem ELS, stosując kolumnę wypełnioną krzemionką oraz mieszaninę rozpuszczalników organicznych, korzystnie mieszaniny octanu etylu:*n*-heksan ze wzrastającym gradientem stężenia octanu etylu od 0% do 100%. Połączone frakcje zawierające C20-*N*-amidowy produkt reakcji odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza się w apolarnym rozpuszczalniku chloroalifatycznym, korzystnie w chlorku metylenu lub chloroformie, po czym ekstrahuje z wodnym roztworem odpowiedniej soli (0,1 M), bądź z wodnym roztworem kwasu siarkowego(VI) lub solnego (pH = 1,0) i na końcu z wodą. Połączone warstwy organiczne odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie kilkakrotnie odparowuje z *n*-pentanem.

W innym wspomnianym korzystnym przykładzie wykonania przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych C20-mocznikowych pochodnych salinomycyny o wzorze ogólnym (2), w którym X oznacza NH-R, zaś R ma wyżej podane znaczenie, w reakcji pomiędzy C20-aminosalinomycyną o wzorze (3):



oraz izocyjanianem o wzorze ogólnym (7):



, w którym R ma wyżej podane znaczenie.

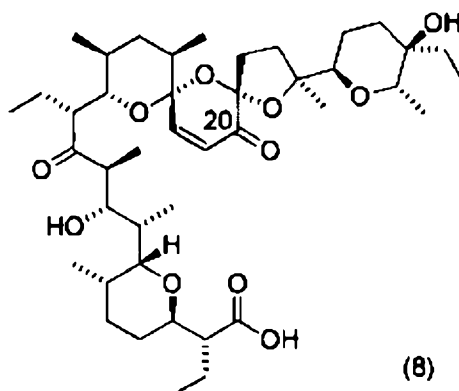
Sposób ten opcjonalnie obejmuje etap przekształcania otrzymanego związku w formie kwasowej w jego sól. W zakresie wiedzy znawcy będzie wybór warunków reakcji dla konwersji pochodnej salinomycyny w formie kwasowej w jej sól.

Reakcję z izocyjanianem o wzorze ogólnym (7) prowadzi się w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie, najkorzystniej w chloroformie lub chlorku metylenu, lub w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym – prostym nitylu, korzystnie w acetonitrylu, lub w prostym trzeciorzędowym amidzie, korzystnie w *N,N*-dimetyloformamidzie, w temperaturze pokojowej. Korzystne jest również prowadzenie reakcji w warunkach bezwodnych.

Po zakończeniu reakcji, korzystnie stopień przereagowania reagentów kontroluje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC, mieszaninę reakcyjną przemywa się przy pomocy wodnego roztworu wodorowęglanu sodu (0,1 M). Warstwę organiczną odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszcza przy użyciu chromatografii kolumnowej, korzystnie przy pomocy chromatografu CombiFlash® z detektorem ELS, stosując kolumnę wypełnioną krzemionką oraz mieszaninę rozpuszczalników organicznych, korzystnie mieszaniny octanu etylu:*n*-heksan ze wzrastającym gradientem stężenia octanu etylu od 0% do 100%. Połączone frakcje zawierające C20-mocznikowy produkt reakcji odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza się w apolarnym rozpuszczalniku chloroalifatycznym, korzystnie w chlorku metylenu lub chloroformie, po czym ekstrahuje

z wodnym roztworem odpowiedniej soli (0,1 M), bądź z wodnym roztworem kwasu siarkowego(VI) lub solnego (pH = 1,0) i na końcu z wodą. Połączone warstwy organiczne odparowuje się do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie kilkakrotnie odparowuje z *n*-pentanem.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania produktu pośredniego dla sposobu otrzymywania pochodnych salinomycyny modyfikowanych przy węglu C-20. Trójetapowa procedura syntezy związku pośredniego o wzorze (3) rozpoczyna się od chemoselektywnego utlenienia grupy C20-hydroksylowej salinomycyny o wzorze (1) zachodzącego w apolarnym rozpuszczalniku chloroalifatycznym, korzystnie w chlorku metylenu lub chloroformie, w temperaturze pokojowej przy użyciu aktywowanego tlenku manganu(IV) [według: EP3191493 lub Mai *et al.*, *Nature Chemistry*, 9, 2017, 1025–1033], po którym następuje dwuetapowe aminowanie redukcyjne otrzymanej C20-oksosalinomycyny [według ogólnej procedury opisanej w: EP3191493 lub Mai *et al.*, *Nature Chemistry*, 9, 2017, 1025–1033] o wzorze (8):



Ogólnie przedstawiona w stanie techniki konwersja związku o wzorze (8) w związek o wzorze (3) została na potrzeby wynalazku dopracowana i zmodyfikowana. Zmodyfikowana procedura otrzymywania związku o wzorze (8) obejmuje użycie alkoholowego roztworu amoniaku o odpowiednim stężeniu, a także wydłużenie czasu aktywacji (tworzenia iminy) do 5 godzin. W zmodyfikowanej procedurze nie ma również konieczności użycia kwasu octowego na etapie tworzenia iminy oraz obróbki mieszaniny poreakcyjnej przy pomocy ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz, co znacząco upraszcza i przyspiesza całą procedurę syntetyczną.

W pierwszym etapie aminowania redukcyjnego amoniak (7,0 N w metanolu) reaguje z C20-oksosalinomycyną o wzorze (8) rozpuszczoną w rozpuszczalniku alkoholowym, korzystnie w metanolu lub etanolu, w temperaturze pokojowej z wytworzeniem *in situ* iminy. Zgodnie z procedurą Luche'a, w drugim etapie aminowania redukcyjnego produkt pośredni reakcji (iminę) redukuje się poprzez powolne dodawanie borowodorku sodu lub pochodnej borowodorku sodu, zwłaszcza cyjanoborowodorku sodu, w obecności soli ceru, korzystnie chlorku ceru(III), otrzymując C20-aminosalinomycynę o wzorze (3).

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie nowych pochodnych salinomycyny według wynalazku do zastosowania jako leku. W korzystnym przykładzie wykonania związku według wynalazku są przeznaczone do zastosowania jako środki przeciwnowotworowe.

Związek według wynalazku nadaje się do zastosowania w schorzeniach wybranych nieograniczająco z grupy: białaczka, w tym nieograniczająco ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, białaczka bifenotypowa, szpiczak mnogi; niedrobnokomórkowy rak płuc, w tym nieograniczająco rak komórek nabłonkowych płuc, gruczolakorak płuc, rak płaskonabłonkowy ludzkiego płuca; rak jelita grubego (okrężnicy), w tym nieograniczająco gruczolakorak jelita grubego, rak nabłonka okrężnicy; nowotwór ośrodkowego układu nerwowego, w tym nieograniczająco rak mózgu, taki jak glejak; czerniak, w tym nieograniczająco czerniak złośliwy, czerniak nabłonka, czerniak nienabłonkowy; nowotwór jajnika, w tym nieograniczająco nabłonkowy rak jajnika, torbielakogruczolakorak jajnika; nowotwór nerki, w tym nieograniczająco rak nerkowokomórkowy; nowotwór prostaty, w tym nieograniczająco gruczolakorak prostaty; nowotwór piersi, w tym nieograniczająco gruczolakorak piersi, zapalny rak piersi, gruczolakorak z przerzutami; rak żołądka; rak trzustki; mięsak i rak trzonu macicy, jak i jego lekooporny wariant; rak szyjki macicy; rak pęcherza.

W niniejszym opisie termin nowotwór i rak stosowane są zamiennie.

Wstępne badania wskazują, iż aktywność przeciwnowotworową związku według wynalazku wykazują względem linii komórkowych wymienionych poniżej:

HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR, A549/ATCC, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H460, NCI-H522, COLO 205, HCC-2998, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW-620, SF-268, SF-295, SF-539, SNB-19, SNB-75, U251, LOXIMVI, MALME-3M, M14, MDA-MB-435, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-KIEL-5, UACC-257, UACC-62, IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, NCI/ADR-RES, SK-OV-3, 786-0, A498, ACHN, CAKI-1, RXF 393, SN12C, TK-10, UO-31, PC-3, DU-145, MCF7, MDA-MB-231/ATCC, HS 578T, BT-549, T-47D, MDA-MB-468, KATOIII, NCI-N87, SNU-16, SNU-5, AGS, SNU-1, Capan-2, ATCC HTB-80, Panc 10.05, CFPAC-1, HPAF-II, SW 1990, BxPC-3, AsPC-1, MES-SA, MES-SA/DX5, KLE, HEC-1-A, AN3 CA, Ca-Ski, DoTc2 4510, SiHa, C-33-A, 5637, KU-19-19, MBT-2, HCV29T, Hu1703He. Dla niektórych z tych linii komórkowych konkretne schorzenia im odpowiadające wymieniono już w powyższej liście.

Działanie przeciwnowotworowe rozumie się jako:

- przeciwdziałanie występowania nowotworu,
- hamowanie rozrostu komórek nowotworowych (hamowanie proliferacji),
- indukowanie śmierci komórek nowotworowych (działanie proapoptyczne),
- zapobieganie lub hamowanie przerzutowania komórek nowotworowych,
- hamowanie zjawiska wielolekowej oporności,
- hamowanie procesu angiogenezy,
- eliminowanie lub minimalizowanie skutków choroby nowotworowej.

Badania *in vitro* przeprowadzone wobec szeregu nowotworowych linii komórkowych potwierdziły wysokie działanie cytotoksyczne otrzymanych po raz pierwszy związków, które znacznie przewyższało bioaktywność niemodyfikowanej chemicznie salinomycyny. Uzyskane pochodne salinomycyny cechują się nie tylko wysoką aktywnością przeciwnowotworową, ale także wysoką selektywnością działania wobec komórek nowotworowych. Ponadto, porównanie aktywności przeciwnowotworowej oraz toksyczności nowo zsyntezowanych związków z tą wykazywaną przez znane literaturowo pochodne salinomycyny, w tym przez zbliżone strukturalnie C20-Ar-amidowe oraz C20-N-karbaminianowe (uretanowe) pochodne C20-*epi*-salinomycyny z odwróconą konfiguracją absolutną (konfiguracją absolutną *S* zamiast *R*) na asymetrycznym atomie węgla w pozycji C-20 [Li *et al.*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 148, 2018, 279–290], jednoznacznie udowadnia przewagę związków będących przedmiotem niniejszego wynalazku w kontekście ich możliwego zastosowania terapeutycznego.

W badaniach *in vitro* wykorzystano następujące nowotworowe linie komórkowe:

- B16-F0 (mysi czerniak),
- Hs294T (ludzki czerniak),
- LoVo (lekowrażliwy ludzki nowotwór okrężnicy),
- LoVo/DX (lekooporny ludzki nowotwór okrężnicy),
- MCF-7 (ludzki nowotwór piersi),
- MV-4-11 (ludzka białaczka bifenotypowa).

W badaniach wykorzystano także normalne mysie fibroblasty BALB/3T3 celem wyznaczenia wartości współczynników selektywności związków użytych w testach. Wartości te pozwalają przewidzieć kierunek działania pochodnych salinomycyny odpowiadając na pytanie – czy związki te będą w pierwszej kolejności niszczyć komórki nowotworowe, czy też atakować prawidłowe komórki organizmu.

W tabeli 1 zestawiono dane dotyczące wszystkich stosowanych w badaniach *in vitro* linii komórkowych (zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych).

Tabela 1

Symbol linii komórkowej	Nazwa linii komórkowej	Źródło pochodzenia linii komórkowej	Liczba komórek na dołek w teście
B16-F0	mysi czerniak	ATCC	0,25x10 <sup>4</sup>
IIs294T	ludzki czerniak	ATCC	0,20x10 <sup>4</sup>
LoVo	lekowrażliwy ludzki nowotwór okrężnicy	ATCC	1,00x10 <sup>4</sup>
LoVo/DX	lekooporny ludzki nowotwór okrężnicy	Prof. E. Borowski, Politechnika Gdańska	1,00x10 <sup>4</sup>
MCF-7	ludzki nowotwór piersi	ECACC	0,75x10 <sup>4</sup>
MV-4-11	ludzka białaczka bifenotypowa	ATCC	1,00x10 <sup>4</sup>
BALB/3T3	normalne mysie fibroblasty	ATCC	1,00x10 <sup>4</sup>

W trakcie badań cytotoksyczności w testach *in vitro* stosowano media hodowlane oraz odczynniki zestawione w tabeli 2.

Tabela 2

Nazwa	Producent
medium hodowlane dla linii B16-F0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OptiMEM (PChO, IITD PAN, Polska),</li> <li>• RPMI 1640 + HEPES (PChO, IITD PAN, Polska),</li> <li>• 5% FBS (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 0,5 mM pirogronian sodu (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 4,5 g/L glukoza (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 0,1 mg/mL streptomycyna, 100 U/mL penicylina (Sigma-Aldrich, Niemcy oraz Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
medium hodowlane dla linii Hs294T	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RPMI 1640 W/GLUTAMAX-I (Gibco, Wielka Brytania),</li> <li>• OptiMEM W/GLUTAMAX (Invitrogen, USA),</li> <li>• 10% FBS (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 5,5 g/L glukoza (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 0,1 mg/mL streptomycyna, 100 U/mL penicylina (Sigma-Aldrich, Niemcy oraz Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
medium hodowlane dla linii LoVo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OptiMEM + RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD PAN, Polska),</li> <li>• 5% FBS HyClone (GE Healthcare, USA),</li> <li>• 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 1 mM pirogronian sodu (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 0,1 mg/mL streptomycyna, 100 U/mL penicylina (Sigma-Aldrich, Niemcy oraz Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
medium hodowlane dla linii LoVo/DX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• medium dla linii LoVo/DX podobnie jak dla linii LoVo; dodatkowo doksorubicyna (Accord, Wielka Brytania) o stężeniu 10 µg/100 mL medium</li> </ul>
medium hodowlane dla linii MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• płyn Eagle'a (PChO, IITD PAN, Polska),</li> <li>• 10% FBS (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 1% aminokwasy (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 8 µg/mL insulina (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 0,1 mg/mL streptomycyna, 100 U/mL penicylina (Sigma-Aldrich, Niemcy oraz Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>

medium hodowlane dla linii MV-4-11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RPMI 1640 W/GLUTAMAX-I (Gibco, Wielka Brytania),</li> <li>• 10% FBS (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 1 mM pirogronian sodu (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 0,1 mg/mL streptomycyna, 100 U/mL penicylina (Sigma-Aldrich, Niemcy oraz Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
medium hodowlane dla linii BALB/3T3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• płyn Dulbecco (Gibco, Wielka Brytania),</li> <li>• 10% FBS HyClone (GE Healthcare, USA),</li> <li>• 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 0,1 mg/mL streptomycyna, 100 U/mL penicylina (Sigma-Aldrich, Niemcy oraz Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
medium testowe do rozcieńczeń	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RPMI1640+ HEPES (PChO, IITD PAN, Polska),</li> <li>• 10% FBS HyClone (GE Healthcare, USA),</li> <li>• 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 0,1 mg/mL streptomycyna, 100 U/mL penicylina (Sigma-Aldrich, Niemcy oraz Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
10 mM TRIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• woda dejonizowana, ogólnolaboratoryjna, niejałowa,</li> <li>• TRIZMA BASE (Sigma-Aldrich, Niemcy)</li> </ul>
1% kwas octowy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• woda dejonizowana, ogólnolaboratoryjna, niejałowa,</li> <li>• kwas octowy 80% czda (POCH S.A., Polska)</li> </ul>
50% kwas trichlorooctowy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• woda dejonizowana, ogólnolaboratoryjna, niejałowa,</li> <li>• kwas trichlorooctowy czda (POCH S.A., Polska) (w postaci stałej, który naważa się i rozpuszcza w wodzie do uzyskania stężenia 50 %)</li> </ul>
0,1% roztwór sulforodaminy B (SRB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sól sodowa sulforodaminy B (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• 1% kwas octowy</li> </ul>
MTT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• błękit tiazolilowy – bromek tetrazolowy, ~98% (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• PBS (PChO, IITD PAN, Polska)</li> </ul>
bufor lizujący do MTT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• woda MilliQ UF Plus,</li> <li>• dodecylosiarczan sodu (Sigma-Aldrich, Niemcy),</li> <li>• N,N-dimetyloformamid czda (POCH S.A., Polska)</li> </ul>
cisplatyna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji, 1 mg/mL (10 mg/10 mL), 1 fiolka 10 mL (Teva Pharmaceuticals, Polska)</li> </ul>

Badania *in vitro* cytotoksyczności zostały przeprowadzone zgodnie z opisaną poniżej procedurą. Roztwory wyjściowe badanych związków o stężeniu 10 mg/mL przygotowano do każdego doświadczenia *ex tempore*, poprzez rozpuszczenie 1 mg preparatu w 100  $\mu$ L dimetylosulfotlenku (DMSO). Rozpuszczalnikiem dla dalszych rozcieńczeń było medium hodowlane. Związki przetestowano w przedziałach stężeń od 100 do 0,00001  $\mu$ g/mL (dla linii komórkowej B16-F0 oraz Hs294T) oraz od 100 do 0,1  $\mu$ g/mL (dla linii komórkowej LoVo, LoVo/DX, MCF-7, MV-4-11 oraz BALB/3T3).

Oznaczenie działania cytotoksycznego badanych związków oraz związku referencyjnego – cisplatyny (powszechnie stosowanego leku przeciwnowotworowego) wykonano w 96-godzinnych hodowlach *in vitro*. Dla komórek MV-4-11 (ludzka białaczka bifenotypowa) wykonano test redukcji soli tetrazolowej MTT [według: Wietrzyk *et al.*, *Anticancer drugs*, 2007, 18, 447–457] jako ocenę aktywności metabolicznej komórek nowotworowych. Z kolei dla oznaczenia aktywności przeciwproliferacyjnej wszystkich badanych związków wobec linii komórkowej B16-F0 (mysi czerniak), Hs294T (ludzki czerniak), LoVo (lekowrażliwy ludzki nowotwór okrężnicy), LoVo/DX (lekooporny ludzki nowotwór okrężnicy), MCF-7 (ludzki nowotwór piersi) oraz BALB/3T3 (normalne mysie fibroblasty) zastosowano test kolorymetryczny SRB [według: Skehan *et al.*, *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82, 1107–1112] mierzący zahamowanie proliferacji docelowych komórek na podstawie pomiaru ilości białka komórkowego. W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia badanego związku наносzono na 96-dołkowe płytki w 3 powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano minimum 3 razy. Testy *in vitro* cytotoxyczności wykonano według następującej procedury:

- Komórki (pochodzące z hodowli *in vitro*) naniesiono do dołków płytki w liczbie  $0,20 \times 10^4$  (linia Hs294T),  $0,25 \times 10^4$  (linia B16-F0),  $0,75 \times 10^4$  (linia MCF-7) lub  $1,00 \times 10^4$  (linia LoVo, LoVo/DX, MV-4-11 oraz BALB/3T3) komórek w 100  $\mu\text{L}$  medium hodowlanego, a następnie inkubowano w 37°C w wilgotnej atmosferze (wilgotność 85–95%) nasyconej 5% dwutlenkiem węgla ( $\text{CO}_2$ ),
- po upływie 24 godzin do dołków dodano kolejne 100  $\mu\text{L}$  medium (kontrola wzrostu komórek) lub medium zawierającego badane związki w określonych stężeniach,
- płytki inkubowano przez kolejne 72 godziny w inkubatorze (37°C, wilgotna atmosfera (wilgotność 85–95%) nasycona 5%  $\text{CO}_2$ ),
- po upływie 72 godzin inkubacji komórek z badanymi związkami wykonano test MTT lub SRB,
- w każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia badanego związku наносzono w 3 powtórzeniach, zaś doświadczenia powtarzano od 3 do 5 razy.

Odczyt MTT: Do każdego dołka płytki 96-dołkowej dodano 20  $\mu\text{L}$  roztworu MTT. Po 4 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C do każdego dołka dodano 80  $\mu\text{L}$  buforu lizującego. Po kolejnych 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C odczytano gęstość optyczną poszczególnych próbek przy długości fali 570 nm przy użyciu czytnika płytkowego (uniwersalnego) Synergy H4 (BioTek Instruments, USA).

Odczyt SRB: Do każdego dołka płytki 96-dołkowej dodano 50  $\mu\text{L}$  zimnego 50% kwasu trichlorooctowego. Po 60 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej płytki 4-krotnie przepłukano wodą, a następnie osuszono na ręcznikach papierowych. Następnie, do każdego dołka dodano 50  $\mu\text{L}$  0,1% roztworu sulforodaminy B (SRB) w 1% kwasie octowym w celu wybarwienia strąconego w dołku białka komórkowego. Po 30-minutowej inkubacji z SRB w temperaturze pokojowej płytki 4-krotnie płukano 1% kwasem octowym i ponownie osuszono na ręcznikach papierowych. W kolejnym etapie do każdego dołka dodano 150  $\mu\text{L}$  10 mM buforu TRIS powodującego rozpuszczenie związanego z białkiem komórek barwnika. Gęstość optyczną poszczególnych próbek odczytano przy długości fali 540 nm przy użyciu czytnika płytkowego (uniwersalnego) Synergy H4 (BioTek Instruments, USA).

Na podstawie pomiaru absorbancji poszczególnych dołków wyliczono procent zahamowania proliferacji dla każdego badanego związku przy danym stężeniu według wzoru:

$$\text{procent zahamowania proliferacji} = \left( \left( \frac{A_t - A_m}{A_k - A_m} \right) \times 100 \right) - 100$$

, gdzie:

$A_m$  – średnia wartość absorbancji medium kontrolnego,

$A_k$  – średnia wartość absorbancji kontroli komórek, tj. komórek nietraktowanych,

$A_t$  – średnia wartość absorbancji komórek potraktowanych badanymi związkami przy danym stężeniu.

Przy obliczaniu średniej wartości absorbancji dla danego zestawu dołków (komórki nietraktowane, komórki traktowane danym związkiem przy danym stężeniu, kontrola samego medium) odrzucono wartości „odstające” na podstawie współczynnika zmienności CV 10%. Z danych procentowego zahamowania proliferacji wyznaczono wartości współczynnika  $\text{IC}_{50}$ , czyli stężenie badanego związku potrzebne do zahamowania wzrostu komórek o 50% [według: Nevozhay, *PLoS One*, 2014, 9, e106186].

Następnie, na podstawie kolejnych 3 do 5 powtórzeń testu wyliczono średnie wartości współczynników  $IC_{50}$  wraz z wartościami odchyłeń standardowych.

W celach porównawczych analogiczne badania przeprowadzono z użyciem powszechnie stosowanego leku przeciwnowotworowego – cisplatyny. Wyniki badań *in vitro* aktywności cytotoksycznej badanych związków przedstawiono w postaci wartości współczynników  $IC_{50}$  wyrażonych w stężeniach mikromolowych ( $\mu M$ ), które zestawiono sumarycznie w tabeli 3. Wszystkie nowo otrzymane pochodne salinomycyny wykazują bardzo wysoką aktywność przeciwnowotworową, która w większości przypadków znacznie przewyższa tę wykazywaną przez niemodyfikowaną chemicznie salinomycynę o wzorze (1), C20-aminosalinomycynę o wzorze (3), jak również referencyjny lek onkologiczny – cisplatynę.

Ponadto, w przeciwieństwie do salinomycyny, większość z nowo zsyntezowanych pochodnych tego jonoforu zidentyfikowana została jako środki przeciwnowotworowe zdolne do skutecznego przełamania lekooporności badanych komórek nowotworowych z wartościami współczynników lekooporności  $RI < 1,0$ . Wszystkie nowo otrzymane pochodne salinomycyny charakteryzują się wysoką selektywnością działania wobec komórek nowotworowych, co przejawia się przez wartości współczynników selektywności  $SI > 3,0$ , zaś niektóre z nich zidentyfikowane zostały jako związki wybitnie selektywne ( $SI > 100,0$ ). Wskazuje to jednoznacznie na dużo wyższą skuteczność oddziaływania nowo zsyntezowanych pochodnych salinomycyny na komórki nowotworowe w porównaniu z ich toksycznością wobec prawidłowych komórek organizmu.

Tabela 3. Przykłady zastosowania związków według wynalazku.

Badany związek	Komórki nowotworowe																		Komórki normalne BALB/3T3	
	B16-F0			Hs294T			LoVo			LoVo/DX			MCF-7			MV-4-11				
	IC <sub>50</sub> (μM)	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	SI	RI	IC <sub>50</sub> (μM)	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	SI	IC <sub>50</sub> (μM)		SI
salinomycyna (1)	0,63	3,3	0,56	3,7	0,21	9,9	0,48	4,3	2,3			2,10	1,0	0,07	29,7					2,08
(3)	9,44	7,0	9,73	6,8	33,07	2,0	20,49	3,2	0,6			34,87	1,9	5,92	11,2					66,42
(9)	0,65	25,2	0,17	96,2	0,97	16,9	1,43	11,4	1,5			2,94	5,6	0,30	54,5					16,35
(10)	0,07	50,3	0,02	176,0	0,67	5,3	0,19	18,5	0,3			0,70	5,0	0,07	50,3					3,52
(11)	0,40	6,5	0,06	43,2	0,93	2,8	0,62	4,2	0,7			0,81	3,2	0,28	9,2					2,59
(12)	0,56	30,5	0,07	243,9	0,63	27,1	1,55	11,0	2,5			0,90	19,0	0,20	85,4					17,07
(13)	0,53	26,4	0,06	233,5	0,67	20,9	2,33	6,0	3,5			1,31	10,7	0,27	51,9					14,01
(14)	4,19	2,4	4,75	2,2	4,14	2,5	2,94	3,5	0,7			7,21	1,4	3,35	3,1					10,25
(15)	0,02	81,5	0,02	81,5	0,28	5,1	0,05	32,6	0,2			0,28	5,8	0,06	27,2					1,63
(16)	0,48	5,2	0,03	83,3	0,29	8,6	0,63	4,0	2,2			0,58	4,3	0,03	83,3					2,50
(17)	0,06	18,3	0,03	36,7	0,36	3,1	0,40	2,8	1,1			0,49	2,2	0,07	15,7					1,10

(18)	0,05	35,2	0,02	88,0	0,48	3,7	0,16	11,0	0,3	0,57	3,1	0,07	25,1	1,76
(19)	0,03	32,3	0,01	97,0	0,16	6,1	43,11	0,02	269,4	0,54	1,8	0,04	24,3	0,97
(20)	0,64	5,1	0,28	11,6	0,82	4,0	0,64	5,1	0,8	2,38	1,4	0,36	9,0	3,24
(21)	0,0034	197,1	0,0002	3350,0	0,09	7,4	0,05	13,4	0,6	0,36	1,9	0,02	33,5	0,67
(22)	0,02	66,0	0,0041	322,0	0,30	4,4	0,05	26,4	0,2	0,34	3,9	0,05	26,4	1,32
(23)	0,07	22,0	0,01	154,0	0,06	25,7	0,15	10,3	2,5	0,37	4,2	0,0011	1400,0	1,54
(24)	0,05	16,0	0,04	20,0	0,07	11,4	0,11	7,3	1,6	0,40	2,0	0,0010	800,0	0,80
(25)	0,01	135,0	0,0056	241,1	0,02	67,5	0,22	6,1	11,0	0,18	7,5	0,0003	4500,0	1,35
cisplatyna	3,84	1,7	4,01	1,6	6,97	0,9	8,00	0,8	1,1	7,17	0,9	3,40	1,9	6,50

B16-F0 (mysi czerniak), Hs294T (ludzki czerniak), LoVo (lekowrażliwy ludzki nowotwór okrężnicy), LoVo/DX (lekooporny ludzki nowotwór okrężnicy), MCF-7 (ludzki nowotwór piersi), MV-4-11 (ludzka białaczka bifenotypowa), BALB/3T3 (normalne mysie fibroblasty);

wartość współczynnika IC<sub>50</sub> – stężenie związku, które odpowiada 50% hamowaniu wzrostu komórek użytych w testach; SI > 1,0 związek wykazuje silniejsze działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych niż wobec komórek prawidłowych; RI < 2, komórki wrażliwe na badany związek, RI w zakresie 2–10 komórki wykazują umiarkowaną wrażliwość na badany związek, RI > 10 wskazuje na silną oporność na testowany związek;

wartość współczynnika selektywności SI obliczono według wzoru:

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ dla prawidłowej linii komórkowej BALB/3T3}}{IC_{50} \text{ dla poszczególnych nowotworowych linii komórkowych}}$$

wartość współczynnika lekooporności RI obliczono według wzoru:

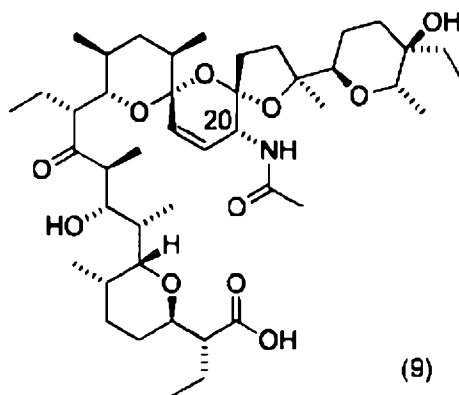
$$RI = \frac{IC_{50} \text{ dla lekoopornej nowotworowej linii komórkowej LoVo/DX}}{IC_{50} \text{ dla lekowrażliwej nowotworowej linii komórkowej LoVo}}$$

Z tabeli 3 jednoznacznie wynika, że związki według wynalazku wykazują aktywność przeciwnowotworową wobec komórek nowotworowych wywodzących się z różnych tkanek oraz narządów. Ponadto, uzyskane pochodne wykazują kilkakrotnie silniejsze działanie przeciwproliferacyjne w porównaniu do związku macierzystego, np. pochodne o wzorach (10), (15), (17), lub nawet kilkudziesięciokrotnie silniejsze działanie przeciwproliferacyjne, np. związki o wzorach (21), (22), (25). Wyniki badań aktywności wykonane wobec komórek lekowrażliwego oraz lekoopornego ludzkiego nowotworu okrężnicy wskazują, że związki według wynalazku posiadają zdolność do przełamywania lekooporności komórek nowotworowych. Ponadto, związki według wynalazku charakteryzują się doskonałą selektywnością działania, co udowadnia ich wysoki potencjał terapeutyczny. Znaczący będzie wiedział, jak dobrać konkretną pochodną do leczenia odpowiedniego typu nowotworu. Dla przykładu należy wskazać, iż np. pochodna o wzorze (21) wykazuje preferencyjne działanie wobec komórek czerniaka, podczas gdy związek o wzorze (25) wobec komórek białaczki bifenotypowej.

Związki według wynalazku oraz sposoby ich otrzymywania ilustrują poniższe przykłady. Przykłady te nie mają mieć charakteru ograniczającego zakres ochrony, a jedynie przedstawiają wybrane, reprezentatywne przykłady realizacji wynalazku. W zakresie wiedzy znawcy będzie dobór reagentów i dostosowanie warunków reakcji do otrzymania innych pochodnych znajdujących się w zakresie ochrony zdefiniowanej w zastrzeżeniach patentowych.

Przykład 1

Otrzymywanie *N*-acetamidu C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (9):



Do roztworu 4-dimetyloaminopirydyny (10 mg, 1,2 ekwiwalenta) w bezwodnym chlorku metylenu (7 mL) ochłodzonego do temperatury 0°C dodano trietyloaminę (8 mg, 1,2 ekwiwalenta) oraz chlorek acetylu (7 mg, 1,2 ekwiwalenta) i mieszano przez 30 minut w obniżonej temperaturze (<5°C). Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano C20-aminosalinomycynę (50 mg, 1,0 ekwiwalent) uprzednio rozpuszczoną w minimalnej ilości bezwodnego chlorku metylenu i mieszano w obniżonej temperaturze (<5°C) przez kolejne 30 minut. Następnie, całość pozostawiono do ogrzania do temperatury pokojowej i mieszanie kontynuowano do czasu zakończenia reakcji, który kontrolowano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej TLC.

Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną przemyto przy pomocy wodnego roztworu węglańku sodu (0,1 M). Warstwę organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® z detektorem ELS, stosując kolumnę wypełnioną krzemionką oraz mieszaninę rozpuszczalników octan etylu:*n*-heksan ze wzrastającym gradientem stężenia octanu etylu od 0% do 100%. Połączone frakcje zawierające *N*-acetamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (9) odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu, po czym ekstrahowano z wodnym roztworem kwasu siarkowego(VI)

(pH = 1,0) i na końcu z wodą. Połączone warstwy organiczne ponownie odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie kilkakrotnie odparowano z *n*-pentanem. Otrzymano *N*-acetamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (9) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 72%.

Wydajność: 38 mg, 72%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

Rf: 0,54 w octanie etylu 100%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

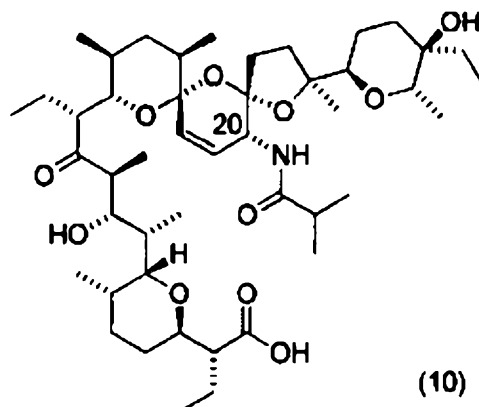
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 215,4, 177,7, 170,2, 129,3, 122,9, 105,4, 99,4, 88,4, 77,3, 77,2, 75,5, 74,9, 73,8, 71,7, 71,0, 68,4, 56,1, 49,7, 48,9, 48,6, 41,0, 38,5, 36,8, 36,3, 32,6, 30,5, 29,0, 28,0, 26,2, 26,0, 23,1, 22,6, 22,0, 20,0, 17,9, 16,4, 15,8, 14,7, 13,2, 12,9, 12,0, 11,2, 6,9, 6,3 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ~ 13,00 (s, very br, 1H), 6,93 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,03 (dd, *J* = 10,7, 2,6 Hz, 1H), 5,78 (dd, *J* = 10,6, 2,0 Hz, 1H), 4,41 (dt, *J* = 8,0, 2,3 Hz, 1H), 4,08 (dd, *J* = 10,1, 1,4 Hz, 1H), 3,92 (dd, *J* = 10,8, 5,4 Hz, 1H), 3,84 (dd, *J* = 8,9, 5,3 Hz, 1H), 3,80 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 3,75 (dd, *J* = 14,0, 7,0 Hz, 1H), 3,57 (dd, *J* = 9,9, 1,8 Hz, 1H), 2,83 (td, *J* = 10,8, 3,8 Hz, 1H), 2,67 (dq, *J* = 9,8, 7,1 Hz, 1H), 2,52 (dd, *J* = 11,1 Hz, 1H), 2,10-0,50 (m, 56H), 1,91 (s, *J* = 7,4 Hz, 3H) ppm.

ESI-MS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>44</sub>H<sub>73</sub>NNaO<sub>11</sub><sup>+</sup> 814,5; znalezione 814,

Przykład 2

Otrzymywanie *N*-izobutyroamidu C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (10):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek izobutyrylu (9 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-izobutyroamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (10) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 29%.

Wydajność: 16 mg, 29%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

Rf: 0,55 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

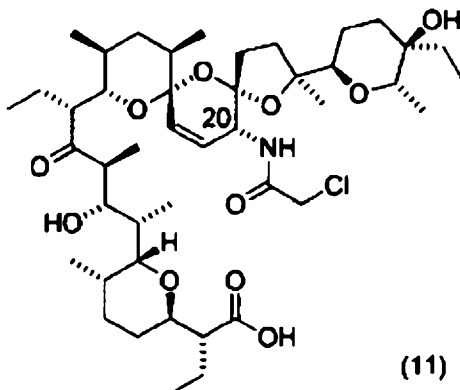
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 215,8, 177,7, 177,4, 130,2, 123,3, 106,0, 100,0, 89,0, 77,8, 76,1, 75,2, 73,8, 72,1, 71,2, 69,0, 56,3, 49,9, 49,2, 48,8, 41,5, 39,0, 37,2, 36,6, 35,7, 33,2, 30,9, 30,9, 29,2, 28,5, 26,6, 26,1, 23,1, 22,5, 20,4, 20,0, 19,6, 18,0, 16,7, 15,9, 15,0, 13,4, 13,2, 12,1, 11,3, 7,1, 6,5 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ ~13,00 (s, very br, 1H), 6,78 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,07 (dd, *J* = 10,7, 2,6 Hz, 1H), 5,76 (dd, *J* = 10,6, 2,1 Hz, 1H), 4,39 (dt, *J* = 7,9, 2,3 Hz, 1H), 4,07 (dd, *J* = 10,1, 1,4 Hz, 1H), 3,95-3,81 (m, 3H), 3,76 (dd, *J* = 13,9, 6,9 Hz, 1H), 3,58 (dd, *J* = 10,0, 2,0 Hz, 1H), 2,89 (td, *J* = 10,7, 4,0 Hz, 1H), 2,73 (dq, *J* = 10,0, 7,1 Hz, 1H), 2,61 (dd, *J* = 10,9, 1,9 Hz, 1H), 2,30 (dt, *J* = 13,6, 6,8 Hz, 1H), 2,21-0,55 (m, 62H) ppm.

ESI-MS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>46</sub>H<sub>77</sub>NNaO<sub>11</sub><sup>+</sup> 842,5; znalezione 842.

## Przykład 3

Otrzymywanie *N*-chloroacetamidu C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (11):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek chloroacetylu (9 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-chloroacetamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (11) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 30%.

Wydajność: 17 mg, 30%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,71 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

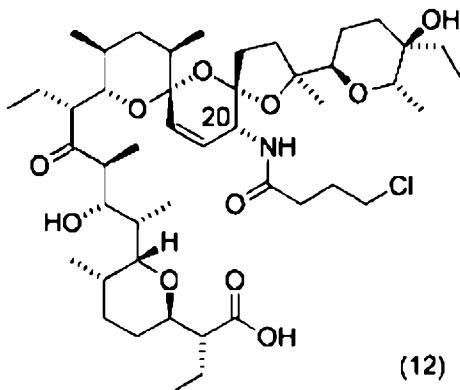
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 215,6, 177,8, 167,0, 129,0, 124,6, 105,9, 99,9, 88,9, 77,7, 76,4, 75,1, 73,5, 72,2, 71,3, 69,0, 56,1, 49,71, 49,69, 48,8, 43,2, 41,2, 38,9, 37,3, 36,5, 33,1, 31,4, 30,9, 29,3, 28,6, 26,6, 25,4, 23,0, 22,2, 20,4, 17,9, 16,7, 15,8, 14,9, 13,3, 13,2, 12,1, 11,4, 7,2, 6,5 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ ~ 13,00 (s, very br, 1H), 7,23 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,14 (dd, *J* = 10,6, 2,5 Hz, 1H), 5,79 (dd, *J* = 10,6, 2,4 Hz, 1H), 4,50 (dt, *J* = 8,6, 2,4 Hz, 1H), 4,07 (dd, *J* = 10,1, 1,3 Hz, 1H), 4,00 (s, *J* = 13,8 Hz, 2H), 3,92 (dd, *J* = 10,8, 5,3 Hz, 1H), 3,79 (ddd, *J* = 14,0, 8,4, 3,0 Hz, 3H), 3,58 (dd, *J* = 9,9, 1,9 Hz, 1H), 2,89 (td, *J* = 10,7, 4,1 Hz, 1H), 2,73 (ddd, *J* = 14,3, 10,0, 7,1 Hz, 1H), 2,60 (dd, *J* = 10,8, 1,7 Hz, 1H), 2,19-0,55 (m, 56H) ppm.

ESI-MS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>44</sub>H<sub>72</sub>ClNNaO<sub>11</sub><sup>+</sup> 848,5; znalezione 848.

## Przykład 4

Otrzymywanie *N*-4-chlorobutyroamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (12):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek 4-chlorobutyrylu (12 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-4-chlorobutyroamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (12) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 29%.

Wydajność: 17 mg, 29%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLG.

R<sub>f</sub>: 0,59 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA),

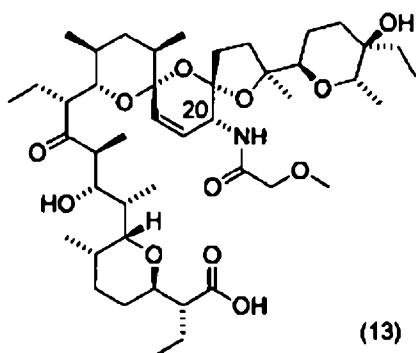
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  215,3, 177,6, 172,3, 130,0, 23,8, 106,1, 99,9, 88,9, 77,7, 76,3, 75,21, 74,0, 72,1, 72,2, 69,0, 56,2, 49,7, 49,4, 48,6, 45,3, 41,3, 38,9, 37,4, 36,5, 33,6, 33,1, 31,1, 31,0, 29,4, 28,7, 28,5, 26,6, 25,9, 23,0, 22,4, 20,4, 17,9, 16,7, 15,9, 15,1, 13,34, 13,26, 12,2, 11,4, 7,2, 6,5 ppm.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  ~ 13,00 (s, very br, 1 H), 6,97 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 6,09 (dd,  $J$  = 10,6, 2,5 Hz, 1H), 5,81 (dd,  $J$  = 10,7, 2,5 Hz, 1H), 4,43 (dt,  $J$  = 8,0, 2,4 Hz, 1H), 4,08 (dd,  $J$  = 10,0, 1,4 Hz, 1H), 3,93 (dd,  $J$  = 10,9, 5,5 Hz, 1H), 3,88-3,80 (m, 2H), 3,62-3,57 (m, 2H), 2,90 (td,  $J$  = 10,5, 4,1 Hz, 1H), 2,73 (ddd,  $J$  = 14,1, 9,9, 7,1 Hz, 1H), 2,59 (dd,  $J$  = 11,1, 2,0 Hz, 1H), 2,35 (tdd,  $J$  = 14,8, 13,0, 7,3 Hz, 2H), 2,19-0,53 (m, 60H) ppm.

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  Obliczone dla  $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{ClNNaO}_{11}^+$  876,5; znalezione 876.

Przykład 5

Otrzymywanie *N*-metoksyacetamidu C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (13):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek metoksyacetanu (9 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-metoksyacetamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (13) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 44%.

Wydajność: 24 mg, 44%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

Rf: 0,63 w octanie etylu 100%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

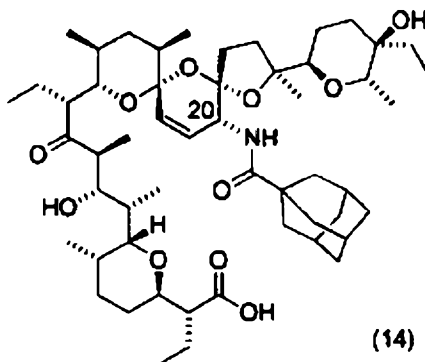
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  215,5, 177,6, 169,8, 129,1, 123,2, 105,2, 99,5, 88,8, 77,2, 75,5, 74,8, 72,8, 72,3, 71,7, 71,0, 68,4, 58,9, 56,1, 49,8, 48,9, 48,2, 41,2, 38,7, 36,42, 36,38, 32,7, 30,6, 30,3, 29,2, 28,0, 26,2, 25,8, 22,7, 22,0, 19,9, 17,9, 16,5, 15,7, 14,3, 13,3, 12,9, 11,8, 11,0, 6,8, 6,4 ppm.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ~ 13,00 (s, very br, 1H), 7,23 (d,  $J$  = 8,9 Hz, 1H), 6,14 (dd,  $J$  = 10,8, 2,9 Hz, 1H), 5,79 (dd,  $J$  = 10,7, 1,7 Hz, 1H), 4,62 (ddd,  $J$  = 8,9, 2,7, 1,9 Hz, 1H), 4,15 (dd,  $J$  = 10,1, 1,4 Hz, 1H), 4,02-3,94 (m, 2H), 3,93-3,78 (m, 4H), 3,63 (dd,  $J$  = 10,0, 1,9 Hz, 1H), 3,36 (s,  $J$  = 9,3 Hz, 3H), 2,89 (td,  $J$  = 10,9, 3,9 Hz, 1H), 2,74 (ddd,  $J$  = 14,2, 10,0, 7,0 Hz, 1H), 2,61 (dd,  $J$  = 10,9, 2,2 Hz, 1H), 2,22-0,60 (m, 56H) ppm.

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  Obliczone dla  $\text{C}_{45}\text{H}_{75}\text{NNaO}_{12}^+$  844,5; znalezione 844.

Przykład 6

Otrzymywanie *N*-1-adamantokarboksyamidu C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (14):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek 1-adamantokarbonylu (17 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-1-adamantokarboksyamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (14) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 12%.

Wydajność: 7 mg, 12%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,52 w octan etylu/*n*-heksan 33%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

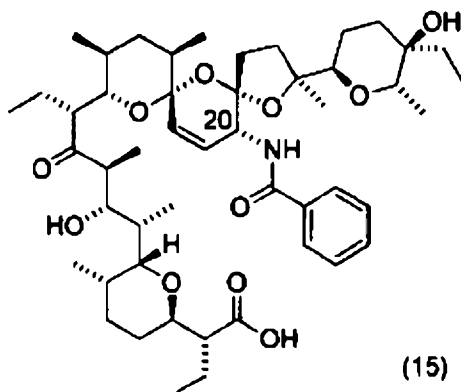
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 212,3, 179,2, 177,5, 132,7, 131,9, 109,2, 96,8, 86,0, 77,2, 74,9, 73,6, 72,5, 71,7, 71,0, 67,3, 53,4, 49,6, 49,2, 48,7, 40,9, 39,5, 39,19, 39,18, 36,7, 36,4, 35,6, 33,1, 32,6, 30,9, 30,1, 29,7, 28,5, 28,3, 26,4, 23,9, 23,5, 22,2, 20,2, 18,3, 17,8, 16,2, 14,6, 14,2, 13,3, 13,2, 12,2, 11,2, 7,3, 6,5 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ ~ 13,00 (s, very br, 1H), 6,40 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 5,86-5,71 (m, 2H), 4,75 (dt, *J* = 9,3, 1,5 Hz, 1H), 4,22 (dd, *J* = 9,8, 3,8 Hz, 1H), 3,92 (dd, *J* = 10,9, 4,8 Hz, 1H), 3,79 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,64 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,60 (dd, *J* = 10,0, 2,3 Hz, 1H), 3,48-3,40 (m, 1H), 2,93 (td, *J* = 11,1, 3,6 Hz, 1H), 2,85 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 2,70-2,57 (m, 2H), 2,23 (ddd, *J* = 13,3, 8,5, 6,9 Hz, 1H), 2,14-0,54 (m, 69H) ppm.

ESI-MS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>53</sub>H<sub>85</sub>NNaO<sub>11</sub><sup>+</sup> 934,6; znalezione 934.

Przykład 7

Otrzymywanie *N*-benzamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (15):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek benzoilu (12 mg, 1,2 ekwiwalenta).

Otrzymano *N*-benzamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (15) w postaci jasnożółtego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 91%.

Wydajność: 52 mg, 91%. Wyizolowano jako jasnożółte, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,68 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA), aktywny pod UV.

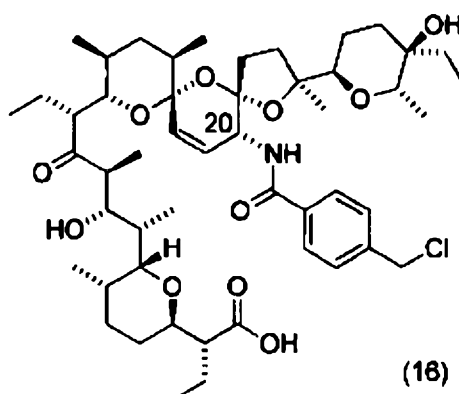
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 215,7, 177,6, 168,6, 136,0, 131,5, 129,8, 128,7, 127,5, 123,4, 105,9, 99,9, 89,3, 76,3, 75,0, 73,4, 72,3, 71,1, 69,2, 56,3, 49,72, 49,66, 48,9, 41,6, 39,0, 37,2, 36,5, 33,2, 30,9, 30,7, 29,5, 28,6, 26,7, 26,1, 23,1, 22,6, 20,5, 18,0, 16,6, 15,9, 14,8, 13,4, 13,3, 12,0, 11,4, 7,2, 6,5 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ ~ 13,00 (s, very br, 1H), 7,75-7,67 (m, 2H), 7,50-7,44 (m, 1H), 7,43-7,36 (m, 2H), 7,19 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,14 (dd, *J* = 10,7, 2,9 Hz, 1H), 5,88 (dd, *J* = 10,7, 1,8 Hz, 1H), 4,68 (ddd, *J* = 8,4, 2,7, 1,9 Hz, 1H), 4,10 (dd, *J* = 10,1, 1,4 Hz, 1H), 3,97-3,87 (m, 2H), 3,85-3,79 (m, 3H), 3,59 (dd, *J* = 10,0, 2,1 Hz, 1H), 3,28 (dd, *J* = 13,6, 6,7 Hz, 1H), 2,88 (td, *J* = 10,6, 4,0 Hz, 1H), 2,76 (dq, *J* = 10,0, 7,1 Hz, 1H), 2,62 (dd, *J* = 10,8, 2,0 Hz, 1H), 2,24-0,58 (m, 56H) ppm.

ES1-MS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>49</sub>H<sub>75</sub>NNaO<sub>11</sub><sup>+</sup> 876,5; znalezione 876.

Przykład 8

Otrzymywanie *N*-(4-chlorometylo)benzamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (16):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek 4-(chlorometylo)benzoilu (16 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-(4-chlorometylo)benzamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (16) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 28%.

Wydajność: 17 mg, 28%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,49 w octan etylu/*n*-heksan 33%, Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA), aktywny pod UV.

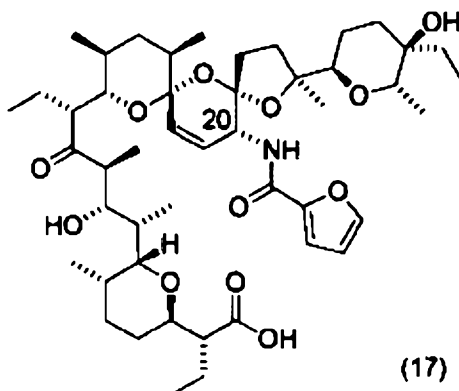
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 214,8, 177,3, 167,9, 141,0, 135,8, 129,6, 128,9, 128,0, 123,4, 105,9, 99,7, 89,2, 76,8, 74,7, 73,5, 72,4, 71,2, 69,3, 56,2, 49,6, 49,2, 48,5, 45,9, 41,5, 38,8, 37,2, 36,2, 33,0, 30,87, 30,85, 30,0, 29,4, 28,8, 26,6, 26,1, 22,9, 22,4, 20,7, 17,8, 16,7, 15,8, 14,8, 13,4, 13,3, 12,0, 11,7, 7,5, 6,6 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ ~ 13,00 (s, very br, 1H), 7,77-7,70 (m, 2H), 7,46-7,40 (m, 2H), 7,20 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,15 (dd, *J* = 10,7, 2,8 Hz, 1H), 5,88 (dd, *J* = 10,6, 1,8 Hz, 1H), 4,69 (ddd, *J* = 8,3, 2,5, 2,1 Hz, 1H), 4,60 (s, *J* = 9,2 Hz, 2H), 4,10 (dd, *J* = 10,0, 1,3 Hz, 1H), 3,94 (ddd, *J* = 10,9, 6,1, 1,7 Hz, 1H), 3,87 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H), 3,77 (dd, *J* = 10,1, 3,1 Hz, 1H), 3,60 (dd, *J* = 9,9, 2,1 Hz, 1H), 3,38 (dd, *J* = 13,6, 6,8 Hz, 1H), 2,87 (td, *J* = 10,3, 4,2 Hz, 1H), 2,78 (ddd, *J* = 14,3, 9,8, 7,1 Hz, 1H), 2,62-2,56 (m, 1H), 2,24-0,54 (m, 56H) ppm.

ESI-MS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>50</sub>H<sub>76</sub>ClINa<sub>11</sub><sup>+</sup> 924,5; znalezione 924.

Przykład 9

Otrzymywanie *N*-2-furamidu C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (17):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek 2-furoilu (11 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-2-furamid C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (17) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 53%.

Wydajność: 30 mg, 53%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,66 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA), aktywny pod UV.

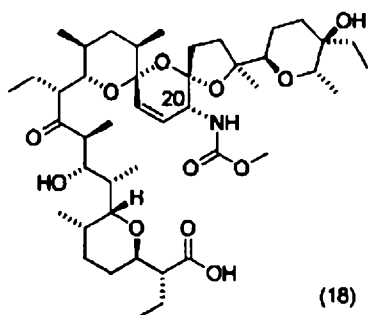
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  219,6, 184,7, 158,8, 147,6, 145,5, 128,6, 123,7, 114,8, 111,9, 107,0, 100,0, 89,3, 77,4, 77,0, 76,6, 73,7, 71,5, 70,5, 69,1, 56,7, 51,1, 49,6, 48,2, 41,2, 39,3, 37,5, 36,2, 33,0, 32,7, 32,5, 28,7, 28,4, 27,3, 26,4, 23,5, 20,6, 20,4, 18,0, 16,3, 15,8, 14,5, 13,5, 12,7, 12,6, 11,4, 7,2, 7,0 ppm.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  ~ 13,00 (s, very br, 1H), 7,52 (dd,  $J = 1,7, 0,8$  Hz, 1H), 7,37 (d,  $J = 9,8$  Hz, 1H), 7,27 (dd,  $J = 3,5, 0,8$  Hz, 1H), 6,42 (dd,  $J = 3,5, 1,7$  Hz, 1H), 6,18 (dd,  $J = 10,8, 3,1$  Hz, 1H), 5,75 (dd,  $J = 10,8, 1,8$  Hz, 1H), 4,95 (ddd,  $J = 9,8, 3,0, 1,8$  Hz, 1H), 4,14 (q,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 4,08 (dd,  $J = 10,4, 1,5$  Hz, 1H), 3,94 (dd,  $J = 10,8, 5,2$  Hz, 1H), 3,71 (d,  $J = 10,1$  Hz, 1H), 3,66 (dd,  $J = 10,3, 1,7$  Hz, 1H), 3,44 (dd,  $J = 12,3, 2,6$  Hz, 1H), 2,74 (dddd,  $J = 17,4, 13,6, 10,6, 4,4$  Hz, 3H), 2,32-2,20 (m, 1H), 2,19-0,54 (m, 55H) ppm.

ESI-MS (m/z):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  Obliczone dla  $\text{C}_{47}\text{H}_{73}\text{NNaO}_{12}^+$  866,5; znalezione 866.

Przykład 10

Otrzymywanie *N*-karbaminianu metylowego C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (18):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chloromrówczan metylu (8 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-karbaminian metylowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (18) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 16%.

Wydajność: 9 mg, 16%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub> 0,35 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

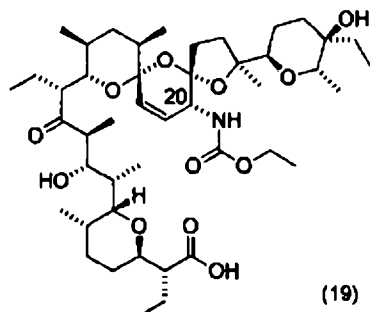
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  214,9, 177,2, 157,4, 130,1, 122,6, 105,8, 99,7, 89,6, 77,4, 76,4, 75,1, 74,4, 72,1, 71,2, 69,2, 56,5, 52,0, 50,7, 49,7, 48,4, 41,5, 38,9, 37,2, 36,5, 33,1, 31,0, 30,7, 29,4, 28,5, 26,7, 26,4, 23,1, 22,6, 20,3, 17,9, 16,8, 15,9, 14,4, 13,4, 13,3, 11,9, 11,3, 7,1, 6,5 ppm.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  ~ 13,00 (s, very br, 1H), 6,39 (d,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 6,04 (dd,  $J = 10,8, 2,7$  Hz, 1H), 5,83 (dd,  $J = 10,7, 1,6$  Hz, 1H), 4,12-4,04 (m, 2H), 3,99-3,85 (m, 3H), 3,81 (dd,  $J = 13,7, 6,8$  Hz, 1H), 3,66-3,53 (m, 4H), 2,91 (td,  $J = 10,5, 4,2$  Hz, 1H), 2,75 (ddd,  $J = 14,2, 9,9, 7,1$  Hz, 1H), 2,58 (dd,  $J = 10,6, 1,4$  Hz, 1H), 2,25-2,12 (m, 2H), 2,04-0,57 (m, 54H) ppm.

ESI-MS (m/z):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  Obliczone dla  $\text{C}_{44}\text{H}_{73}\text{NNaO}_{12}^+$  830,5; znalezione 830.

Przykład 11

Otrzymywanie *N*-karbaminianu etylowego C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (19):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chloromrówczan etylu (9 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-karbaminian etylowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (19) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 22%.

Wydajność: 12 mg, 22%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

Rf: 0,70 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

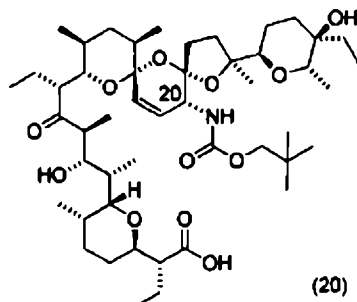
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  215,3, 177,3, 156,7, 129,9, 122,0, 105,4, 99,4, 89,1, 77,2, 76,8, 75,7, 74,9, 73,8, 71,7, 71,0, 68,6, 60,5, 56,2, 50,4, 49,8, 48,5, 41,1, 38,6, 36,8, 36,3, 32,7, 30,6, 30,1, 29,3, 28,0, 26,3, 22,7, 22,3, 19,9, 17,9, 16,6, 15,7, 14,4, 14,1, 13,2, 12,9, 11,8, 11,0, 6,8, 6,3 ppm.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ~ 13,00 (s, very br, 1H), 6,56 (d,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 6,06 (dd,  $J = 10,8$ , 2,7 Hz, 1H), 5,91 (dd,  $J = 10,7$ , 1,5 Hz, 1H), 4,18-4,09 (m, 2H), 4,05 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 4,01-3,94 (m, 2H), 3,93-3,85 (m, 2H), 3,63 (dd,  $J = 9,9$ , 1,8 Hz, 1H), 2,90 (td,  $J = 10,9$ , 3,8 Hz, 1H), 2,75 (ddd,  $J = 14,2$ , 9,9, 7,0 Hz, 1H), 2,59 (dd,  $J = 10,8$ , 1,8 Hz, 1H), 2,27-2,12 (m, 2H), 2,10-0,50 (m, 57H) ppm.

ESI-MS (m/z):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  Obliczone dla  $\text{C}_{45}\text{H}_{75}\text{NNaO}_{12}^+$  844,5; znalezione 844.

Przykład 12

Otrzymywanie *N*-karbaminianu neopentylowego C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (20):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chloromrówczan neopentylu (13 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-karbaminian neopentylowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (20) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 24%.

Wydajność: 14 mg, 24%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

Rf: 0,69 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

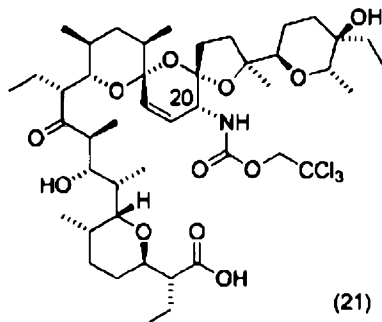
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  212,9, 177,8, 158,3, 134,1, 130,8, 109,3, 96,5, 86,7, 77,1, 75,0, 74,9, 74,2, 73,7, 71,8, 70,9, 67,3, 53,6, 51,3, 49,4, 49,0, 39,5, 36,74, 36,71, 36,3, 32,9, 31,6, 31,1, 30,7, 29,8, 28,3, 26,5, 26,4, 26,0, 23,3, 22,7, 20,2, 18,2, 17,2, 16,2, 14,8, 13,4, 13,2, 12,4, 11,1, 7,3, 6,5 ppm.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  ~ 13,00 (s, very br, 1H), 6,90 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 5,87 (dd,  $J = 9,7$ , 2,0 Hz, 1H), 5,74 (dd,  $J = 9,7$ , 2,9 Hz, 1H), 4,30 (ddd,  $J = 7,9$ , 2,7, 2,2 Hz, 1H), 4,18 (dd,  $J = 10,0$ , 3,5 Hz, 1H), 3,96-3,87 (m, 3H), 3,69 (d,  $J = 10,3$  Hz, 1H), 3,61-3,51 (m, 3H), 2,93 (td,  $J = 10,9$ , 3,7 Hz, 1H), 2,86 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H), 2,72-2,60 (m, 2H), 2,37 (s, 1H), 2,33-2,10 (m, 4H), 2,05-0,53 (m, 59H) ppm.

ESI-MS (m/z):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  Obliczone dla  $\text{C}_{48}\text{H}_{81}\text{NNaO}_{12}^+$  887,1; znalezione 887.

Przykład 13

Otrzymywanie *N*-karbaminianu 2,2,2-trichloroetylowego C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (21):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chloromrówczan 2,2,2-trichloroetylu (18 mg, ekwiwalenta). Otrzymano

*N*-karbaminian 2,2,2-trichloroetylowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (21) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 41%.

Wydajność: 32 mg, 41%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,50 w octan etylu/*n*-heksan 33%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

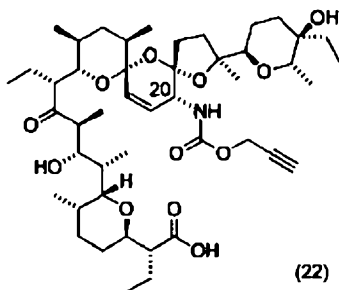
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 216,6, 178,0, 155,2, 129,6, 123,2, 105,5, 100,2, 89,8, 77,7, 76,2, 75,4, 75,1, 74,4, 72,2, 71,4, 69,1, 56,6, 51,8, 50,2, 49,2, 49,1, 41,7, 39,2, 37,4, 36,9, 33,3, 31,4, 30,4, 29,8, 28,5, 26,8, 26,6, 23,3, 22,9, 20,3, 18,2, 17,0, 16,0, 14,9, 13,5, 13,4, 12,4, 11,3, 7,1, 6,9 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ ~ 13,00 (s, very br, 1H), 7,01 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H), 6,09 (dd, *J* = 10,8, 2,7 Hz, 1H), 5,88 (dd, *J* = 10,7, 1,5 Hz, 1H), 4,70 (q, *J* = 12,3 Hz, 2H), 4,11 (ddd, *J* = 6,9, 2,6, 1,8 Hz, 1H), 4,07 (dd, *J* = 10,2, 0,9 Hz, 1H), 3,99 (dt, *J* = 8,7, 6,8 Hz, 3H), 3,94-3,86 (m, 3H), 3,57 (dd, *J* = 10,0, 2,0 Hz, 1H), 2,89 (td, *J* = 10,8, 4,1 Hz, 1H), 2,75 (dq, *J* = 9,7, 7,1 Hz, 1H), 2,63 (dd, *J* = 10,8, 2,0 Hz, 1H), 2,29-2,19 (m, 2H), 2,12-0,51 (m, 52H) ppm.

ESI-MS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>45</sub>H<sub>72</sub>Cl<sub>3</sub>NNaO<sub>12</sub><sup>+</sup> 948,4; znalezione 948.

Przykład 14

Otrzymywanie *N*-karbaminianu propargilowego C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (22):



Postępowanie jak w przykładzie 1, przy czym zamiast chlorku acetylu (1,2 ekwiwalenta) do mieszaniny reakcyjnej dodano chloromrówczan propargilu (10 mg, 1,2 ekwiwalenta). Otrzymano *N*-karbaminian propargilowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (22) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 26%.

Wydajność: 14 mg, 26%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,59 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

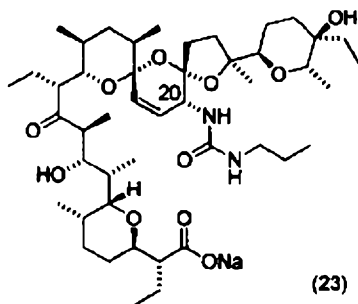
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 215,1, 177,3, 155,8, 129,7, 122,8, 105,7, 99,7, 89,7, 78,8, 77,3, 76,4, 75,1, 74,4, 74,3, 72,1, 71,3, 69,2, 56,5, 52,6, 50,9, 49,7, 48,5, 41,5, 38,9, 37,3, 36,5, 33,1, 31,1, 30,6, 29,5, 28,5, 26,7, 26,4, 23,1, 22,7, 20,3, 18,0, 16,8, 15,9, 14,6, 13,4, 13,3, 12,1, 11,3, 7,1, 6,5 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ ~ 13,00 (s, very br, 1H), 6,68 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 6,05 (dd, *J* = 10,8, 2,7 Hz, 1H), 5,83 (dd, *J* = 10,7, 1,5 Hz, 1H), 4,64 (dd, *J* = 15,6, 2,5 Hz, 1H), 4,54 (dd, *J* = 15,6, 2,5 Hz, 1H), 4,08 (ddd, *J* = 6,5, 3,3, 1,7 Hz, 2H), 4,00-3,83 (m, 4H), 3,58 (dd, *J* = 10,0, 1,7 Hz, 1H), 2,91 (td, *J* = 10,5, 4,2 Hz, 1H), 2,75 (ddd, *J* = 14,1, 9,8, 7,1 Hz, 1H), 2,58 (dd, *J* = 10,8, 1,5 Hz, 1H), 2,44 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 2,19 (tt, *J* = 20,6, 10,3 Hz, 2H), 2,03-0,55 (m, 54H) ppm.

ESI-MS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>46</sub>H<sub>73</sub>NNaO<sub>12</sub><sup>+</sup> 854,5; znalezione 854.

Przykład 15

Otrzymywanie mocznika propylowego C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (23):



Do roztworu C20-aminosalinomycyny (50 mg, 1,0 ekwiwalent) w bezwodnym chlorku metylenu (7 mL) w temperaturze pokojowej dodano izocyjanian propylu (18 mg, 3,0 ekwiwalenty). Całość mieszaną w temperaturze pokojowej do czasu zakończenia reakcji, który kontrolowano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej TLC.

Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną przemyto przy pomocy wodnego roztworu wodorowęglanu sodu (0,1 M). Warstwę organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® z detektorem ELS, stosując kolumnę wypełnioną krzemionką oraz mieszaninę rozpuszczalników octan etylu:*n*-heksan ze wzrastającym, gradientem stężenia octanu etylu od 0% do 100%. Połączone frakcje zawierające mocznik propylowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (23) odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu, po czym ekstrahowano z wodnym roztworem węgla sodu (0,1 M). Połączone warstwy organiczne ponownie odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie kilkakrotnie odparowano z *n*-pentanem. Otrzymano mocznik propylowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (23) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 66%.

Wydajność: 38 mg, 66%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

Rf: 0,64 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

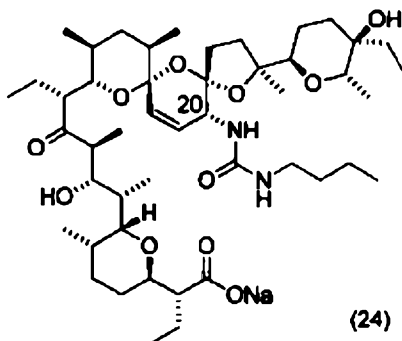
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 219,7, 185,0, 158,3, 130,3, 122,9, 107,2, 99,4, 88,9, 76,4, 76,3, 76,0, 74,4, 71,7, 71,4, 68,5, 56,7, 51,1, 50,3, 47,2, 42,5, 41,1, 39,2, 37,5, 36,4, 33,1, 33,0, 32,8, 30,3, 28,6, 28,3, 27,3, 24,13, 24,07, 20,5, 20,2, 17,8, 16,3, 16,1, 14,9, 13,4, 12,9, 12,5, 11,9, 11,1, 7,0, 6,8 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 6,06 (dd, *J* = 10,9, 3,0 Hz, 1H), 5,78 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 5,68 (dd, *J* = 10,8, 1,9 Hz, 1H), 5,60 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 5,55 (s, 1H), 4,88 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,61 (ddd, *J* = 9,9, 2,9, 2,0 Hz, 1H), 4,31 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,07 (ddd, *J* = 10,5, 4,7, 1,5 Hz, 1H), 3,81 (dd, *J* = 11,0, 4,7 Hz, 1H), 3,64 (dd, *J* = 10,1, 2,1 Hz, 1H), 3,60 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H), 3,47 (dd, *J* = 12,4, 3,0 Hz, 1H), 3,05-2,97 (m, 2H), 2,82 (td, *J* = 1,1, 3,4 Hz, 1H), 2,76-2,66 (m, 2H), 2,25-0,50 (m, 59H) ppm

ESI-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>46</sub>H<sub>78</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>11</sub><sup>+</sup> 857,6; znalezione 857.

Przykład 16

Otrzymywanie mocznika butylowego C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (24):



Postępowanie jak w przykładzie 15, przy czym zamiast izocyjanianu propylu (3,0 ekwiwalenty) do mieszaniny reakcyjnej dodano izocyjanian butylu (21 mg, 3,0 ekwiwalenty). Otrzymano mocznika butylowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (24) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 91%.

Wydajność: 53 mg, 91%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

Rf: 0,70 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA):

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 219,5, 184,9, 158,1, 129,9, 122,8, 106,9, 99,1, 88,7, 76,2, 75,8, 74,2, 71,5, 71,2, 68,2, 56,4, 50,8, 50,0, 47,0, 40,9, 40,4, 40,2, 38,9, 37,2, 36,2, 32,9, 32,8, 32,5, 28,3, 28,1, 28,0, 27,0, 23,9, 20,5, 20,4, 20,2, 20,0, 17,6, 16,1, 15,9, 14,7, 14,0, 13,2, 12,7, 12,3, 10,9, 6,8, 6,6 ppm.

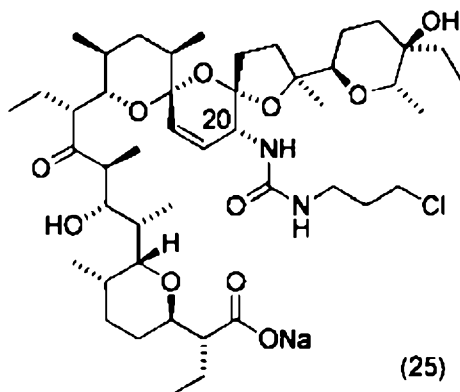
<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 6,07 (dd, *J* = 10,9, 3,0 Hz, 1H), 5,79 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 5,68 (dd, *J* = 10,8, 1,9 Hz, 1H), 5,62 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 5,52 (s, *J* = 10,6 Hz, 1H), 4,85 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 4,81-4,73 (m, 1H), 4,60 (ddd, *J* = 9,9, 2,9, 2,0 Hz, 1H), 4,30 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 4,08 (ddd, *J* = 10,5, 4,7,

1,5 Hz, 1H), 3,82 (dd,  $J = 11,0, 4,7$  Hz, 1H), 3,64 (dd,  $J = 10,2, 2,1$  Hz, 1H), 3,60 (d,  $J = 10,1$  Hz, 1H), 3,47 (dd,  $J = 12,4, 2,9$  Hz, 1H), 3,14-3,01 (m, 4H), 2,83 (td,  $J = 11,1, 3,4$  Hz, 1H), 2,71 (tt,  $J = 6,9, 5,5$  Hz, 2H), 2,25-0,50 (m, 58H) ppm.

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$  Obliczone dla  $C_{47}H_{80}N_2NaO_{11}^+$  872,1; znalezione 872.

Przykład 17

Otrzymywanie mocznika 3-chloropropylowego C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (25):



Postępowanie jak w przykładzie 15, przy czym zamiast izocyjanianu propylu (3,0 ekwiwalenty) do mieszaniny reakcyjnej dodano izocyjanian 3-chloropropylu (25 mg, 3,0 ekwiwalenty). Otrzymano mocznik 3-chloropropylowy C20-dehydroksy-C20-aminosalinomycyny o wzorze (25) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 23%.

Wydajność: 14 mg, 23%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,51 w octan etylu/*n*-heksan 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

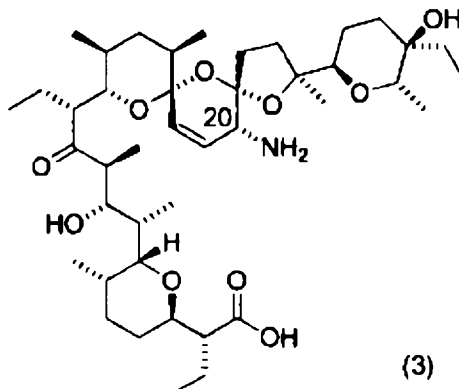
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 218,7, 184,2, 157,4, 129,0, 122,1, 106,2, 98,4, 88,0, 75,4, 75,3, 75,1, 73,5, 70,7, 70,6, 67,5, 55,7, 50,1, 49,2, 46,2, 42,5, 40,1, 38,2, 36,9, 36,6, 35,4, 33,2, 32,11, 32,07, 31,8, 27,6, 27,5, 27,3, 26,3, 23,1, 19,5, 19,3, 16,9, 15,4, 15,1, 13,9, 12,5, 12,0, 11,6, 10,2, 6,0, 5,9 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 6,06 (dd,  $J = 10,9, 3,0$  Hz, 1H), 5,92 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 5,72 (d,  $J = 9,9$  Hz, 1H), 5,66 (dd,  $J = 10,8, 1,8$  Hz, 1H), 5,58 (s, 1H), 4,79 (d,  $J = 4,6$  Hz, 1H), 4,60 (ddd,  $J = 9,9, 2,8, 2,0$  Hz, 1H), 4,30 (dd,  $J = 13,6, 6,8$  Hz, 1H), 4,07 (ddd,  $J = 10,7, 4,5, 1,2$  Hz, 1H), 3,81 (dd,  $J = 11,0, 4,7$  Hz, 1H), 3,62 (dd,  $J = 10,2, 2,0$  Hz, 1H), 3,60-3,49 (m, 2H), 3,46 (dd,  $J = 12,3, 2,9$  Hz, 1H), 3,18 (dtdd,  $J = 20,0, 13,4, 6,5, 5,7$  Hz, 2H), 2,82 (td,  $J = 11,1, 3,3$  Hz, 1H), 2,76-2,64 (m, 2H), 2,25-0,50 (m, 57H) ppm.

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$  Obliczone dla  $C_{46}H_{77}ClN_2NaO_{11}^+$  891,5; znalezione 891.

Przykład 18

Otrzymywanie C20-aminosalinomycyny o wzorze (3):



Do roztworu salinomycyny (100 mg, 1,0 ekwiwalent) o wzorze (1) w chlorku metylenu (15 mL) w temperaturze pokojowej dodano w jednej porcji nadmiar aktywowanego tlenku manganu(IV) (231 mg,

20,0 ekwiwalentów). Całość mieszało w temperaturze pokojowej do czasu zakończenia reakcji, który kontrolowano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej TLC.

Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną przesączono przez warstwę celitu. Przesącz odparówano następnie do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® z detektorem ELS, stosując kolumnę wypełnioną krzemionką oraz mieszaninę rozpuszczalników octan etylu:*n*-heksan ze wzrastającym gradientem stężenia octanu etylu od 0% do 50%. Połączone frakcje zawierające C20-oksosalinomycynę o wzorze (8) odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie kilkakrotnie odparowano z *n*-pentanem. Otrzymano C20-oksosalinomycynę o wzorze (8) w postaci białego, amorficznego ciała stałego (96 mg, 96% wydajności).

W kolejnym kroku, do roztworu C20-oksosalinomycyny (90 mg, 1,0 ekwiwalent) o wzorze (8) w metanolu (7 mL) w temperaturze pokojowej dodano roztwór amoniaku (7,0 N w metanolu, 0,7 mL). Całość mieszało w temperaturze pokojowej przez 5 godzin, po czym dodano CeCl<sub>3</sub> x 7H<sub>2</sub>O (49 mg, 1,0 ekwiwalent), a następnie po 30 minutach powoli (przez całą noc) roztwór cyjanoborowodoru sodu – NaBH<sub>3</sub>CN (17 mg, 2,0 ekwiwalenty) w metanolu (5 mL). Postęp reakcji kontrolowano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej TLC.

Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® z detektorem ELS, stosując kolumnę wypełnioną krzemionką oraz mieszaninę rozpuszczalników aceton:chloroform ze wzrastającym gradientem stężenia acetonu od 0% do 60%. Połączone frakcje zawierające C20-aminosalinomycynę o wzorze (3) odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie kilkakrotnie odparowano z *n*-pentanem.

Otrzymano C20-aminosalinomycynę o wzorze (3) w postaci białego, amorficznego ciała stałego z wydajnością 42%.

Wydajność: 38 mg, 42%. Wyizolowano jako białe, amorficzne ciało stałe; czystość >95% według NMR oraz pojedyncza plamka na TLC.

R<sub>f</sub>: 0,48 w aceton/chlorek metylenu 50%. Plamki zielone w kwasie fosfomolibdenowym (PMA).

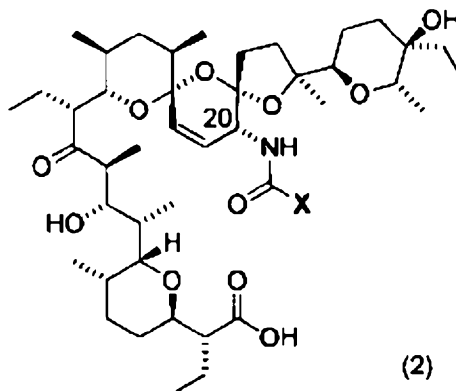
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 216,0, 182,4, 132,3, 128,7, 107,0, 99,7, 86,9, 77,5, 76,3, 75,8, 72,6, 71,8, 71,2, 67,9, 55,3, 51,5, 50,7, 48,2, 38,7, 37,5, 37,4, 36,5, 32,4, 31,3, 30,3, 29,5, 28,2, 26,9, 25,0, 24,1, 22,2, 20,6, 17,5, 16,5, 15,7, 15,1, 13,13, 13,09, 12,6, 11,2, 7,2, 6,6 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,61-6,49 (m, 1H), 6,43 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 5,98 (d, *J* = 46,8 Hz, 2H), 4,47 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,29 (d, *J* = 62,7 Hz, 1H), 4,10 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 3,90 (dd, *J* = 10,2, 3,1 Hz, 1H), 3,75 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,68-3,54 (m, 2H), 3,39 (d, *J* = 28,4 Hz, 1H), 2,85-2,74 (m, 1H), 2,68-2,52 (m, 2H), 2,47-2,10 (m, 2H), 2,10-0,50 (m, 54H) ppm.

ESI-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> Obliczone dla C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>NO<sub>10</sub><sup>+</sup> 750,5; Znaleziono 750.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Związki stanowiące C20-*N*-acylowe pochodne salinomycyny o wzorze ogólnym (2):



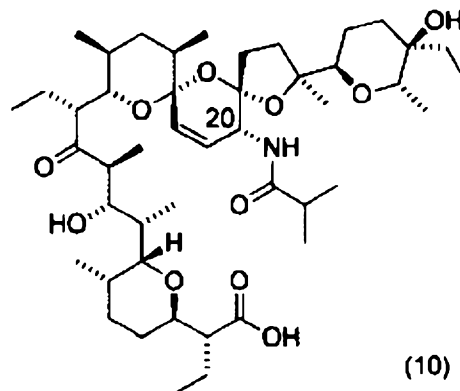
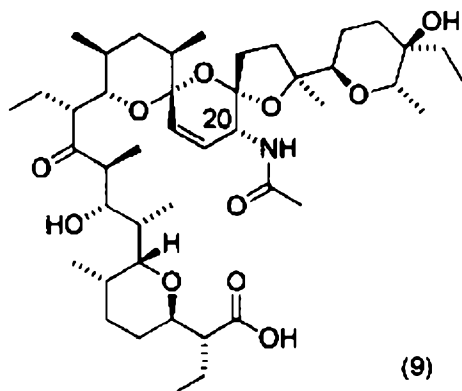
, gdzie:

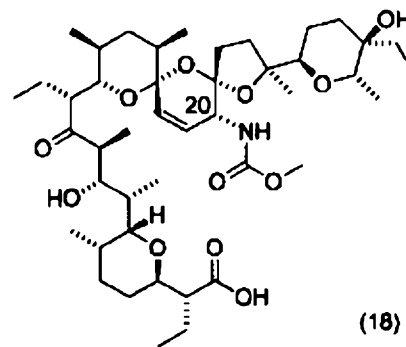
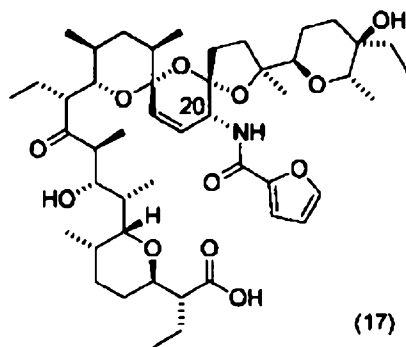
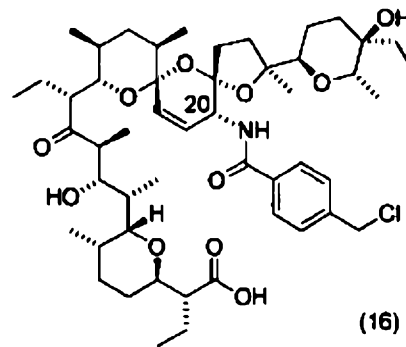
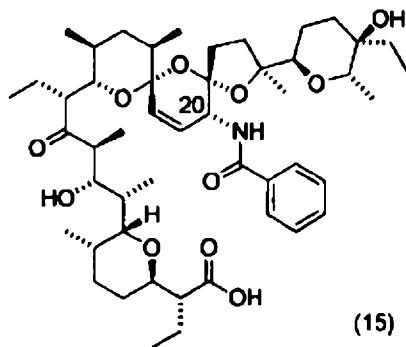
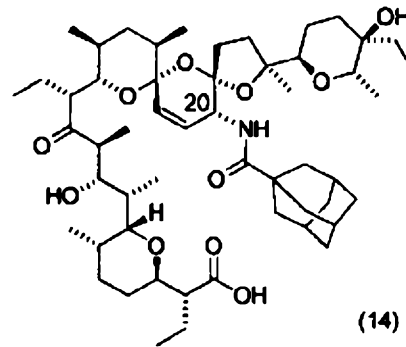
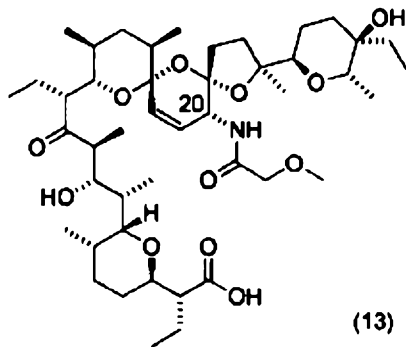
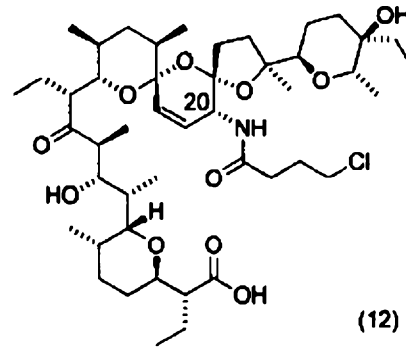
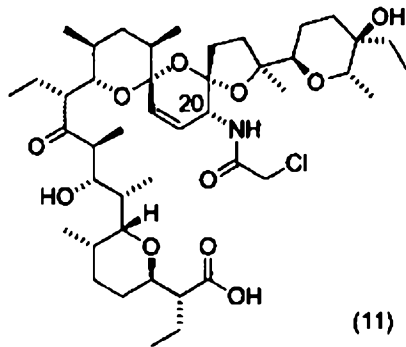
- X oznacza odpowiednio R, O-R lub NH-R;
- R oznacza:

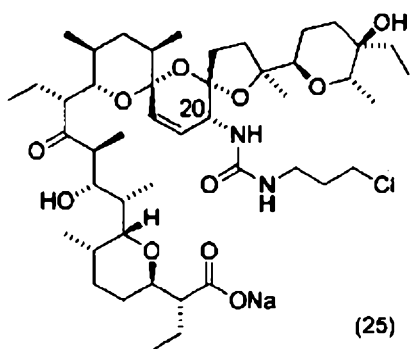
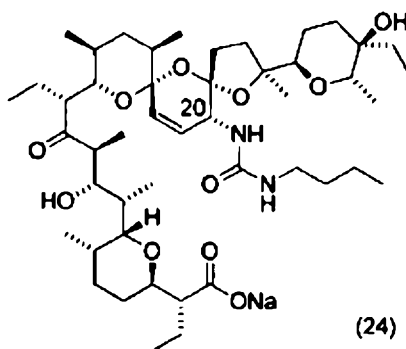
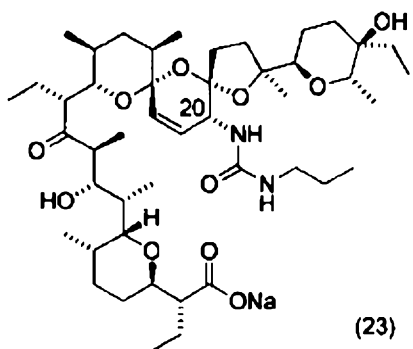
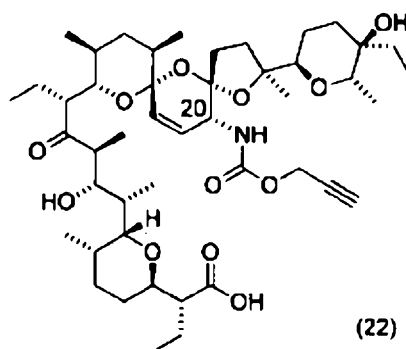
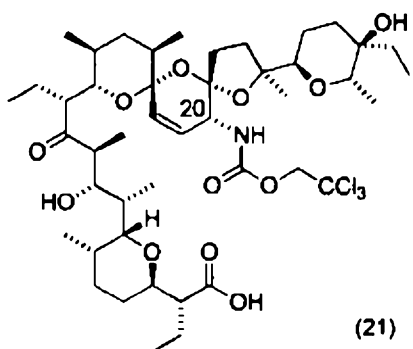
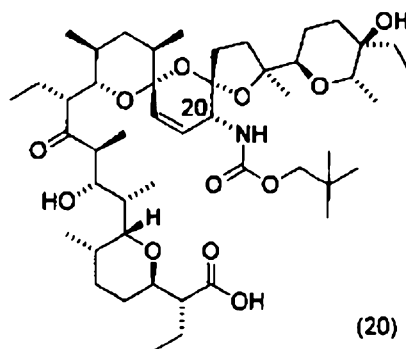
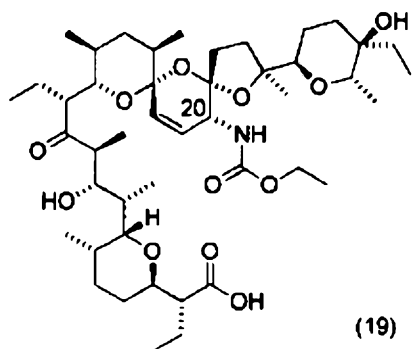
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha węglowego od 1 do 5 atomów halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym atomie węgla, jak również przy różnych atomach węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania eterowe,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 3 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania wielokrotne, zarówno podwójne, jak i potrójne,
- monocykliczną, dicykliczną lub tricykliczną grupę alkilową zawierającą od 5 do 10 atomów węgla,
- aromatyczną grupę arylową, przy czym preferowane są te zawierające sześciocząłkowy pierścień aromatyczny,
- aromatyczną grupę arylową podstawioną przez 1 do 3 podstawników wybranych niezależnie spośród grup alkilowych, alkoksylowych, hydroksylowych, nitrowych oraz nitylowych, a także atomów halogenów,
- aromatyczną grupę heteroarylową, w której 1 lub więcej atomów węgla zostało zastąpionych przez 1 lub więcej heteroatomów z grupy zawierającej atomy tlenu, azotu lub siarki,
- grupę alkilowo-arylową, w której zdefiniowana powyżej aromatyczna grupa arylowa połączona jest z cząsteczką salinomycyny przy pomocy łańcucha węglowego zawierającego od 1 do 5 atomów węgla;

oraz ich sole.

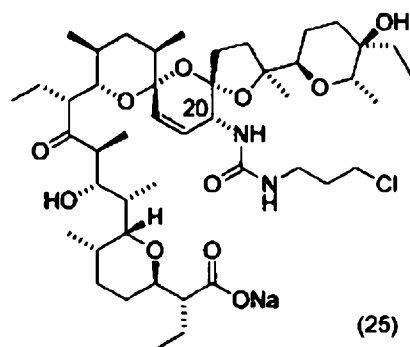
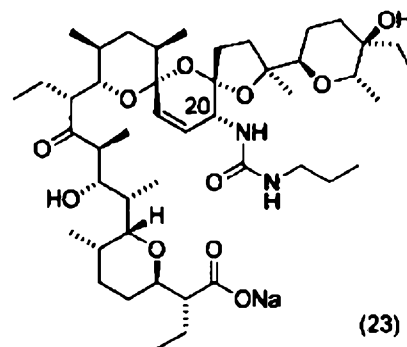
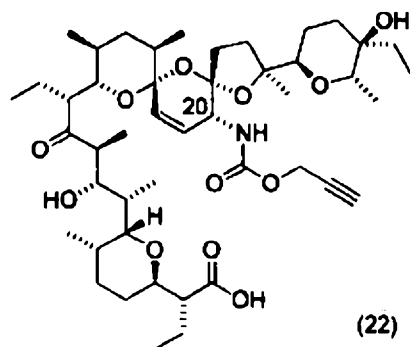
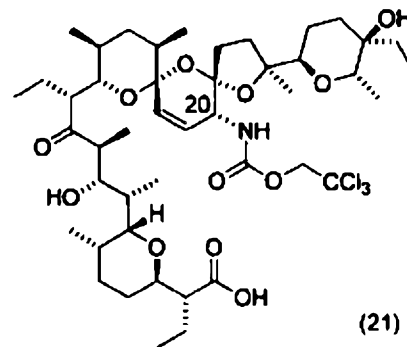
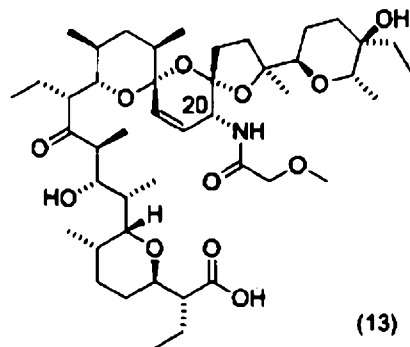
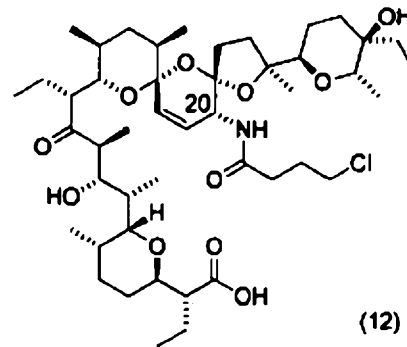
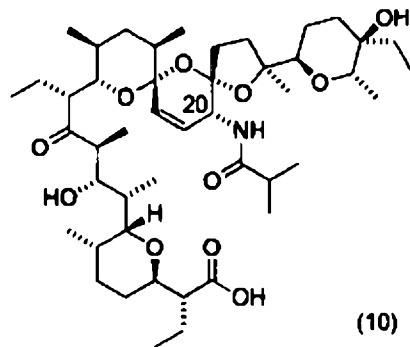
2. Związki według zastrzeżenia 1, **znamiennie tym**, że mają wzory:



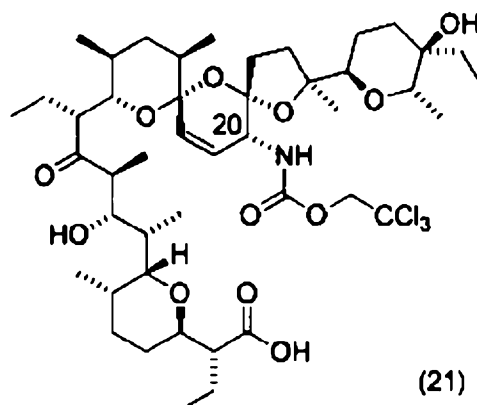




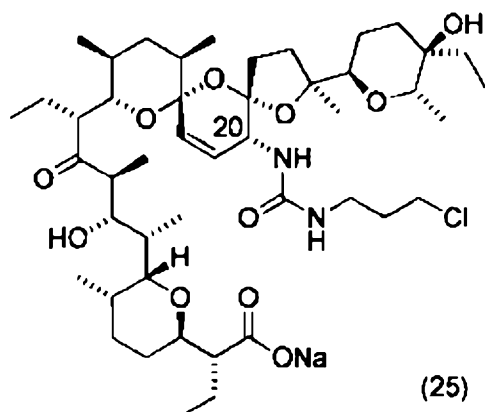
3. Związki według zastrzeżenia 1 albo 2, **znamiennie tym**, że mają wzory:



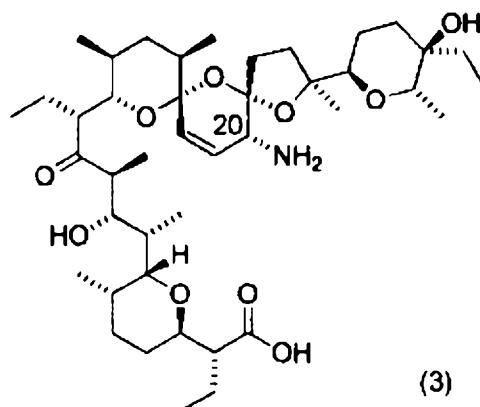
4. Związek według któregokolwiek z zastrzeżeń 1–3, **znamienny tym**, że ma wzór:



5. Związek według któregokolwiek z zastrzeżeń 1–3, **znamienny tym**, że ma wzór:



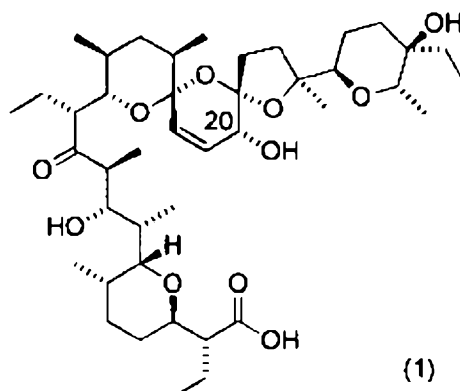
6. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca związek określony zastrzeżeniem 1 oraz co najmniej jedną farmaceutycznie akceptowalną substancję pomocniczą.  
7. Sposób otrzymywania produktu pośredniego do otrzymywania związków określonych zastrzeżeniem 1, stanowiącego C20-aminosalinomycynę o wzorze (3):



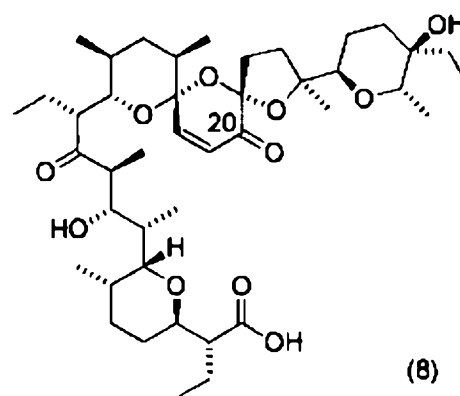
lub jego soli,

obejmujący etapy:

- c) chemoselektywnego utlenienia grupy C20-hydroksylowej salinomycyny o wzorze (1):

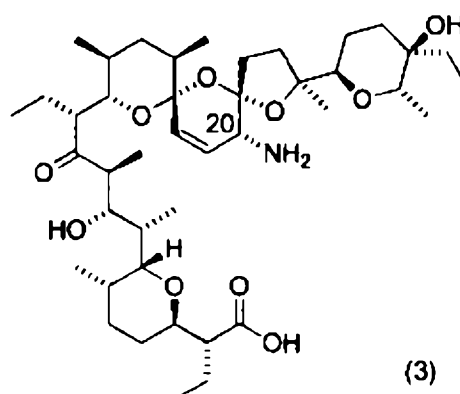


- d) po którym następuje stereoselektywne aminowanie redukcyjne otrzymanej C20-oksosalinomycyny o wzorze (8):

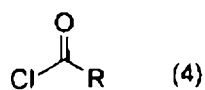


, gdzie jako środek aminujący stosuje się alkoholowy roztwór amoniaku, co prowadzi do utworzenia *in situ* iminowej pochodnej, która redukowana jest następnie borowodorkiem sodu lub pochodną borowodorku sodu, zwłaszcza cyjanoborowodorkiem sodu, w obecności soli ceru.

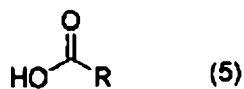
8. Sposób otrzymywania związków określonych zastrzeżeniem 1, **znamienny tym**, że polega na reakcji pomiędzy C20-aminosalinomycyną o wzorze (3):



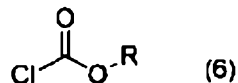
- a:  
chlorkiem kwasowym o wzorze ogólnym (4):



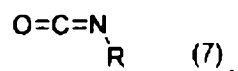
albo  
kwasem karboksylowym o wzorze ogólnym (5):



albo  
chloromrówczanem o wzorze ogólnym (6):



albo  
izocyjanianem o wzorze ogólnym (7):



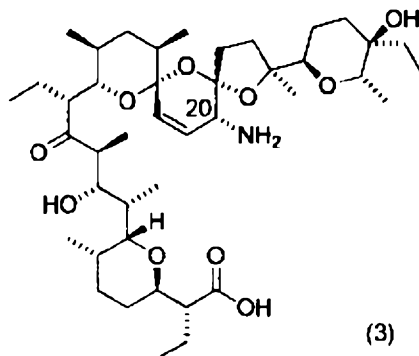
, gdzie R oznacza:

- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha węglowego od 1 do 5 atomów halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym atomie węgla, jak również przy różnych atomach węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania eterowe,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 3 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania wielokrotne, zarówno podwójne, jak i potrójne,
- monocykliczną, dicykliczną lub tricykliczną grupę alkilową zawierającą od 5 do 10 atomów węgla,
- aromatyczną grupę arylową, przy czym preferowane są te zawierające sześciocząłkowy pierścień aromatyczny,
- aromatyczną grupę arylową podstawioną przez 1 do 3 podstawników wybranych niezależnie spośród grup alkilowych, alkoksylowych, hydroksylowych, nitrowych oraz nitylowych, a także atomów halogenów,
- aromatyczną grupę heteroarylową, w której 1 lub więcej atomów węgla zostało zastąpionych przez 1 lub więcej heteroatomów z grupy zawierającej atomy tlenu, azotu lub siarki,
- grupę alkilowo-arylową, w której zdefiniowana powyżej aromatyczna grupa arylowa połączona jest z cząsteczką salinomycyny przy pomocy łańcucha węglowego zawierającego od 1 do 5 atomów węgla;

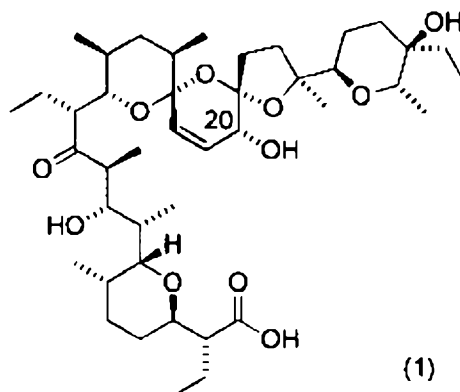
opcjonalnie obejmujący etap przekształcania otrzymanego związku w formie kwasowej w jego sól.

9. Sposób według zastrzeżenia 8, **znamienny tym**, że:

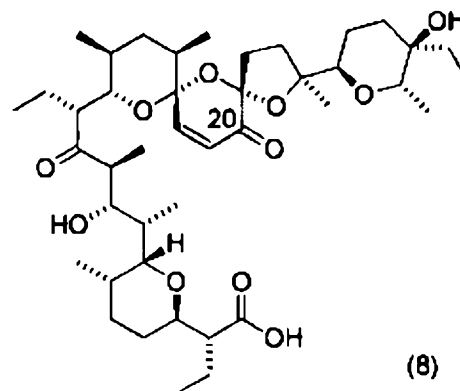
a) w pierwszym etapie otrzymuje się produkt pośredni o wzorze (3):



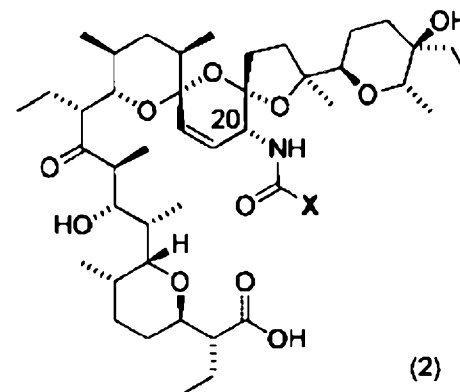
w reakcji chemoselektywnego utlenienia grupy C20-hydroksylowej salinomycyny o wzorze (1):



, po którym następuje stereoselektywne aminowanie redukcyjne otrzymanej C20-oksosalinomycyny o wzorze (8):



b) w drugim etapie otrzymuje się związek o wzorze ogólnym (2):



, gdzie:

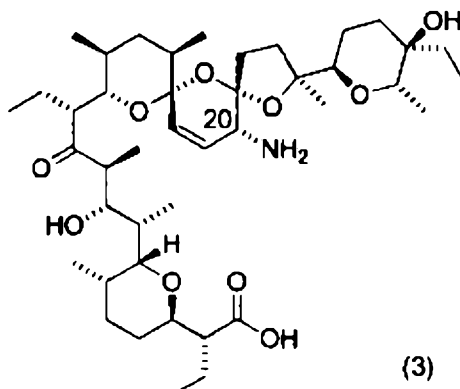
– X oznacza odpowiednio R, O-R lub NH-R;

– R oznacza:

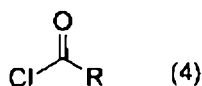
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha węglowego od 1 do 5 atomów halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym atomie węgla, jak również przy różnych atomach węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania eterowe,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 3 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha węglowego wiązania wielokrotne, zarówno podwójne, jak i potrójne,

- monocykliczną, dicykliczną lub tricykliczną grupę alkilową zawierającą od 5 do 10 atomów węgla,
- aromatyczną grupę arylową, przy czym preferowane są te zawierające sześciocząłkowy pierścień aromatyczny,
- aromatyczną grupę arylową podstawioną przez 1 do 3 podstawników wybranych niezależnie spośród grup alkilowych, alkoksylowych, hydroksylowych, nitrowych oraz nitylowych, a także atomów halogenów,
- aromatyczną grupę heteroarylową, w której 1 lub więcej atomów węgla zostało zastąpionych przez 1 lub więcej heteroatomów z grupy zawierającej atomy tlenu, azotu lub siarki,
- grupę alkilowo-arylową, w której zdefiniowana powyżej aromatyczna grupa arylowa połączona jest z cząsteczką salinomycyny przy pomocy łańcucha węglowego zawierającego od 1 do 5 atomów węgla,

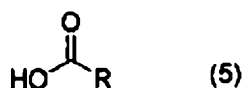
w wyniku reakcji pomiędzy C20-aminosalinomycyną o wzorze (3):



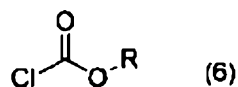
a:  
chlorkiem kwasowym o wzorze ogólnym (4):



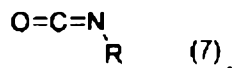
albo  
kwasem karboksylowym o wzorze ogólnym (5):



albo  
chloromrówczanem o wzorze ogólnym (6):



albo  
izocyjanianem o wzorze ogólnym (7):



, gdzie R oznacza jak wskazano powyżej;  
opcjonalnie obejmujący etap przekształcania otrzymanego związku w formie kwasowej w jego sól.

10. Związek określony którymkolwiek z zastrzeżeń 1–5 do zastosowania jako lek.
11. Związek określony którymkolwiek z zastrzeżeń 1–5, **znamienny tym**, że jest do zastosowania według zastrzeżenia 10 jako środek przeciwnowotworowy.

12. Związek określony którymkolwiek z zastrzeżeń 1–5 do zastosowania według zastrzeżenia 10 albo 11, **znamienny tym**, że jest do zastosowania w schorzeniach wybranych z grupy: białaczka, w tym nieograniczająco ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, szpiczak mnogi; niedrobnokomórkowy rak płuc, w tym nieograniczająco rak komórek nabłonkowych płuc, gruczolakorak płuc, rak płaskonabłonkowy ludzkiego płuca; rak jelita grubego (okreźnicy), w tym nieograniczająco gruczolakorak jelita grubego, rak nabłonka okreźnicy; nowotwór ośrodkowego układu nerwowego, w tym nieograniczająco rak mózgu, taki jak glejak; czerniak, w tym nieograniczająco czerniak złośliwy, czerniak nabłonka, czerniak nienabłonkowy; nowotwór jajnika, w tym nieograniczająco nabłonkowy rak jajnika, torbielakogruczolakorak jajnika; nowotwór nerki, w tym nieograniczająco rak nerkowokomórkowy; nowotwór prostaty, w tym nieograniczająco gruczolakorak prostaty; nowotwór piersi, w tym nieograniczająco gruczolakorak piersi, zapalny rak piersi, gruczolakorak z przerzutami; rak żołądka; rak trzustki; mięsak i rak trzonu macicy, jak i jego lekooporny wariant; rak szyjki macicy; rak pęcherza.
13. Związek określony którymkolwiek z zastrzeżeń 1–5 do zastosowania według któregośkolwiek z zastrzeżeń 10–12, **znamienny tym**, że jest do zastosowania w schorzeniach wybranych z grupy: czerniak, nowotwór okreźnicy, nowotwór piersi oraz białaczka bifenotypowa.