

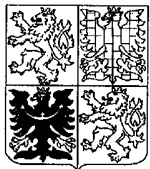
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 711

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.08.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.08.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9710785**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.08.2000**
(Věstník č. 8/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/FR98/01768**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/11646**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 491/22

A 61 K 31/435

A 61 P 31/12

A 61 P 33/00

(71) Přihlašovatel:

SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET
D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S. C. R. A. S.),
Paris, FR;

(72) Původce:

Cazaux Jean-Bernard, Aramon, FR;
Lavergne Olivier, Massy, FR;
Le Breton Christine, Avignon, FR;
Manginot Eric, Montfavet, FR;
Bigg Dennis, Gif-sur-Yvette, FR;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Opticky čisté analogy kamptothecinu,
meziprodukty syntézy a způsob přípravy**

(57) Anotace:

Řešení se týká nových kamptothecinových analogů a konkrétně produktů následujících vzorců: (+)-5-ethyl-9,10-difluor-5-hydroxy-4, 5, 13, 15-tetrahydro-1H, 3H-oxepino [3', 4': 6, 7] indolizino [1,2-b] chinolino-3, 15-dion; (+)-1-[9-chlor-5-ethyl-5-hydroxy-10methyl-3hexahydropyridinium chlorid; jejich použití jako léčiv, farmaceutických kompozic s jejich obsahem a jejich použití pro přípravu protinádorových, antivirálních a antiparazitárních léčiv. Řešení se také týká nových meziproduktů syntézy uvedených produktů a způsobu přípravy uvedených meziproduktů.

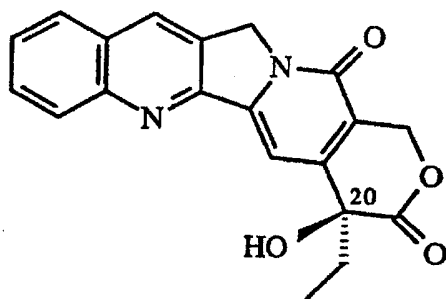
Opticky čisté analogy kamptothecinu, opticky čisté
meziprodukty syntézy a způsob jejich přípravy

Oblast techniky

Vynález se týká nových kamptothecinových analogů, jejich použití jako léčiv, farmaceutických kompozic s jejich obsahem a jejich použití pro přípravu protinádorových, antivirálních a antiparazitárních léčiv. Vynález se také týká nových meziproduktů syntézy uvedených produktů a způsobu přípravy uvedených meziproduktů.

Dosavadní stav techniky

Kamptothecin je přírodní sloučenina, která byla poprvé izolována z listů a kůry čínské rostliny nazývané *camptotheca acuminata* (viz Wall a kol., *J. Amer. Chem. Soc.* **88**:3888 (1966)). Kamptothecin je pentacyklická sloučenina, představovaná fragmentem indolizino[1,2-b]chinoleinu kondenzovaným s α -hydroxylaktonem s šesti řetězci. Atom uhlíku v poloze 20, který nese skupinu α -hydroxy, je asymetrický propůjčuje molekule schopnost rotace. Přirozená forma kamptothecinu má absolutní konfiguraci "S" atomu uhlíku v poloze 20 má následující vzorec:



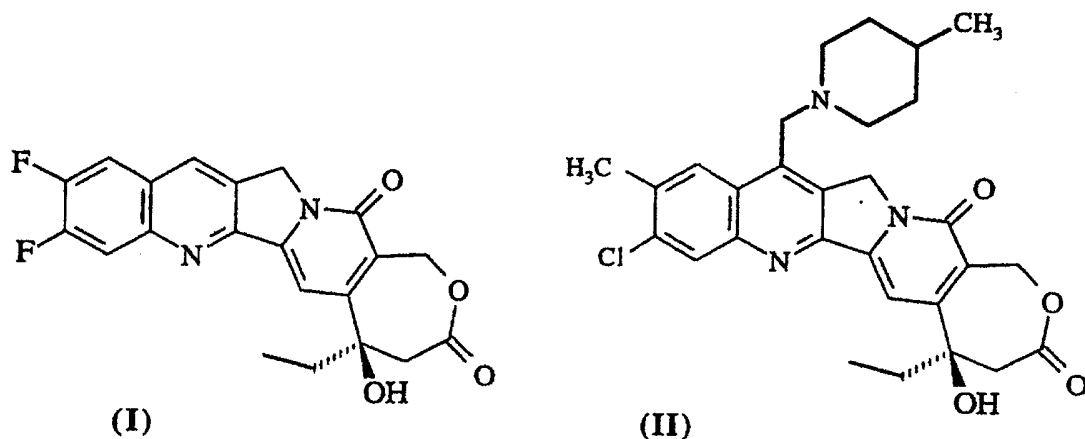
Kamptothecin vykazuje anti-proliferativní aktivitu u řady rakovinných buněčných linií, zahrnující buněčné linie lidského nádoru trakčníku, plic a prsu (Suffness, M. a kol.: *The Alkaloids Chemistry and Pharmacology*, Bross, A., ed., Vol. 25, str. 73 (Academic Press, 1985)). Bylo navrženo, že anti-proliferativní aktivita kamptothecinu souvisí s jeho inhibiční aktivitou topoisomerázy I DNA.

Bylo indikováno, že α -hydroxylakton je bezpodmínečně nutný jak pro aktivitu *in vivo*, tak i pro aktivitu *in vitro* kamptothecinu (*Camptothecins : New Anticancer Agents*, Putmesil, M. a kol., ed., str. 27 (CRC Press, 1995) ; Wall, M. a kol., *Cancer Res.* **55**:753 (1995); Hertzberg a kol., *J. Med. Chem.* **32**:715 (1982) a Crow a kol., *J. Med. Chem.* **35**:4160 (1992)). později přihlašovatelé našli novou třídu analogů kamptothecinu, u kterých β -hydroxylakton nahrazuje přírodní α -hydroxylakton kamptothecinu (viz přihláška vynálezu WO 97/00876).

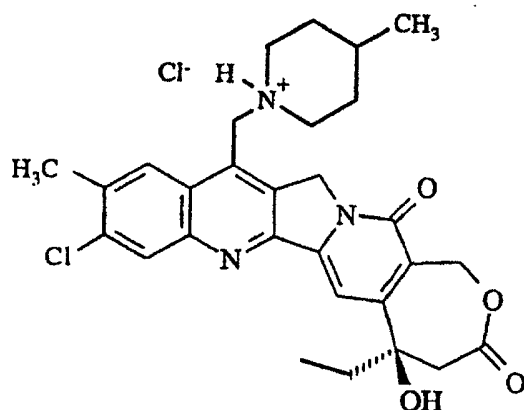
Podstata vynálezu

Vynález se týká nového způsobu přípravy enantiomericky čistého meziprojektu syntézy, stejně tak jako nových enantiomericky čistých analogů kamptothecinu.

Předložený vynález se tedy především týká nových analogů kamptothecinu, které se odlišují od všech dosud známých sloučenin a které mají následující obecné vzorce (I) a (II)

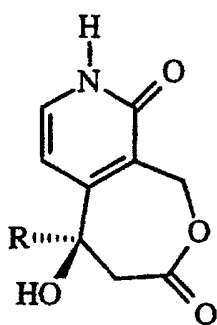


nebo nových solí sloučenin obecného vzorce (II) jako jsou například soli obecného vzorce (III)



(III)

Klíčový meziprodukt syntézy tohoto typu opticky čistých sloučenina je produkt obecného vzorce M:



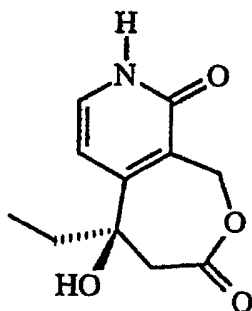
M

ve kterém R představuje přímý nebo rozvětvený alkylový zbytek obsahující od 1 do 10 atomů uhlíku. Výhodně R představuje ethylový zbytek.

Sloučeniny obecných vzorců (I) a (II) mohou být připraveny

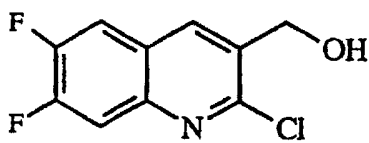
způsobem, který zahrnuje následující kroky:

- kopulace sloučeniny obecného vzorce

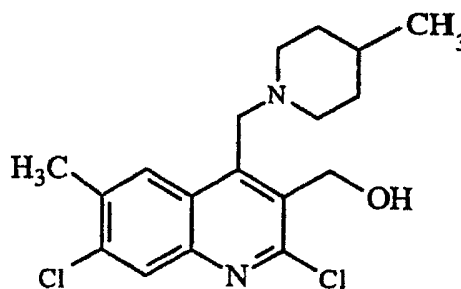


(+)-EHHOPD

s jednou nebo s druhou ze sloučenin obecných vzorců N_1 nebo N_2 :

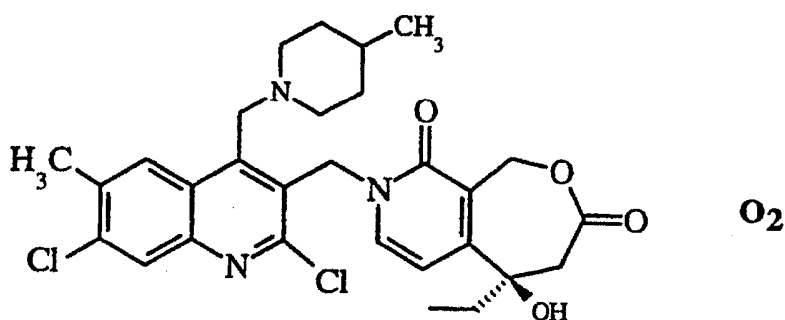
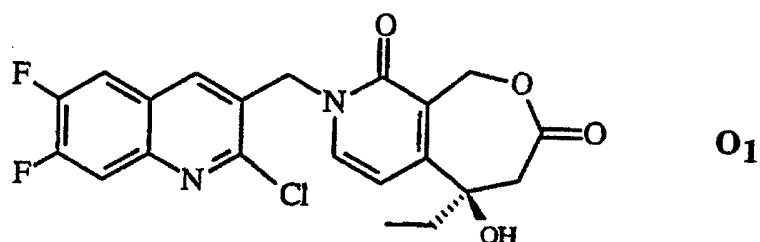


N_1



N_2

pro získání sloučeniny obecného vzorce O_1 respektive sloučeniny obecného vzorce O_2 :



- následná cyklizace sloučeniny O₁ pro získání sloučeniny obecného vzorce (I) ; cyklizace sloučeniny O₂ dává sloučeninu obecného vzorce (II), která může být po salifikaci přeměněna na sloučeninu obecného vzorce (III).

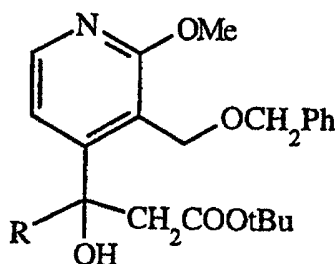
Vytváření sloučenin O₁ nebo O₂ se sloučeniny obecného vzorce M ve které R představuje ethylový zbytek a N₁ nebo N₂ se provádí zpracováním známým odborníkovi v oboru pod jménem Mitsunobu reakce (s odvoláním na práci Mitsunobu, O a kol., *Synthesis*, str.1 (1981)). Jedná se o náhradu hydroxylové funkční skupiny sloučeniny N nukleofilem jako je sloučenina M nebo deprotonovaným derivátem této sloučeniny, zpracování fosfinem, například trifenylfosfinem a derivátem azodikarboxylátem, například diethyl-azodikarboxylátem nebo diisopropylem, v aprotickém rozpouštědle jako je například, tetrahydrofuran nebo N,N- dimethylformamid. Cyklizace

sloučenin O_1 a O_2 pro získání sloučenin obecných vzorců (I) a (II) se provádí výhodně v přítomnosti paládiového katalyzátoru (například octanu paladnatého) za bážických podmínek (získaných například použitím alkalického octanu popřípadě kombinovaného s činidlem fázového přenosu jako je například tetrabutylammoniumbromid), v aprotickém rozpouštědle jako je acetonitril nebo N,N-dimethylformamid, při teplotě v rozmezí mezi $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (R. Grigg a kol., *Tetrahedron* **46**, str. 4003 (1990)).

Předložený vynález se také týká jakožto nového průmyslového produktu sloučeniny obecného vzorce M, tak jak byla definována výše. Tento produkt může být použit pro výrobu léčiv.

Sloučenina obecného vzorce M se syntetizuje novým způsobem, který je součástí předmětu předloženého vynálezu a sestává z posloupnosti následujících kroků:

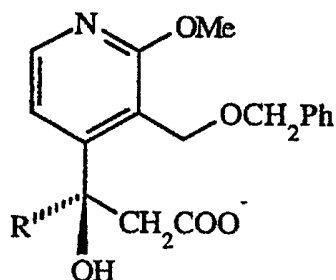
- racemický t-butylester obecného vzorce



(pro jeho přípravu, viz zejména přihláška vynálezu WO 97/00876) se zpracovává kyselinou trifluoroctovou po dobu 18

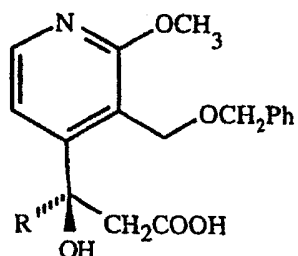
hodin při teplotě okolí pro získání odpovídající karboxylové kyseliny;

- chinidinová sůl kyseliny získané v předchozím kroku se potom zahřívá v isopropylalkoholu při teplotě vyšší než 30 °C, s výhodou okolo 50 °C, před ochlazením reakční směsi až na teplotu okolí, takže jeden z enantiomerů výše uvedené kyseliny krystalizuje, zatímco sůl druhého enantiomeru, jehož aniont má obecný vzorec



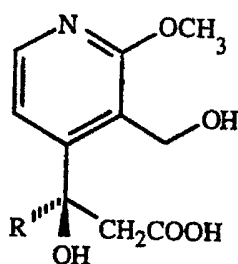
zůstává v roztoku

- koncentruje se isopropylalkoholový roztok soli enantiomeru, který nekystalizoval, a zpracovává se kyselinou chlorovodíkovou a míchá, což vede k vytvoření sloučeniny obecného vzorce A



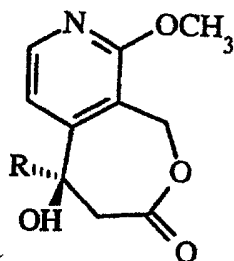
A

- následně se uvede sloučenina obecného vzorce A do kontaktu s vlhkým paládiem na uhlí, potom se do směsi přidá mravenčáková nebo kyselina mravenčí pro získání debenzylovaného produktu obecného vzorce B



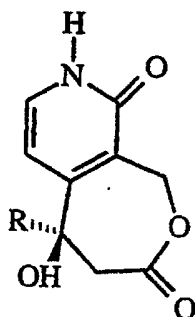
B

- dále se cyklizuje sloučenina obecného vzorce B působením dicyklohexylkarbodiimidu pro získání laktonové sloučeniny obecného vzorce C



C

- nakonec se transformuje skupina $-OCH_3$ laktonové sloučeniny obecného vzorce C na karbonyl, působením jodidu sodného a trimethylsilylchloridu, pro získání sloučeniny obecného vzorce M uvedené výše



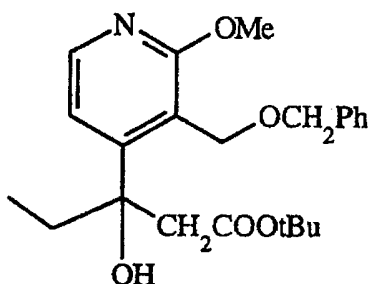
M

Při provádění výše uvedeného způsobu se reakce přeměňující sloučeninu obecného vzorce A na sloučeninu obecného vzorce B provádí výhodně v methanolu a výhodně za zahřívání reakční směsi na teplotu zhruba $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ po přidání mravenčanu amonného. Cyklizace sloučeniny obecného vzorce B pro získání sloučeniny C se může provádět v tetrahydrofuranu, výhodně za teploty zhruba $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, zatímco se výhodně pracuje při teplotě

okolí s acetonitrilem jako s rozpouštědlem v reakci vedoucí od sloučeniny obecného vzorce C ke sloučenině obecného vzorce M.

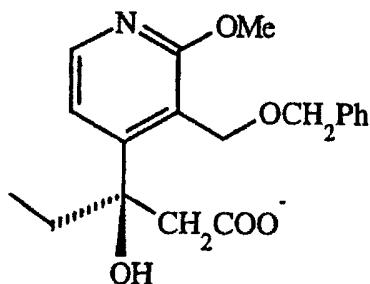
V konkrétním případě, kdy R představuje ethylovou skupinu se sloučenina obecného vzorce M syntetizuje způsobem, sestávajícím postupně z následujících kroků:

- racemický t-butylester obecného vzorce



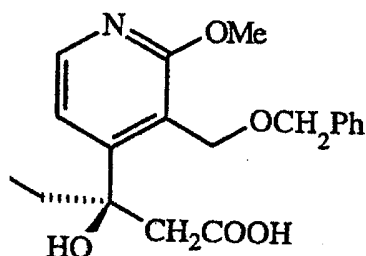
(pro jeho přípravu, viz zejména přihláška vynálezu WO 97/00876) se zpracovává kyselinou trifluoroctovou po dobu 18 hodin při teplotě okolí pro získání odpovídající karboxylové kyseliny;

- chinidinová sůl kyseliny 3-(3-benzyloxymethyl-2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxy-pentanové se potom zahřívá v isopropylalkoholu při teplotě vyšší než 30 °C, s výhodou okolo 50 °C, před ochlazením reakční směsi až na teplotu okolí, takže sůl enantiomeru (+) kyseliny 3-(3-benzyloxymethyl-2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxy-pentanové krystalizuje, zatímco sůl enantiomeru (-), jehož aniont má obecný vzorec



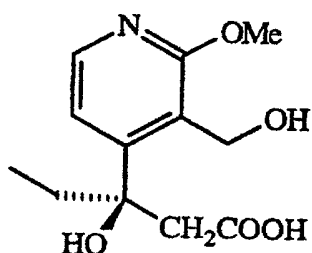
zůstává v roztoku

- koncentruje se isopropylalkoholový roztok soli enantiomer (-) kyseliny 3-(3-benzyloxymethyl-2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxy-pentanová a zpracovává se kyselinou chlorovodíkovou a míchá, což vede k vytvoření sloučeniny vzorce A'



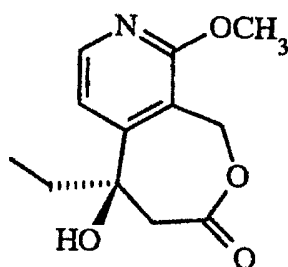
A'

- následně se uvede sloučenina obecného vzorce A' do kontaktu s vlhkým paládiem na uhlí, potom se do směsi přidá mravenčan amonný nebo kyselina mravenčí pro získání debenzylovaného produktu vzorce B'



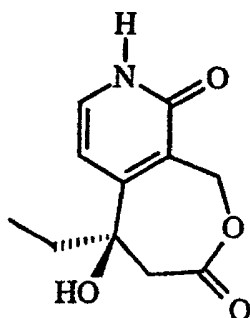
B'

- dále se cyklizuje sloučenina obecného vzorce B' působením dicyklohexylkarbodiimidu pro získání laktonové sloučeniny vzorce C'



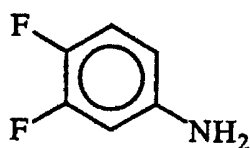
C'

- nakonec se transformuje skupina -OCH₃ laktonové sloučeniny obecného vzorce C' na karbonyl, působením jodidu sodného a trimethylsilylchloridu, pro získání (+)-5-ethyl-5-hydroxy-1,3,4,5,8,9-hexahydrooxepino[3,4-c]pyridin-3,9-dionu (neboli (+)-EHHOPD) obecného vzorce



(+)-EHHOPD

Sloučenina obecného vzorce N_1 může být získána z anilinu obecného vzorce P_1

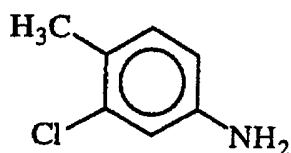


P_1

následujícím způsobem: anilin obecného vzorce P_1 se N-acetyluje zpracováním acetylačním činidlem jako je například acetanhydrid. Acetanilid získaný tímto způsobem, zpracováváný za teploty v rozmezí od 50 °C do 100 °C, výhodně 75 °C, reaktantem známým odborníkovi v oboru pod názvem Vilsmeayerův reaktant (získaný působením oxychloridu fosforečného na N,N-dimethylformamid za teploty v rozmezí od 0 °C a 100 °C) dává odpovídající 2-chlor-3-chinoleinkarbaldehyd (reference viz například Meth-Cohn a kol. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* str.1520 (1981); Meth-

Cohn a kol. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, str. 2509 (1981); a Nakasirnhan a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, str. 4431 (1990)). 2-chlor-6,7-difluor-3-chinoleinkarbaldehyd se snadno redukuje na odpovídající 2-chlor-6,7-difluor-3-chinoleinmethanol vzorce N_1 za klasických podmínek, známých odborníkovi v oboru, jako je například zpracování v alkoholovém rozpouštědle (například methanolu) borhydridem sodným za teploty v rozmezí od 0 °C do 40 °C.

Sloučenina obecného vzorce N_1 může být získána následujícím způsobem: anilin obecného vzorce P_2



P_2

se ortho-acyluje reakcí s chloracetonitrilem v přítomnosti chloridu boritého a další Lewisovy kyseliny jako je chlorid hlinitý, chlorid titaničitý nebo diethylaluminiumchlorid v aprotickém rozpouštědle nebo směsi aprotických rozpouštědel, následovanou hydrolýzou (viz Sugasawa, T, a kol. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, str. 4842 (1978)). Takto získaný meziprodukt se potom zpracovává ethylmalonylchloridem v aprotickém rozpouštědle jako je acetonitril v přítomnosti báze jako je triethylamin, potom se zpracovává alkalickým alkoholátem, například methylátem sodným v methanolu, pro získání ethyl-7-chlor-4-chlormethyl-6-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-

3-chinolinkarboxylátu. Posledně uvedená sloučenina se přemění na ethyl-2,7-dichlor-4-chlormethyl-6-methyl-3-chinolinkarboxylát zpracováním oxychloridem fosforečným. Potom se provede nukleofilní substituce zpracováním 4-methylpiperidinem. Funkční skupina ethylkarboxylát se potom redukuje diisobutylaluminiumhydridem v aprotickém rozpouštědle jako je dichlormethan pro získání sloučeniny obecného vzorce N_2 . Pořadí posledních dvou etap může být popřípadě obráceno.

Analogy meziproduktových sloučenin typu N_1 nebo N_2 byly popsány v literatuře, zejména v patentové přihlášce PCT 95/05427.

Sloučenina obecného vzorce (II) může být přeměněna na farmaceuticky přijatelnou sůl obvyklými způsoby. Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují, uvedeno jako neomezující příklad, adiční soli anorganických kyselin jako je hydrochlorid, síran, fosforečnan hysrogenfosforečnan, hdyrobromid a dusičnan nebo soli organických kyselina jako je octan, maleinan, fumaran, vínan, jantaran, citronan, mléčnan, methansulfonát, p-toluensulfonát, palmitan, salicylát, šťavelan a stearan. Další příklady farmaceuticky přijatelných solí mohou být nalezeny v "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* **66**:1 (1977).

Sloučeniny podle předloženého vynálezu mají zajímavé farmakologické vlastnosti. Sloučeniny podle předloženého vynálezu mají inhibiční aktivitu pro topoisomerázu I a/nebo II a protinádorovou aktivitu. Stav techniky naznačuje, že sloučeniny podle předloženého vynálezu vykazují aktivitu

antiparazitickou a/nebo antivirální. Sloučeniny podle předloženého vynálezu tak mohou být použity v různých terapeutických aplikacích.

V příkladové části uvedené dále je možno nalézt ilustrace farmakologických vlastností sloučenin podle předloženého vynálezu.

Sloučeniny mohou inhibovat topoisomérázu, například topoisomérázu typu I a/nebo II u pacienta, například savce jako je člověk, při podávání tomuto pacientovi terapeuticky účinného množství sloučeniny obecného vzorce (I) nebo obecného vzorce (II), nebo farmaceuticky přijatelné soli sloučeniny obecného vzorce (II) nebo libovolné směsi těchto látek.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu mají protinádorovou aktivitu. Mohou být použity pro léčení nádorů, například nádorů exprimujících topoisomérázu, u pacienta podáváním uvedenému pacientovi terapeuticky účinného množství sloučeniny obecného vzorce (I) nebo obecného vzorce (II), nebo farmaceuticky přijatelné soli sloučeniny obecného vzorce (II), nebo libovolné směsi těchto látek. Příklady nádorů nebo typů rakoviny zahrnují rakovinu jícnu, žaludku, střeva, konečníku, ústní dutiny, farynxu, larynxu, plic, tracheálního, prsu, cervix uteri, corpus endometrium, vaječníků, prostaty, varlat, močového měchýře, ledvin, jater, pankreasu, kostí, vaziva, kůže, očí, mozku a centrálního nervového systému, stejně tak jako rakovinu štítné žlázy, leukemii, Hodgkinovu nemoc, lymfomy jiné než Hodgkinovy, vícenásobné myelomy a další.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou také být použity pro léčení parazitálních onemocnění inhibicí hemoflagelátů (například trypanosomie nebo infekce leishmania) nebo inhibicí plasmodií (jako například v případě malárie), ale také při léčení infekcí nebo onemocnění virových.

Tyto vlastnosti vytvářejí z produktů obecných vzorců (I) a (II) látky vhodné pro farmaceutické použití. Předmětem předložené přihlášky jsou produkty obecných vzorců (I) a (II), tak jak byly definovány výše, nebo adiční soli s farmaceuticky přijatelnými anorganickými nebo organickými kyselinami produktu obecného vzorce (III) jako jsou například soli obecného vzorce (III) popsané výše nebo libovolné směsi těchto látek pro použití jako léčiva. Předložený vynález se také týká farmaceutických kompozic obsahujících jako účinnou složku alespoň jedno z léčiv uvedených výše.

Předložený vynález se dále týká farmaceutických kompozic obsahujících sloučeninu podle předloženého vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelnou adiční sůl spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem zvoleným podle způsobu podávání (například orální, intravenózní, intraperitoneální, intramuskulární, transdermální nebo subkutánní). Farmaceutická kompozice (například terapeutická) může být ve formě pevné, tekuté, ve formě liposomů nebo lipidových micel.

Farmaceutická kompozice může být v pevné formě jako jsou

například prášky, pilulky, granule, tablety, liposomy, želé nebo čípky. Pilulky, tablety nebo želé mohou být povlečeny látkou schopnou chránit kompozici před působením žaludečních kyselin nebo enzymů v žaludku po dobu dostatečnou k tomu, aby kompozice prošla nenatrávená do tenkého střeva pacienta. Sloučenina může také být podávána lokálně, například přímým nanesením na nádor. Sloučenina může také být podávána způsobem s pomalým uvolňováním (například kompozice s pomalým uvolňováním nebo infúzní pumpa). Vhodný pevný nosič může být například fosforečnan vápenatý, stearan hořečnatý, uhličitan hořečnatý, talek, cukry, laktóza, dextrin, škrob, želatina, celulóza, methylcelulóza, sodná karboxycelulóza, polyvinylpyrrolidin a vosky. Farmaceutické kompozice obsahující sloučeninu podle předloženého vynálezu mohou být také podávány v tekuté formě jako například roztoky, emulze, suspenze nebo přípravky s prodlouženým uvolňováním. Vhodné tekuté nosiče mohou být například voda, organická rozpouštědla jako je glycerol nebo glykoly jako je polyethylenglykol, stejně tak jako jejich směsi v různých poměrech s vodou.

Předložený vynález se také týká použití produktů obecných vzorců (I) a (II) definovaných výše nebo farmaceuticky přijatelných adičních solí produktu obecného vzorce (II) s anorganickými nebo organickými kyselinami, jako jsou například soli obecného vzorce (III) uvedené výše nebo libovolné směsi těchto látek pro přípravu látek určených pro inhibici topoisomerázy a obzvláště topoisomeráz typu I nebo typu II, pro přípravu léčiv pro léčení nádorů, pro přípravu léčiv pro léčení parazitárních infekcí stejně tak jako pro přípravu léčiv pro léčení virových infekcí nebo onemocnění.

Dávka sloučeniny podle předloženého vynálezu určená pro léčení onemocnění nebo poruch uvedených výše se mění v závislosti na způsobu podávání, věku a tělesné hmotnosti léčeného subjektu stejně tak jako na jeho stavu a bude definitivně určena ošetřujícím lékařem nebo veterinářem.

Takové množství, určené ošetřujícím lékařem nebo veterinářem, je nazýváno "terapeuticky účinné množství".

Pokud není uvedeno jinak, technické a vědecké názvy dále použité mají stejný význam jako je význam, ve kterém je používá běžná odborník v příslušném oboru, do kterého spadá tento předložený vynález. Navíc všechny publikace, přihlášky vynálezu a vynálezu a další uvedené citace jsou zahrnuty jako reference.

Následující příklady jsou uvedeny pouze jako ilustrace a v žádném případě nepředstavují omezení rozsahu předmětu předloženého vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

(+)-5-ethyl-5-hydroxy-
1,3,4,5,8,9-hexahydrooxepino[3,4-c]pyridin-3,9-dion
[(+)-EHHOPD]

1.a. Chinidinová sůl kyseliny 3-(3-benzyloxymethyl-
2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxy-pentanové:

Terc.-butyl 3-(3-benzyloxymethyl-2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxy-pentanoát (40 g; 100 mmolu) se zpracovává kyselinou trifluoroctovou (150 ml) a reakční směs se míchá po dobu 18 hodin při teplotě 20 °C. Po odpaření kyseliny trifluoroctové, se vlije methylenchlorid (200 ml) a přidává se nasycený roztok hydrogenuhlíčitanu sodného až do pH = 7,5-8. Po dekantaci, vodná fáze se promývá 100 ml methylenchloridu. pH vodné fáze se upraví na hodnotu 1 přidáním roztoku 6 N kyseliny chlorovodíkové. Produkt se potom extrahuje z vodné fáze methylenchloridem (dvakrát 200 ml). Roztok se suší na síranu hořečnatém a koncentruje. Takto získaná kyselina 3-(3-benzyloxymethyl-2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxy-pentanová (31,1 g : 90 mmolu), vyjmutá v isopropylalkoholu (30 ml), se zpracovává roztokem chinidinu (29,2 g : 90 mmolu) v isopropylalkoholu (30 ml) při teplotě 50 °C za míchání až do úplného rozpuštění. Potom se teplota nechá znovu poklesnout až na 40 °C, míchání se zastaví a teplota se nechá měnit až do 20 °C. Prostředí se přivede na teplotu 0 °C bez míchání a potom udržuje při této teplotě po dobu 16 hodin. Potom se teplota nechá vzrůst až na 20 °C a míchá se až do krystalizace. Prostředí se zředí isopropylalkoholem a potom filtruje. Precipitát se promývá isopropylalkoholem. Sůl enantiomeru (+) precipituje (m = 26,6 g) zatímco sůl enantiomeru (-) zůstává v roztoku v isopropylalkoholu. Takto se získá filtrát, který se koncentruje pro získání olej (34 g), který se použije bez dalšího čištění v následující etapě.

Produkty se analyzují pomocí HPLC na koloně CHIRAL AGP 5 μ (10 cm x 4 mm) vymývané směsí isopropylalkohol /voda/fosfátový pufr. pH = 6,5 : 30/920/50, při průtoku 1,2

ml/min, detekce UV při 280 nm. Retenční doby jsou 6,4 minut pro enantiomer (-) a 2,8 minut pro enantiomer (+). Poměr enantiomer (-) / enantiomer (+) je roven 83 / 17.

1.b. Kyselina (-)-3-(3-benzyloxymethyl-2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxypentanová

Roztok v isopropylalkoholu získané chinidinové soli enantiomeru (-) kyseliny 3-(3-benzyloxymethyl-2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxy-pentanové (etapa 1.a) se koncentruje. Koncentrát se vyjme v 270 ml methylenchloridu a 270 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové 1N. Reakční směs se míchá po dobu 16 hodin při teplotě 20 °C. Po dekantaci se organická fáze koncentruje, koncentrát se vyjme v methanolu pro použití v následující fázi.

Získá se 13,5 g produktu (výtěžek 87%) a poměr enantiomer (-) / enantiomer (+) je roven 85 / 15.

Retenční doby HPLC (stejný protokol jako v 1.a.) jsou:

- enantiomer (-) : 6,4 minut
- enantiomer (+) : 2,8 minut

1.c. (+)-5-ethyl-5-hydroxy-

1,3,4,5,8,9-hexahydrooxepino[3,4-c]pyridin-3,9-dion:

Kyselina (-)-3-(3-benzyloxymethyl-2-methoxy-4-pyridyl)-3-hydroxy-pentanová (13,5 g; 39 mmolu; etapa 1.b) se uvede do roztoku v 87 ml methanolu. Tento roztok se vlije pod dusíkovou atmosférou na 10% paládium na uhlí vlhké na 50% (27,7 g; 13 mmolu). Reakční směs se míchá po dobu 5 minut,

potom se přidá roztok mravenčanu amonného (11,5 g; 183 mmolu) v 135 ml methanolu. Reakční směs se míchá po dobu 30 minut a teplota se nechá vyvíjet, potom se zahřívá při teplotě 40 °C po dobu 30 minut. Prostředí se potom filtruje přes vrstvu Clarcelu a koncentruje. Přilije se 40 ml toluenu, který se odpaří; tato operace se opakuje pro eliminaci methanolu. Residuum takto získané se vyjme v 45 ml tetrahydrofuranu. Potom se přileje roztok dicyklohexylkarbodiimidu (7,180 g ; 34,5 mmolu) v 20 ml tetrahydrofuranu. Reakční prostředí se zahřívá při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny. Směs se přivede na teplotu 20 °C a potom se dicyklohexylmočovina filtruje. Filtrát se koncentruje do sucha. Residuum se uvede do roztoku (v 46 ml acetonitrilu, přidá se 6,0 g (40,5 mmolu) jodidu sodného a potom 5,13 ml (40,5 mmolu) trimethylsilylchloridu. Reakční směs se udržuje za míchání při teplotě okolí po dobu 5 hodin. Potom se přidá 28 ml acetonitrilu a 5,6 ml vody. Získaný precipitát se filtruje a potom vyjme v 1 ml vody a pH se upraví na hodnotu 7,5 přidáním roztoku amoniaku. Získaná pevná látka se filtruje a suší. Získá se $m = 4,2$ g konečného produktu s výtěžkem 34 % a poměrem enantiomer (+) / enantiomer (-) rovným 88,4 / 11,6.

Analýza HPLC se provádí na koloně Chiralcel OD 25 cm x 4,6 mm, použitá vymývací rozpouštědla jsou heptan 600 a ethanol 400 a průtok je 1 ml/min 210 nm. Retenční doby jsou:

- enantiomer (-) : 7,1 minut
- enantiomer (+) : 9 minut.

Produkt se vyjme v acetonu (40 ml), potom se přidá voda (150 ml). Nechá se precipitovat a získá se 3 g produktu s poměrem

enantiomer (+) / enantiomer (-) rovným 99,4 / 0,6.

^1H NMR (250 MHz, DMSO D_6): 0,8 (r, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 1,65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 3,00-3,35 (q, 1H+1H, $\text{-CH}_2\text{-CaO}$); 5,3 (q, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$); 5,7 (s, -OH); 6,35 (d, 1H aromatický); 7,3 (d, 1H aromatický); 11,7 (s, N-H).

Příklad 2

(+)-5-ethyl-9,10-difluor-5-hydroxy-4,5,13,15- tetrahydro-1H,3H-oxepino[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-3,15-dion

2.a. N-(3,4-difluorfenyl)acetamid:

Směs 3,4-difluoranilinu (50 ml; 0,5 molu) a triethylaminu (70 ml; 0,5 molu) v dichlormethanu (1,5 l) se ochladí ledovou lázní. Acetanhydrid (71,5 ml; 0,75 molu) se přidá po kapkách a reakční směs se potom míchá po dobu 1 hodiny při teplotě okolí. Získaná směs se potom promývá postupně vodou, roztokem hydrogenuhličitanu sodného 10 % a nasycenou solankou. Organická frakce se suší na síranu sodném a koncentruje za sníženého tlaku. Residuum se suspenduje v pentanu, filtruje a suší za sníženého tlaku pro získání produktu z názvu (78 g; 91 % výtěžek) ve formě bělavé pevné látky.

(Teplota tání 126-127,5 °C).

^1H NMR (DMSO) : 2,15 (s, 3H); 7,10-7,65 (m, 2H); 7,65-8,10 (m, 1H); 10,30 (široký pík, 1H).

2.b. 2-chlor-6,7-difluor-3-chinolin-3-karbaldehyd:

Používá se obecná procedura, kterou popsali Meth-Cohn a

kol., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1981, 1520 a 2509. K Vilsmeayerovu reaktantu, který byl získán přidáním po kapkách pod argonovou atmosférou oxychloridu fosforečného (103 ml; 1,1 molu) do bezvodého DMF (34 ml; 440 mmolu) chlazeného ledovou lázní a míchaného po dobu půl hodiny předtím, než se teplota ponechá vzrůst na teplotu okolí, se přidá produkt etapy 2.a (32 g; 220 mmolu). Směs takto získaná se míchá při teplotě 70 °C po dobu 16 hodin. Po ochlazení na teplotu okolí, se reakční směs přidá po kapkách do směsi voda-led (400 ml) a míchá po dobu 2 hodin. Získaný precipitát se filtruje a promývá vodou, potom suší pro získání produktu z názvu (9 g; 18 % výtěžek) ve formě žluté pevné látky.

(Teplota tání 226,5-229 °C).

¹H NMR (DMSO) : 8,17 (dd, 1H); 8,39 (dd, 1H); 8,97 (d, 1H); 10,34 (d, 1H).

IR (KBr) : 888, 1061, 1262, 1507, 1691 cm⁻¹.

2.c. 2-chlor-6,7-difluor-3-chinolylmethanol:

Suspenze produktu etapy 2.b (9 g; 39 mmolu) v methanolu (400 ml) se zpracovává borhydridem sodným (1 g; 53 mmolu) při teplotě okolí po dobu půl hodiny. Přebytek borhydridu se odstraní kyselinou octovou (2 ml). Těkavé látky se odstraní za sníženého tlaku. Residuum se rozpustí v ethylacetátu (500 ml), získaná směs se potom promývá postupně zředěným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou a nasycenou solankou. Potom se suší na síranu hořečnatém a koncentruje za sníženého tlaku. Residuum se rekrystalizuje v 1,2-dichlorethanu pro získání produktu z názvu (8 g; 80 % výtěžek) ve formě béžové pevné látky.

(Teplota tání 166,5-167 °C)

^1H NMR (DMSO) : 4,67 (d, 2H); 5,80 (t, 1H); 8,01 (dd, 1H); 8,22 (dd, 1H); 8,48 (s, 1H).

IR (KBr) : 871, 1038, 1253, 1513 cm^{-1} .

2.d. (+)-8-(2-chlor-6,7-difluor-3-chinolinmethanol)-5-ethyl-5-hydroxy-1,3,4,5,8,9-hexahydrooxepino[3,4-c]pyridin-3,9-dion:

Do roztoku (+)-EHHOPD v bezvodém DMF (30 ml) (1,58 g; 7,08 mmol; etapa 1.c.), produktu etapy 2.c (1,62 g; 7,06 mmolu) a tributylfosfinu (1,91 ml; 7,87 mmolu), se přidá po kapkách při teplotě okolí a pod argonovou atmosférou diethylazodikarboxylát (1,24 ml; 7,87 mmolu). Směs takto získaná se potom míchá po dobu 16 hodin. Reakční směs se potom odpaří do sucha za sníženého tlaku. Residuum se čistí chromatografií na koloně oxidu křemičitého (vymývací rozpouštědlo : ethylacetát). Získaná pevná látka se vyjme v diethyletheru, filtruje a suší pro získání produktu z názvu (1,56 g; 51 % výtěžek) ve formě bělavé pevné látky.

(Teplota tání 196 $^{\circ}\text{C}$).

^1H NMR (DMSO) : 0,84 (t, 3H); 1,74 (m, 2H); 3,02 (d, 1H); 3,34 (d, 1H); 5,29 (s, 2H); 5,31 (dd, 2H); 5,75 (s, 1H); 6,51 (d, 1H); 7,80 (d, 1H); 8,03 (dd, 1H); 8,07 (s, 1H); 8,17 (dd, 1H).

IR (KBr) : 875, 1057, 1360, 1507, 1574, 1647, 1749 cm^{-1} .

2.e. (+)-5-ethyl-9,10-difluor-5-hydroxy-4,5,13,15-tetrahydro-1H,3H-oxepino[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-3,15-dion:

Směs produktu etapy 2.dy (1,53 g; 3,52 mmol; etapa 2.d.),

bromidu tetrabutylammonia (1,25 g; 3,87 mmolu), octanu draselného (520 mg; 5,28 mmolu), trifenylofosfinu (180. mg; 0,70 mmolu) a octanu paladnatého (79 mg; 0,35 mmolu) se míchá pod argonovou atmosférou v bezvodém acetonitrilu a zahřívá při teplotě zpětného toku po dobu 22 hodin. Po návratu reakčního prostředí na teplotu okolí se směs koncentruje za sníženého tlaku před provedením chromatografie na koloně oxidu křemičitého (vymývací rozpouštědlo : směs $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98/2). Takto se získá produkt z názvu (960 mg; výtěžek 68 %; čistota určená pomocí HPLC : 97,1 %). Tento produkt se vyjme v bezvodém CH_2Cl_2 (100 ml) a míchá 24 hodin, potom se filtruje a suší za sníženého tlaku pro získání čistého produktu z názvu (850 mg; výtěžek 61 %; čistota určená pomocí HPLC : 99,6 %) ve formě bílé pevné látky.

^1H NMR (DMSO) : 0,87 (t, 3H); 1,85 (m, 2H); 3,08 (d, 1H); 3,44 (d, 1H); 5,26 (s, 2H); 5,39 (d, 2H); 5,52 (d, 2H); 5,99 (široký pík, 1H); 7,39 (s, 1H); 8,15 (dd, 1H); 8,23 (dd, 1H); 8,68 (s, 1H).

IR (KBr) : 871, 1261, 1512, 1579, 1654, 1746 cm^{-1} .

Příklad 3

(+)-chlorid 1-[9-chlor-5-ethyl-5-hydroxy-10-methyl-3,15-dioxo-4,5,13,15-tetrahydro-1H,3H-oxepino[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-12-ylmethyl]-4-methyl-hexahydropyridinium

3.a. 1-(2-amino-4-chlor-5-methylfenyl)-2-chlor-ethanon:

3-chlor-4-methylanilin (44,4 ml; 0,366 molu) v 1,2-dichlorethanu (440 ml), pod argonovou atmosférou, se

ochladí ledovou lázní. Potom se do směsi přidá po kapkách a v daném pořadí: chlorid boritý (1M v heptanu; 400 ml; 0,4 molu), chloracetonitril (28 ml; 0,44 molu) a diethylaluminiumchlorid (1M v heptanu; 400 ml; 0,4 molu). Po dobu adice se teplota udržuje pod 20 °C. Vzniklá směs se potom zahřívá při teplotě zpětného toku po dobu 3 hodin a potom ochladí na teplotu 10 °C. Potom se opatrně provádí hydrolýza reakčního prostředí pomocí kyseliny chlorovodíkové 2N (240 ml) a zahřívá na teplotu zpětného toku po dobu 1 hodiny. Přidá se voda (1 l) a ethylacetát (1 l), získaná směs se míchá po dobu 15 minut před separací fází. Vodná fáze se znovu extrahuje ethylacetátem (200 ml) a potom se sloučené organické fáze promývají vodou (500 ml). Organická fáze se suší se na síranu hořečnatém a koncentruje. Residuum se vyjme v petroleumetheru (frakce s teplotou varu 45 až 60 °C; 150 ml) a směs takto získaná se nechá odpočívat po dobu 16 hodin při teplotě 4 °C. Vzniklý precipitát se získá filtrací, promývá petroleumetherem a suší za sníženého tlaku pro získání produktu z názvu (25 g ; 31 % výtěžek). Teplota tání 129-130 °C.

^1H NMR (DMSO) : 2,20 (s, 3H); 4,98 (s, 2H); 6,90 (s, 1H); 7,15 (široký pík, 2H); 7,70 (s, 1H).

IR (KBr) : 871, 1018, 1183, 1225, 1270, 1533, 1577, 1619, 1662 cm^{-1} .

3.b. ethyl-7-chlor-4-chlormethyl-6-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-3-chinolinkarboxylát:

Produkt etapy 3.a (25 g; 0,11 molu) a triethylamin (30,6 ml; 0,22 molu) se smíchají v acetonitrilu (520 ml). Přidá se ethylmalonylchlorid (28,1 ml; 0,22 molu) při teplotě okolí a

pod argonovou atmosférou. Získaná směs se míchá po dobu 3 hodin. Potom se po kapkách přidá ethanolát sodný (připravený rozpuštěním 3 g, to jest 0,13 molu, sodíku v 140 ml absolutního ethanolu) a vzniklá směs se míchá při teplotě okolí po dobu 16 hodin. Precipitát se získá filtrací, promývá postupně ethanolem, vodou, ethanolem a etherem. Směs se potom suší za sníženého tlaku při teplotě 70 °C oxidu fosforečném pro získání produktu z názvu (28,6 g; 83 % výtěžek) ve formě bělavého prášku.

^1H NMR (DMSO) : 1,30 (t, 3H); 2,40 (s, 3H); 4,35 (q, 2H); 4,85 (s, 2H); 7,41 (s, 1H); 7,91 (s, 1H); 12,15 (široký pík, 1H).

IR (KBr) : 879, 1108, 1250, 1288, 1483, 1664, 1721 cm^{-1} .

3.c. ethyl-2,7-dichlor-4-chlormethyl-6-methyl-3-chinolinkarboxylát:

Produkt etapy 3.b (28,4 g; 90 mmolu) se zahřívá po dobu 4 hodin při teplotě zpětného toku v oxychloridu fosforečném (400 ml). Získaná směs se koncentruje za sníženého tlaku (20 mm Hg) při teplotě 80 °C. Residuum se vyjme v diisopropyletheru (400 ml). Vzniklý precipitát se získá filtrací, promývá etherem a petroleumetherem a potom suší za sníženého tlaku pro získání produktu z názvu (25,4 g; 85 % výtěžek) ve formě bělavého prášku.

(Teplota tání 126-127 °C).

^1H NMR (DMSO) : 1,37 (t, 3H); 2,58 (s, 3H); 4,49 (q, 2H); 5,14 (s, 2H); 8,16 (s, 1H); 8,35 (s, 1H).

IR (KBr): 874,1006,1163,1243,1278,1577,1723 cm^{-1} .

3.d. 2,7-dichlor-4-chlormethyl-6-methyl-3-chinolylmethanol:

Produkt etapy 3.c (25,2 g; 76,5 mmolu) se smíchá pod argonovou atmosférou s dichlorethanem (630 ml). Po kapkách se přidá diisobutylaluminiumhydrid (1M v dichlormethanu; 307 ml; 307 mmolu), zatímco reakční směs se míchá a teplota se udržuje pod 20 °C. Reakční směs se potom míchá při teplotě okolí po dobu 3 hodin, potom se vlije do vodného roztoku vínanu draselného (koncentrovaného na 20 % hmotnostně; 1,5 l). Takto získaná emulze se intenzívně míchá po dobu 1 hodiny, filtruje přes celit a potom se dvě fáze separují. Vodná fáze se extrahuje ethylacetátem (200 ml) a sloučené organické fáze se promývají vodným roztokem chloridu sodného (koncentrace 20 % hmot.; 500 ml). Získaná organická fáze se suší na síranu hořečnatém, filtruje a koncentruje za sníženého tlaku. Residuum se vyjme v diethyletheru (50 ml) a vzniklý precipitát se získá filtrací. Sušením za sníženého tlaku se získá produkt z názvu (18,3 g; 93 % výtěžek) ve formě bělavého prášku.

(Teplota tání 169-170 °C).

^1H NMR (DMSO) : 2,57 (t, 3H); 4,84 (s, 2H); 5,36 (s, 2H); 8,06 (s, 1H); 8,27 (s, 1H).

IR (KBr) : 870, 1022, 1102, 1304, 1482, 1567 cm^{-1} .

3.e. 2,7-dichlor-6-methyl-4-(4-methylpiperidinomethyl)-3-chinolylmethanol:

Roztok produktu etapy 3.d (16,2 g; 55,7 mmolu) v tetrahydrofuranu (70 ml) se zpracovává roztokem 4-methylpiperidinu (23 ml; 195 mmolu). Získaná směs se míchá při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Přidá se voda (200 ml) a dichlorethan (200 ml). Organická fáze se promývá vodným

roztokem chloridu sodného (koncentrace 20 % hmot.; 100 ml), suše na síranu hořečnatém a koncentruje za sníženého tlaku. Krystalizací residua v diethyletheru se získá produkt z názvu (18,3 g; 93 % výtěžek) ve formě pevné krystalické bílé látky.

(Teplota tání 170-171,5 °C).

^1H NMR (CDCl_3) : 0,88 (d, 3H); 1,17 (m, 2H); 1,42 (m, 1H); 1,60 (m, 2H); 2,19 (t, 2H); 2,56 (s, 3H); 2,82 (d, 2H); 4,02 (s, 2H); 4,93 (s, 2H); 6,36 (široký pík, 1H); 7,95 (s, 1H); 8,02 (s, 1H).

IR (KBr) : 971, 1013, 1105, 1293, 1479, 1559 cm^{-1} .

3.f. (+)-8-[2,7-dichlor-6-methyl-4-(4-methylpiperidinomethyl)-3-chinolylmethyl]-5-ethyl-5-hydroxy-1,3,4,5,8,9-hexahydrooxepino[3,4-c]pyridin-3,9-dion:

Suspenze (+)-EHHOPD (získaná v etapě 1.c.; 1,56 g; 7,0 mmolu) v bezvodém dioxanu (70 ml) se zpracovává postupně pod argonovou atmosférou produktem etapy 3.e (2,47 g; 7,0 mmolu), trifenylfosfinem (2,02 g; 7,7 mmolu) a diisopropylazodikarboxylátem (1,07 ml; 10,5 mmolu). Směs se míchá při teplotě okolí po dobu 16 hodin. Těkavé látky se potom odpaří za sníženého tlaku. Residuum se čistí chromatografií na koloně oxidu křemičitého (vymývací rozpouštědlo : ethylacetát). Získaná pevná látka se vyjme v diethyletheru, filtruje a suší pro získání produktu z názvu (1,96 g; 50 % výtěžek) ve formě bělavé pevné látky.

(Teplota tání 182 °C).

^1H NMR (DMSO) : 0,89 (m, 8H); 1,23 (m, 1H); 1,41 (t, 2H); 1,64 (m, 2H); 2,09 (q, 2H); 2,59 (m, 5H); 3,15 (dd, 2H);

4,06 (dd, 2H); 5,31 (dd, 2H); 5,35 (dd, 2H); 5,75 (s, 1H);
6,29 (d, 1H); 7,17 (d, 1H); 8,06 (s, 1H); 8,46 (s, 1H).
IR (KBr) : 878, 1053, 1275, 1474, 1572, 1648, 1747 cm^{-1} .

3.g. (+)-9-chlor-5-ethyl-5-hydroxy-10-methyl-12-(4-methylpiperidinomethyl)-4,5,13,15-tetrahydro-1H,3H-oxepino[3',4':6,7]indolizino[1,2-c]chinolin-3,15-dion:

Směs produktu etapy 3.f (3,80 g; 6,80 mmolu), tetrabutylammoniumbromidu (2,42 g; 7,5 mmolu), octanu draselného (1,00 g; 10,2 mmolu), trifenylofosfinu (890 mg; 3,4 mmolu) a octanu paladnatého (220 mg; 0,68 mmolu) se míchá pod argonovou atmosférou v bezvodém acetonitrilu (85 mg) při teplotě zpětného toku po dobu 24 hodin. Po ochlazení na teplotu okolí se vzniklý precipitát odebere filtrací a promývá postupně acetonitrilem, vodou, acetonem a diethyletherem a tím se získá po sušení za sníženého tlaku, produkt z názvu (2,5 g; 70 % výtěžek) ve formě bělavého prášku.

^1H NMR (DMSO) : 0,86 (m, 6H); 1,12 (q, 2H); 1,36 (m, 1H); 1,56 (d, 2H); 1,84 (q, 2H); 2,12 (t, 2H); 2,56 (s, 3H); 2,83 (dd, 2H); 3,26 (dd, 2H); 4,03 (dd, 2H); 5,28 (dd, 2H); 5,45 (dd, 2H); 6,04 (s, 1H); 7,34 (s, 1H); 8,14 (s, 1H); 8,38 (s, 1H).

IR (KBr) : 870, 1058, 1208, 1280, 1477, 1593, 1655, 1749 cm^{-1} .

3.h. (+)-chlorid 1-[(5R)-9-chlor-5-ethyl-5-hydroxy-10-methyl-3,15-dioxo-4,5,13,15-tetrahydro-1H,3H-oxepino[3',4':6,7]indolizino[1,2-c]chinolin-12-ylmethyl]-4-methyl-hexahdropyridinia:

Směs produktu etapy 3.9 (2,3 g; 7,7 mmolu) a absolutního ethanolu (300 ml) se podrobí po dobu 2 minut ultrasonikaci. Vzniklá mléčná suspenze se míchá a zpracovává kyselinou chlorovodíkovou (roztok 1N; 13,2 ml; 13,2 mmolu) pro získání jasně žlutého roztoku, který v klidu vytváří precipitát gelovitého typu. Precipitát se odebere filtrací Büchnerovou nálevkou a promývá postupně ethanolem a etherem, potom se suší za sníženého tlaku pro získání produktu z názvu (2,1 g; 85 % výtěžek).

^1H NMR (DMSO) : 0,87 (m, 6H); 1,59 (m, 5H); 1,84 (q, 2H); 2,64 (s, 3H); 3,28 (dd, 2H); 3,45 (s, 2H); 4,93 (s, 2H); 5,47 (dd, 2H); 5,61 (s, 2H); 6,04 (široký pík, 1H); 7,41 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,63 (s, 1H); 10,30 (široký pík, 1H).

IR (KBr) : 1043, 1212, 1479, 1585, 1655, 1751 cm^{-1} .

Farmakologická studie produktů podle předloženého vynálezu

Test působení na buněčnou proliferaci.

V této studii bylo použito pět nádorových buněčných linií: SW620 (lidský adenokarcinom trakčníku), OVCAR-5 (lidský adenokarcinom vaječníku), PC-3 a DU 145 (lidské buněčné linie prostaty) a NCI-H69 (lidský adenokarcinom plic). Tyto linie pocházely z NCI/Frederick Cancer Research and Development Center (Frederick, MD). Linie byly kultivovány v úplném médiu obsahujícím médium RMPI-1640 obohacené 10 % fetálního telecího séra a 2 mM L-glutaminu. Buněčné linie byly inkubovány při teplotě 37 °C ve vlhké atmosféře s 5 % CO_2 . Slepené buňky byly rozděleny zpracováním roztokem 0,25 % trypsinu a 0,2% EDTA (Worthington Biochemical Corp.,

02.05.00

Freehold, NJ) po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Počítání buněk se provádělo pomocí počítače Coulter 21 (Coulter Corp., Hialeah, FL). Životaschopnost byla hodnocena obarvením buněk propidiumjodidem a potom počítáním průtokovým cytometrem EPICS Elite (Coulter).

Sloučenina podle příkladů 2 a 3 určené k testování byly rozpuštěny na 5 mM v roztoku N,N-dimethylacetaminu (DMA, Aldrich). Další ředění byla prováděna kultivačním médiem. Konečné testované molární koncentrace byly: $1 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-7}$, $4 \cdot 10^{-8}$, $8 \cdot 10^{-9}$, $1,6 \cdot 10^{-9}$, $3,2 \cdot 10^{-10}$, $6,4 \cdot 10^{-11}$, $1,28 \cdot 10^{-11}$, $2,56 \cdot 10^{-12}$, a $5,12 \cdot 10^{-13}$. Každá koncentrace byla testována v osmi jamkách. Kontrola na vliv DMA byla prováděna u všech buněčných linií. Z těchto kontrol bylo zjištěno, že maximální použitá koncentrace (0,02 %) DMA neměla účinek. Doxorubicin s koncentracemi $1 \cdot 10^{-7}$ M a $2 \cdot 10^{-7}$ M byl používán jako pozitivní kontrola.

Buňky byly naočkovány v množství $5 \cdot 10^3$ buněk na jamku na mikrotitrační destičku s 96 jamkami (Costar Corporation, Cambridge, MA). Buňky byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C, aby se umožnilo započetí buněčného množení. Sloučenina podle příkladů 2 a 3, určené k testování, byly potom přidány ve výše uvedených koncentracích a buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C ve vlhké atmosféře s obsahem 5 % CO₂ po dobu 3 dní pro spojené buňky (SW620, OVCAR-5, PC-3 a DU 145) a po dobu 5 dní pro buňky v suspenzi (NCI-H69).

Spojené buňky byly testovány způsobem SRB (který popsali L.V. Rubenstein, R.H. Shoemaker, K.D. Paull, R.M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D.A. Scudiero, A. Monks, and M.R. Boyd

"Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines", *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**:1113-1118, 1990). Po třech dnech inkubace byl supernatant odebrán a bylo přidáno 200 μ l média RPMI-1640 bez telecího fetálního séra.

Buňky byly fixovány přidáním 50 μ l kyseliny trichloroctové 50 % (výsledná koncentrace kyseliny trichloroctové 10 %) a inkubovány při teplotě 4 °C po dobu 1 hodiny. Jamky potom byly promývány pětkrát vodou a potom obarveny 50 μ l roztoku 0,4 % sulforhodaminu B (SRB, Sigma) v 1 % kyselině octové při teplotě okolí po dobu 10 minut. Barvivo bylo rozpuštěno v 100 μ l TRIS 10 mM, pH 10 po dobu zhruba 5 minut za míchání, mikrodestičky byly odečítány spektrofotometrií při 570 nm.

Buňky v suspenzi byly testovány způsobem XTT (který popsali D.A. Scudiero, R.H. Shoemaker, K.D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D. Seniff a M.R. Boyd: "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines", *Cancer Research* **48**:4821-4833, 1988). Po inkubaci v přítomnosti testovaných sloučenin podle příkladů 2 a 3 byl ke kulturám přidán XTT [sodná sůl 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilidu, (Sigma)] a methosulfát fenazinu (PMS, Sigma) v roztoku ve fosfátově pufovaném solném roztoku a buňky byly inkubovány po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Konečné koncentrace XTT a PMS byly 50

respektive 0,38 μg na jamku. Vytváření formazanu bylo zastaveno přidáním 10 μl 10 % dodecylsulfátu sodného (Sigma) a absorpce byla odečítána spektrofotometricky při 450 nm s referenčním filtrem při 600-650 nm.

Výsledky

Molární koncentrace sloučenin podle příkladů 2 a 3 inhibující na 50% buněčnou proliferaci jsou uvedeny v následující tabulce:

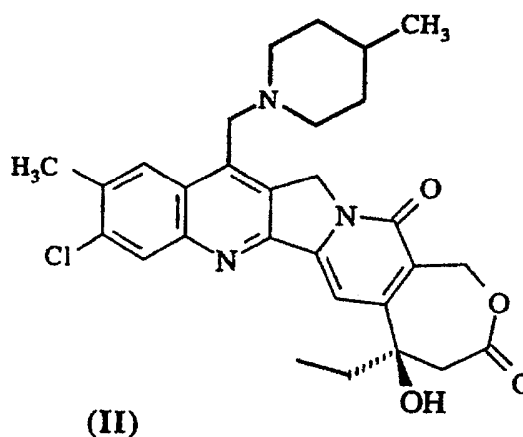
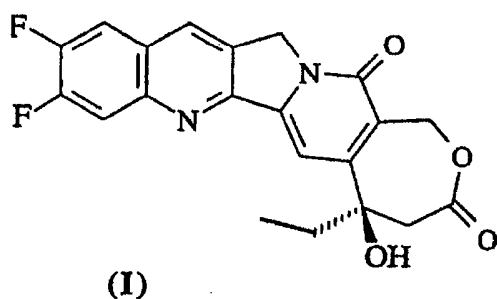
Buněčná linie	Příklad 2	Příklad 3
SW620	$5 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-8}$
OVCAR-5	$8 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-8}$
PC-3	$1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$
DU 145	$1 \cdot 10^{-9}$	$7 \cdot 10^{-9}$
NCI-H69	$3 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-9}$

Zastupuje:

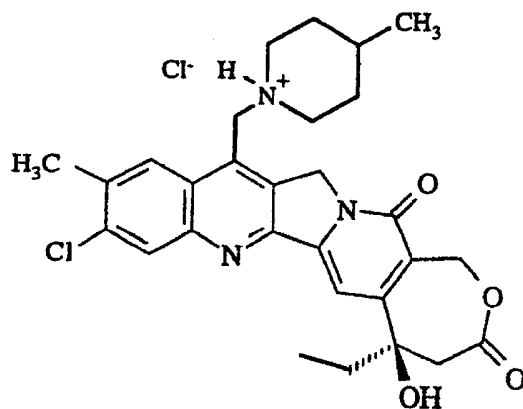
Dr. Otakar Švorčík

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Produkt **vyznačující se tím**, že má jeden z následujících obecných vzorců (I) nebo (II)

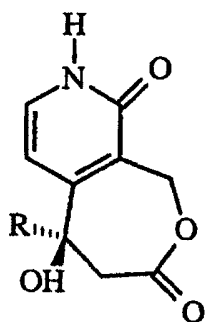


nebo že se jedná o sůl sloučeniny obecného vzorce (II) jako je například sloučenina obecného vzorce (III)



(III)

2. Produkt obecného vzorce M



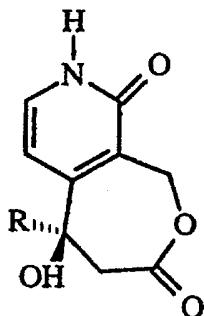
M

ve kterém R představuje přímý nebo rozvětvený alkylový zbytek obsahující od 1 do 10 atomů uhlíku, jako nový průmyslový produkt.

3. Produkt podle nároku 2, **vyznačující se tím,** že R

představuje ethylový zbytek.

4. Způsob přípravy produktu obecného vzorce M

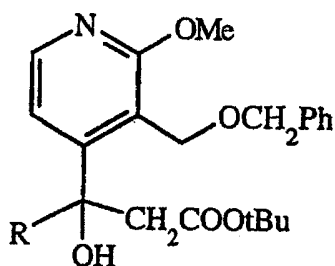


M

ve kterém R představuje přímý nebo rozvětvený alkylový zbytek obsahující od 1 do 10 atomů uhlíku,

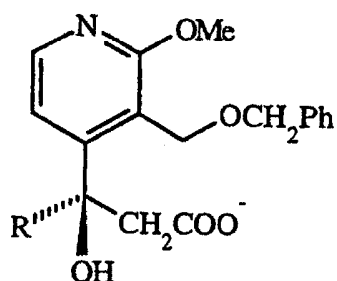
vyznačující se tím, že zahrnuje postupně následující kroky:

- zpracovávání racemického t-butylesteru obecného vzorce



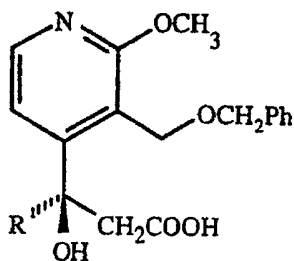
kyselinou trifluorooctovou po dobu 18 hodin při teplotě okolí pro získání odpovídající karboxylové kyseliny;

- následné zahřívání v isopropylalkoholu chinidinové soli kyseliny získané v předchozím kroku na teplotu vyšší než 30 °C, s výhodou přibližně 50 °C, následované ochlazením reakční směsi až na teplotu okolí, takže jeden z enantiomerů výše uvedené kyseliny krystalizuje, zatímco sůl druhého enantiomeru, jehož aniont má obecný vzorec



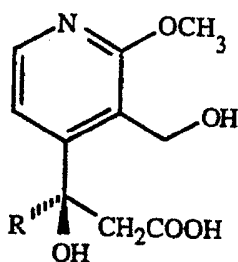
zůstává v roztoku;

- koncentrace isopropylalkoholového roztoku soli enantiomeru, který nekrystalizoval, a jeho zpracování kyselinou chlorovodíkovou a míchání, pro vytvoření sloučeniny obecného vzorce A



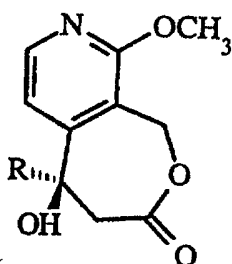
A

- následné uvedení sloučeniny obecného vzorce A do kontaktu s vlhkým paládiem na uhlí, potom přidání mravenčanu amonného nebo kyseliny mravenčí do směsi pro získání debenzylovaného produktu obecného vzorce B



B

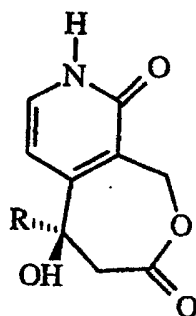
- dále cyklizace sloučeniny obecného vzorce B působením dicyklohexylkarbodiimidu pro získání laktonové sloučeniny obecného vzorce C



C

- nakonec transformace skupiny $-OCH_3$ laktonové sloučeniny obecného vzorce C na karbonyl působením jodidu sodného a

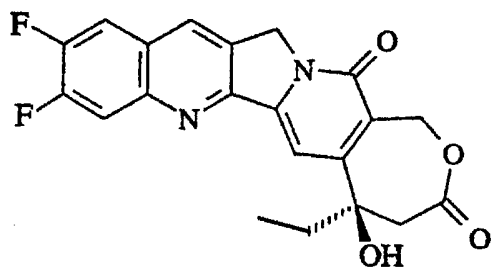
trimethylsilylchloridu pro získání sloučeniny obecného vzorce M



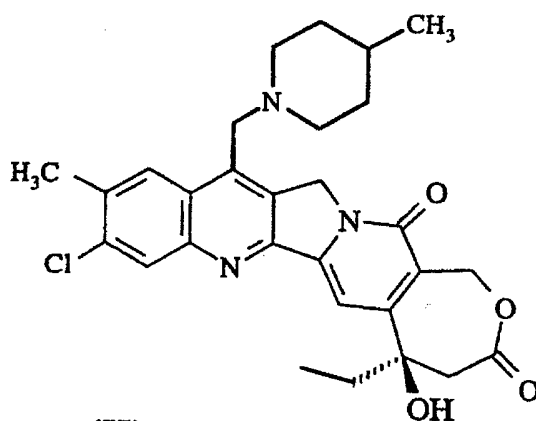
M

5. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že R představuje ethylovou skupinu.

6. Produkt pro použití jako léčivo, **vyznačující se tím**, že má jeden z obecných vzorců (I) nebo (II)

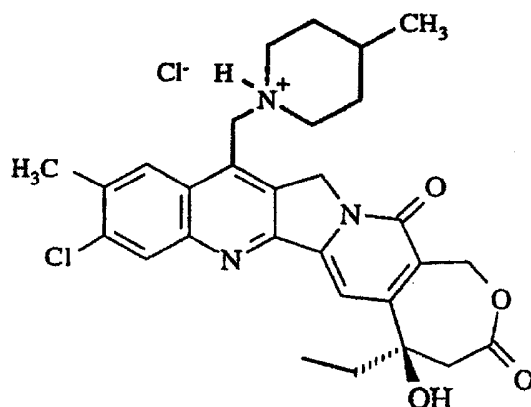


(I)



(II)

nebo že se jedná o adiční sůl s anorganickou nebo organickou farmaceuticky přijatelnou kyselinou sloučeniny obecného vzorce (II) jako je například sloučenina obecného vzorce (III)



(III)

nebo jakákoli jejich směs.

7. Farmaceutická kompozice obsahující jako účinnou složku alespoň jednu ze sloučenin podle nároku 6.

8. Použití sloučeniny podle nároku 1 pro přípravu protinádorových léčiv.

9. Použití sloučeniny podle nároku 1 pro přípravu antivirálních léčiv.

10. Použití sloučeniny podle nároku 1 pro přípravu antiparazitárních léčiv.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík