

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235255**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **408239**

(22) Data zgłoszenia: **19.05.2014**

(51) Int. Cl.

C07C 50/18 (2006.01)

C07D 241/04 (2006.01)

C07D 295/033 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Nowe analogi 9,10-antrachinonu zawierające piperazyny podstawione różnymi grupami funkcyjnymi oraz sposób ich otrzymywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.11.2015 BUP 24/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
15.06.2020 WUP 07/20

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ELŻBIETA MAGDALENA CZACZYK,
Pruszcz Gdański, PL

PAWEŁ LUCJAN NIEDZIAŁKOWSKI,
Człuchów, PL

TADEUSZ OSSOWSKI, Gdańsk, PL

JOANNA WIETRZYK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Małgorzata Matyka

PL 235255 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe analogi 9,10-antrachinonu zawierające piperazyny podstawione różnymi grupami funkcyjnymi oraz sposób ich otrzymywania. Wynalazek rozwiązuje zagadnienia opracowania nowych środków o aktywności przeciwnowotworowej opartych na bazie 9,10-antrachinonu.

Choroby nowotworowe stały się główną przyczyną umieralności, szczególnie w XXI wieku głównie dlatego, że są one bardzo trudne do zdiagnozowania i wyleczenia. Związki posiadające w swej strukturze szkielet 9,10-antrachinonu zaliczane są do najliczniejszej grupy antybiotyków nazywanych antracyklinami, bądź antybiotykami antrachinonowymi.

Wśród znanych i stosowanych jako leki pochodnych antrachinonów można wyróżnić antracykliny takie zwłaszcza jak *doksorubicyna*, *daunorubicyna*, *idarubicyna*, *epirubicyna*, *aklarubicyna*, *mitoksantron* i ich syntetyczne pochodne.

Leki te stosowane są głównie w terapii w leczeniu ostrych białaczek, chłoniaków i różnych guzów litych, w tym raka piersi, płuc, tarczycy, jajnika oraz raka tkanek miękkich (Zajca A., Gorczyca M. Chemia leków. PZWL, Warszawa., 1999).

Antybiotyki antracyklinowe są najliczniejszą grupą antybiotyków cytostatycznych hamujących podział komórek stosowanych najczęściej w terapii przeciwnowotworowej.

W literaturze przedmiotu zaproponowano kilka różnych mechanizmów wyjaśniających biologiczne działanie tych antybiotyków. Pierwszy z nich oparty jest na interkalacji, czyli włączaniu chemioterapeutyku pomiędzy dwie sąsiadujące ze sobą pary zasad w DNA. Interkalacja w helisę DNA może spowodować jej wydłużenie lub pęknięcie oraz zmianę właściwości biochemicznych, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania zdolności do replikacji i transkrypcji (F. Gieseler, H. Biersack, T. Brieden, J. Manderscheid, V. Nübler, Annals of Hematology, 1994, 69,13–17).

Antybiotyki antracyklinowe są również inhibitorami topoizomerazy I i II. Topoizomerazy I i II są grupą homodimerycznych enzymów chromosomalnych odgrywających zasadniczą rolę w utrzymaniu fizjologicznej funkcji DNA.

Enzymy te katalizują proces relaksacji cząsteczek DNA z chromosomów przez spowodowanie okresowo powtarzających się tzw. pęknięć, przerw w jednej lub dwóch niciach DNA, co ma wpływ na prawidłowy proces replikacji i transkrypcji (Omyła-Staszewska J., Deptała A. Współczesna onkologia, 2003, 7, 45–53).

Dodatkowo wykazano w znanych doniesieniach literaturowych, że związki te związane z błoną komórkową mogą mieć istotny wpływ na płynność błon komórkowych, transport jonów, a także zakłócają równowagę procesów biochemicznych w komórce. Właściwości redoks antybiotyków antracyklinowych mogą doprowadzić do wytworzenia wolnych rodników lub rodników hydroksylowych, które powodują uszkodzenie DNA, co w konsekwencji prowadzi do zablokowania procesu transkrypcji (Frederick C. A., Williams L. D., Ughetto G., Marel G. A., Boom J. H., Rich A., Wang A. H. Biochemistry, 1990, 29, 2538–2549).

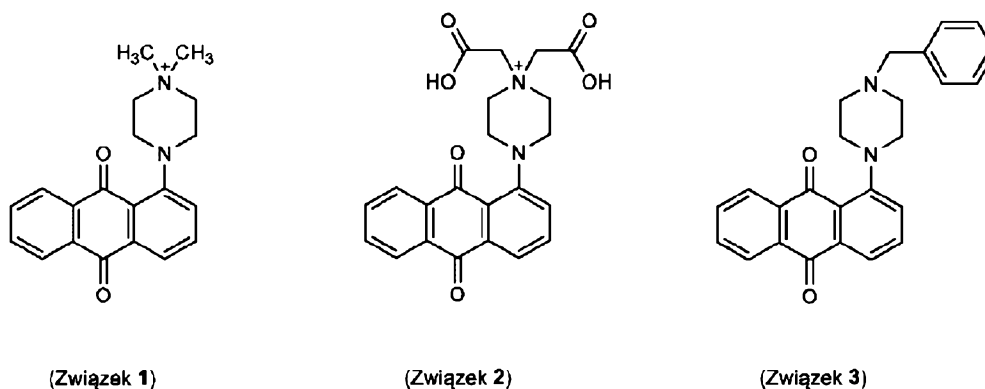
Znane i opisane rozwiązania środków o aktywności przeciwnowotworowej i sposobów ich otrzymywania wykazują następujące wady.

Wadą antybiotyków antracyklinowych jest ich kardiotosycywność oraz obserwowany rozwój oporności w komórkach nowotworowych występujący obok innych działań niepożądanych. Zaburzenia w krążeniu przypisuje się produktom powstającym podczas biotransformacji antracyklin, szczególnie przy redukcji ugrupowań chinonowych do hydrochinonowych. Powstające rodniki tlenowe oraz rodniki hydroksylowe powodują tworzenie struktur nadtlennych w lipidach, a ich stopniowy rozkład prowadzi do związków działających uszkodzająco na mięsień sercowy.

Dlatego też, oczywistą potrzebą współczesnej medycyny jest poszukiwanie nowych związków, potencjalnych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych.

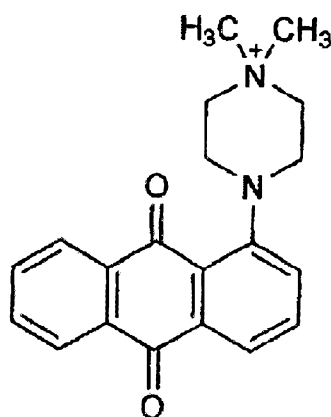
Wynalazek opiera się na otrzymaniu pochodnych 9,10-antrachinonu będących czwartorzędowymi solami amoniowymi oraz pochodną 9,10-antrachinonu zawierającą grupę benzyłową.

Pierwszym związkiem jest 1-(4,4-dimetylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon (Związek 1). Kolejny związek to 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon (Związek 2) oraz 1-(4-benzylpiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon (Związek 3). Wszystkie związki zawierają w swojej strukturze cząsteczkę piperazyny, na bazie której zostały zsyntezowane. Pochodne charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością przeciwnowotworową w zależności od podstawników.

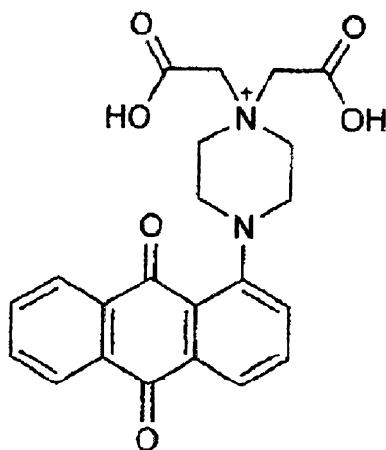


Rysunek 1. Struktury związków chemicznych będących przedmiotem zgłoszenia.

Przedmiotem wynalazku jest analog antrachinonu znamienny tym, że stanowi go 1-(4,4-dimetylo-piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon o wzorze:



Przedmiotem wynalazku jest również analog antrachinonu znamienny tym, że stanowi go 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon o wzorze:



Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania analogu antrachinonu 1-(4,4-dimetylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon, gdzie przeprowadza się reakcję w tetrahydrofuranie początkowo w temperaturze 100°C przez 8 h, a następnie w temperaturze 60°C przez kolejne 40 h, z tak otrzymanej mieszaniny poreakcyjnej usuwa się rozpuszczalnik na wyparce próżniowej, pozostałość przemycza się toluenem i ponownie usuwa rozpuszczalnik, a suchą pozostałość rozpuszcza się w wodzie i przemycza się heksanem (2 x 200 ml), po którym mieszaninę otrzymanych w wyniku reakcji chemicznej związków

izoluje się z warstwy wodnej stosując jako metodę rozdzielczą wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych w skali preparatywnej.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania analogu antrachinonu 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu, gdzie przeprowadza się reakcję chemiczną 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu z kwasem bromooctowym w toluenie w temperaturze 100°C, po upływie 72 h otrzymuje się 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon, po czym z mieszaniny poreakcyjnej usuwa się toluen na wyparce próżniowej, a suchą pozostałość rozpuszcza w mieszaninie chlorku metylenu, a otrzymany związek izoluje się z mieszaniny stosując jako metodę rozdzielczą chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent początkowo sam chlorek metylenu a następnie układ chlorek metylenu i metanol ze wzrastającym gradientem metanolu i uzyskuje produkt z wydajnością około 85%.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania analogu antrachinonu 1-(4-benzylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu, gdzie wykorzystuje się jako substraty 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu i bromek benzylu, przeprowadzając reakcję w bezwodnym etanolu w temperaturze pokojowej w czasie 72 h, z tak otrzymanej mieszaniny poreakcyjnej usuwa się etanol na wyparce próżniowej, pozostałość rozpuszcza się w chlorku metylenu i przemywa się wodą (3 x 200 ml), a otrzymaną warstwę organiczną suszy się bezwodnym MgSO₄ i odparowuje rozpuszczalnik na wyparce próżniowej, po czym mieszaninę otrzymanych w wyniku reakcji chemicznej związków izoluje się stosując jako metodę rozdzielczą chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent początkowo sam chlorek metylenu a następnie układ chlorek metylenu i metanol ze wzrastającym gradientem metanolu, uzyskując produkt z wydajnością około 75%.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, nie stanowiące jego ograniczenia:

Wszystkie otrzymane związki chemiczne scharakteryzowano technikami spektroskopowymi i masowymi. Poniżej przedstawiono analizy masowe MALDI, IR oraz HPLC. Dla wszystkich związków wykonano analizy wykorzystując zestaw analityczny HPLC firmy Shimadzu, używając kolumny (firmy Phenomenex Luna C8(2), 150 x 3 mm, o średnicy ziaren sorbentu 5 µm i wielkości porów 100 Å), stosując przepływ 1 ml/min w gradiencie rozpuszczalników (A = H₂O + 0,1% TFA, B = ACN + 0,1% TFA) przy długości fali 254 nm.

Związek (1) 1-(4,4-dimetylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon

MALDI - TOF MS: m/z 321,2 [M], (MW = 321,40).

IR (KBr) (cm⁻¹): 3665, 3430, 2927, 2857, 1681, 1584, 1445, 1401, 1377, 1322, 1274, 1251, 1210, 1136, 1038, 1014, 966, 931, 914, 845, 803, 760, 725, 712, 665

RP-HPLC: Rt = 8,718 - gradient 0-100% (A - B) w 15 min

Związek (2) 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon

MALDI - TOF MS: m/z 409,2 [M], (MW = 409,42).

IR (KBr) (cm⁻¹): 3408, 2927, 2852, 2495, 1740, 1661, 1585, 1496, 1458, 1428, 1360, 1323, 1280, 1207, 1162, 1086, 1042, 1028, 984, 922, 911, 898, 885, 836, 805, 734, 706, 660, 550. RP-HPLC: Rt = 11,369 gradient 0-100% (A - B) w 20 min

Związek (3) 1-(4-benzylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon

MALDI - TOF MS: m/z 383,0 [M+H]⁺, (MW = 382,45).

IR (KBr) (cm⁻¹): 3425, 3030, 3006, 2936, 2879, 2821, 2770, 1731, 1664, 1578, 1492, 1469, 1444, 1423, 1378, 1313, 1263, 1217, 1177, 1155, 1136, 1119, 1077, 1034, 1004, 922, 902, 833, 804, 745, 708, 699, 662, 609, 561, 468.

RP-HPLC: Rt = 10,207 gradient 0-100% (A - B) w 15 min

Wynalezione związki cechują się wysoką aktywnością przeciwnowotworową z zachowaniem niskiej toksyczności na różnych poziomach, którą uzyskano w pierwszej na zasadzie przyłączenia grup metylowych oraz karboksylowych do pierścienia heterocyklicznego i w następnej kolejności przez przyłączenie do cząsteczki 9,10-antrachinonu fragment piperazyny zawierającego podstawnik benzyłowy.

Otrzymywanie soli 1-(4,4-dimetylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon według wynalazku polega na wykorzystaniu 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu, jodku metylu i wodoru sodu jako substratów, na których przeprowadza się reakcję w tetrahydrofuranie początkowo w temperaturze 100°C przez 8 h a następnie w temperaturze 60°C przez kolejne 40 h. Z mieszaniny poreakcyjnej usuwa się rozpuszczalnik na wyparce próżniowej, pozostałość przemywa się toluenem i ponownie usuwa rozpuszczalnik. Suchą pozostałość rozpuszcza się w wodzie i przemywa się heksanem (2 x 200 ml). Mieszaninę otrzymanych w wyniku reakcji chemicznej związków izoluje się z warstwy wodnej stosując jako metodę rozdzielczą wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych w skali preparatywnej.

(RP-HPLC), kolumna Vydac C18 (300 Å, 10 µm, 250 x 22 mm), w gradiencie 0–100% acetonitrylu, z zastosowaniem dynamiki przepływu 10 ml/min i detekcją UV przy 254 nm. Postępując w ten sposób uzyskuje się produkt z wydajnością około 80%, 1-(4,4-dimetylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon.

W innej odmianie postępowania sposobem według wynalazku można również otrzymać wynaleziony związek stosując jako środek metylujący 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon i/albo wszystkie dostępne handlowo czynniki metylujące.

W wyniku przeprowadzenia reakcji chemicznej 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu z kwasem bromooctowym w toluenie w temperaturze 100°C, po upływie 72 h otrzymuje się 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon – związek **2**. Następnie z mieszaniny poreakcyjnej usuwa się toluen na wyparce próżniowej, a suchą pozostałość rozpuszcza w mieszaninie chlorku metylenu. Związek izoluje się z mieszaniny stosując jako metodę rozdziału chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, oraz stosując jako eluent początkowo sam chlorek metylenu, a następnie układ chlorek metylenu i metanol ze wzrastającym gradientem metanolu, uzyskując produkt z wydajnością około 85%.

Postępując sposobem według wynalazku 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon – związek **2**, można również otrzymać przeprowadzając reakcję chemiczną w innych rozpuszczalnikach. Jako substratu można użyć także wszystkie halogenopochodne kwasu octowego, a także ich estry. W przypadku zastosowania estrów pochodnych halogenopochodnych kwasu octowego niezbędne jest przeprowadzenie reakcji hydrolizy.

Postępując sposobem według wynalazku 1-(4-benzylpiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon – związek **3** otrzymuje się wykorzystując jako substraty 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu i bromek benzylu. Reakcję przeprowadza się w bezwodnym etanolu w temperaturze pokojowej w czasie 72 h. Z mieszaniny poreakcyjnej usuwa się etanol na wyparce próżniowej, pozostałość rozpuszcza się w chlorku metylenu i przemywa się wodą (3 x 200 ml). Otrzymaną warstwę organiczną suszy się bezwodnym MgSO₄ i odparowuje się rozpuszczalnik na wyparce próżniowej. Mieszaninę otrzymanych w wyniku reakcji chemicznej związków izoluje się stosując jako metodę rozdziału chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent początkowo sam chlorek metylenu, a następnie układ chlorek metylenu i metanol ze wzrastającym gradientem metanolu, uzyskując produkt z wydajnością około 75%.

Związki chemiczne według wynalazku spełniają założone zadania i cechują się następującymi podstawowymi zaletami.

Wszystkie wynalezione związki chemiczne wykazują aktywność cytostatyczną wobec następujących linii komórek nowotworowych: ostrej białaczki promielocytarnej ludzkiej HL-60, ostrej białaczki promielocytarnej ludzkiej odpornej na mitoksantron HL-60/MX2, ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego LoVo, ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego opornego na doksorubicynę LoVo/DX.

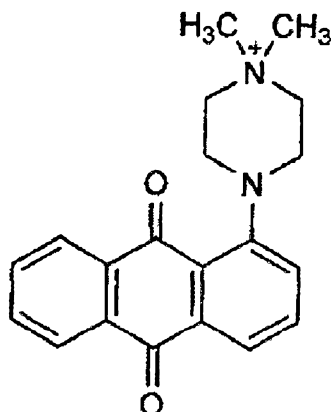
Wynalezione pochodne 9,10-antrachinonu zostały przebadane pod kątem aktywności cytostaticznej również wobec komórek prawidłowych morfologicznie, gdzie do badań zostały użyte komórki prawidłowe mysich fibroblastów BALB/3T3.

Aktywność cytotoksyczną testowanych związków wobec komórek linii HL-60 oraz HL-60/MX2 oceniono przy użyciu testu MTT, mierzącego zahamowanie proliferacji komórek docelowych w 96-godzinnej hodowli *in vitro* (Marcinkowska et al. J. Steroid Biochem. Mol. 67:71-78, 1998). Natomiast w przypadku komórek linii B16, Hs 294T, LoVo, LoVo/DX oraz Balb/3T3 do oceny aktywności cytostaticznej testowanych związków użyto testu SRB mierzącego zahamowanie proliferacji komórek docelowych w 96-godzinnej hodowli *in vitro* [Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst., 82:1107–1112, 1990]. W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia preparatu nanoszono w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano co najmniej trzy razy. Dla każdego z badanych związków zostało wyznaczone stężenie związku powodujące zahamowanie proliferacji komórek w 50% (IC₅₀).

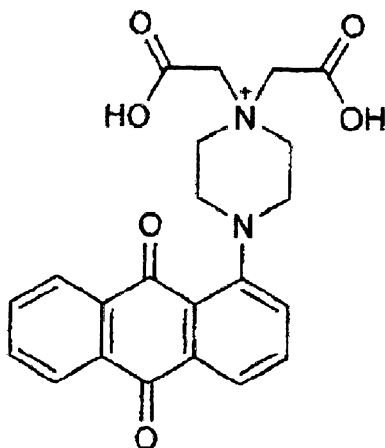
Z przeprowadzonych badań wynika, że wynaleziona seria nowych związków otrzymywanych charakterystycznym sposobem, wykazuje wysoką aktywność antyproliferacyjną, a żaden ze związków nie wykazuje lekooporności. Ponadto wszystkie związki wykazują stosunkowo niską toksyczność wobec komórek prawidłowych mysich fibroblastów BALB/3T3, a jednocześnie dość silnie działają w stosunku do badanych linii komórkowych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Analog antrachinonu, **znamienny tym**, że stanowi go 1-(4,4-dimetylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon o wzorze:



2. Analog antrachinonu, **znamienny tym**, że stanowi go 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon o wzorze:



3. Sposób otrzymywania analogu antrachinonu, **znamienny tym**, że w celu uzyskania 1-(4,4-dimetylopiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu, przeprowadza się reakcję w tetrahydrofuranie początkowo w temperaturze 100°C przez 8 h, a następnie w temperaturze 60°C przez kolejne 40 h, z tak otrzymanej mieszaniny poreakcyjnej usuwa się rozpuszczalnik na wyparce próżniowej, pozostałość przemywa się toluenem i ponownie usuwa rozpuszczalnik, a suchą pozostałość rozpuszcza się w wodzie i przemywa się heksanem (2 x 200 ml), po którym mieszaninę otrzymanych w wyniku reakcji chemicznej związków izoluje się z warstwy wodnej stosując jako metodę rozdziału wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych w skali preparatywnej.
4. Sposób otrzymywania analogu antrachinonu, **znamienny tym**, że w celu uzyskania 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu, przeprowadza się reakcję chemiczną 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu z kwasem bromooctowym w toluenie w temperaturze 100°C, po upływie 72 h otrzymuje się 1-(4,4-di(karboksymetylo)piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinon, po czym z mieszaniny poreakcyjnej usuwa się toluen na wyparce próżniowej, a suchą pozostałość rozpuszcza w mieszaninie chlorku metylenu, a otrzymany związek izoluje się z mieszaniny stosując jako metodę rozdziału chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent początkowo sam chlorek metylenu a następnie układ chlorek metylenu i metanol ze wzrastającym gradientem metanolu i uzyskuje produkt z wydajnością około 85%.

5. Sposób otrzymywania analogu antrachinonu, **znamienny tym**, że w celu uzyskania 1-(4-benzylpiperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu, wykorzystuje się jako substraty 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu i bromek benzylu, przeprowadzając reakcję w bezwodnym etanolu w temperaturze pokojowej w czasie 72 h, z tak otrzymanej mieszaniny poreakcyjnej usuwa się etanol na wyparce próżniowej, pozostałość rozpuszcza się w chlorku metylenu i przemywa się wodą (3 x 200 ml), a otrzymaną warstwę organiczną suszy się bezwodnym MgSO_4 i odparowuje rozpuszczalnik na wyparce próżniowej, po czym mieszaninę otrzymanych w wyniku reakcji chemicznej związków izoluje się stosując jako metodę rozdziálu chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent początkowo sam chlorek metylenu a następnie układ chlorek metylenu i metanol ze wzrastającym gradientem metanolu, uzyskując produkt z wydajnością około 75%.