

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 294 365

(13) Druh dokumentu:

## B6

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **1998-4010**  
(22) Přihlášeno: **21.05.1997**  
(30) Právo přednosti: **07.06.1996 IT 1996MI/1168**  
(40) Zveřejněno: **12.05.1999**  
(**Věstník č. 05/1999**)  
(47) Uděleno: **12.10.04**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.12.2004**  
(**Věstník č. 12/2004**)  
(86) PCT číslo: **PCT/EP1997/002577**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/047577**

(51) Int. Cl. :<sup>7</sup>

C 07 C 49/755  
C 07 C 323/22  
C 07 D 265/34  
A 61 K 31/122  
A 61 K 31/535  
A 61 P 35/00  
A 61 P 29/00  
A 61 P 19/02

(73) Majitel patentu:

INDENA S. P. A., Milano, IT

(72) Původce:

Bombardelli Ezio, Milano, IT

(74) Zástupce:

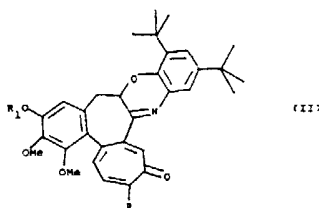
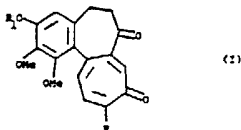
JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11196

(54) Název vynálezu:

**Deriváty kolchicinu, způsob výroby a farmaceutický prostředek**

(57) Anotace:

Deriváty kolchicinu obecných vzorců I a II, v nichž R znamená methoxy- nebo methylthioskupinu a R<sub>1</sub> znamená methylovou, izopropylovou, cyklopentylovou nebo sukcinyllovou skupinu, přičemž v případě, když R znamená methoxyskupinu, má R<sub>1</sub> význam odlišný od methylové skupiny, mají antiproliferativní, antineoplastický a protizánětlivý účinek, a je možno je ve formě farmaceutického prostředku, který rovněž tvoří součást řešení, použít k léčení. Popsán je rovněž způsob výroby nových derivátů kolchicinu.



CZ 294365 B6

**Deriváty kolchicinu, způsob výroby a farmaceutický prostředek**Oblast techniky

5

Vynález se týká kolchicinových derivátů s antiproliferativním, antineoplastickým a protizánětlivým účinkem, způsobu výroby těchto látek a farmaceutického prostředku, který tyto látky obsahuje.

10

Dosavadní stav techniky

Kolchicin je známý pseudoalkaloid, široce užívaný velmi dlouhou dobu při léčení dny, při tomto použití působí velmi rychle a specificky, nemůže však být používán po delší dobu vzhledem ke své toxicitě. Kolchicinový derivát thiolkolchikosin se široce užívá při léčení kontraktur a zánětlivých stavů kosterních svalů. Mimoto je kolchicin velmi účinná protinádorová látka, která působí blokováním tvorby mitotického vřetena v průběhu dělení buněk. Toto hledisko bylo podrobeno podrobným zkouškám, byly zkoumány antineoplastická účinnost příbuzných látek a k uvedenému účelu byla připravena velká řada kolchicinových derivátů. Kolchicin jako takový a řada jeho derivátů nemohou být užívány klinicky vzhledem k vysoké toxicitě a tím příliš vysokému riziku ve srovnání s příznivým účinkem. Pouze jeden kolchicinový derivát demokolcin se v některých případech užívá k léčení určitých forem leukemie.

Bylo by zapotřebí mít k dispozici antineoplastické látky, u nichž by bylo sníženo riziko ve srovnání s příznivým účinkem, to znamená, že by antineoplastické látky měly mít vysokou léčebnou účinnost a malé nebo žádné vedlejší účinky.

Další problém, spojený s používáním antineoplastických látek spočívá v odolnosti k použitému derivátu u specifických fenotypů.

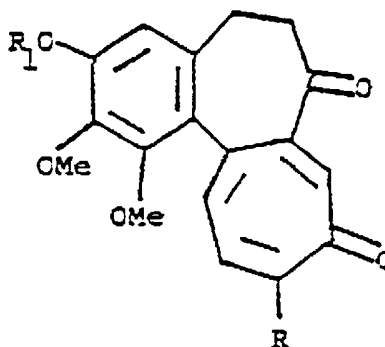
30

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že některé kolchicinové deriváty mají vysokou cytotoxickou účinnost jak na nádorové buňky, tak na odpovídající odolnost fenotyp MDR.

Bylo zjištěno, že tyto látky účinně indukují apoptosu, přičemž jejich účinek je významně vyšší než účinek známých látek. Vzhledem k jejich lipofilním vlastnostem jsou uvedené látky zvláště dobře biologicky dostupné po perorálním podání, je však možno je podávat také parenterálně i místně.

40 Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří deriváty kolchicinu obecného vzorce I



(I),

kde

R znamená methoxyskupinu nebo methylthioskupinu,

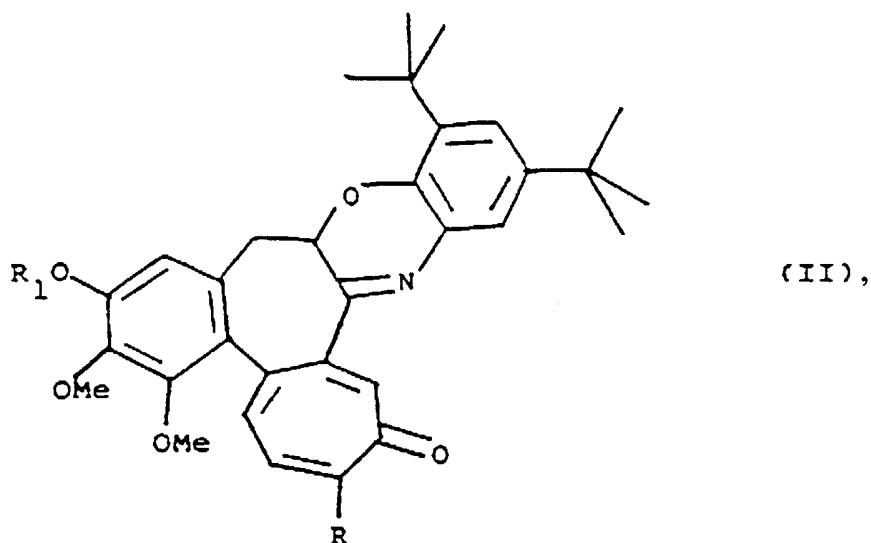
- 5 R<sub>1</sub> znamená methyl, izopropyl, cyklopentyl nebo sukcinyl, přičemž v případě, že R znamená methoxyskupinu, má R<sub>1</sub> význam, odlišný od methylové skupiny a

Me znamená methyl.

- 10 Deriváty obecného vzorce I je možno připravit tak, že se vychází z přírodních látek kolchicinu nebo thiokolchicinu nebo z jejich C3-derivátů, běžně dodávaných nebo získatelných postupy, uvedenými v literatuře. Jak je v literatuře popsáno, je možno C3-deriváty připravit tak, že se 3-O-dimethylderivát nechá reagovat s alkyl- nebo acylhalogenidem. Hydrolyza těchto sloučenin působením vodných roztoků silných anorganických kyselin dovoluje selektivně připravit 15 změnami teploty a reakční doby odpovídající N-deacetylové deriváty. Deacetylaci thiokolchicinu nebo jeho C3-derivátu je možno uskutečnit tak, že se na výchozí látku působí kyselinou, v případě thiokolchicinu je možno hydrolyzou s použitím halogenovaných kyselin nebo s výhodou působením 20% roztoku kyseliny sírové na 120 hodin získat N-deacetylthiokolchicin a 3-demethyl-N-deacetylthiokolchicin v téměř kvantitativním výtěžku.

- 20 N-deacetylové deriváty je možno nechat reagovat s 4-formyl-1-methylpyridinium-p-toluen-sulfonátem a 1,8-diazabicyklo/5.4.0/undec-7-enem DBU, čímž se získají deriváty obecného vzorce I.

- 25 V případě, že se N-deacetylové deriváty nechají reagovat s 2,3-di-*tert*-butyl-1,2-benzo-chinonem, získají se sloučeniny obecného vzorce II



kde R a R<sub>1</sub> mají svrchu uvedený význam.

- 30 Sloučeniny obecného vzorce II rovněž tvoří součást podstaty vynálezu.

Deriváty podle vynálezu mají význačný antineoplastický účinek *in vitro* i *in vivo*.

- 35 V následující tabulce je shrnuta antimitotická účinnost derivátů podle vynálezu na pěstovaných explantátech nádoru mléčné žlázy, a to normálních (MCF-7) nebo rezistentních na adriamycin i vinblastin (MCF-7-ADR), účinnost je srovnána s účinností kolchicinu a taxolu.

Tabulka

sloučenina	IC <sub>50</sub> (nM)		
	MCF7-ADR	MCF-7	MCF7-ADR/MCF7
Kolchicin	12,000	1,8	6,600
sloučenina Ia	15	6,2	2,4
sloučenina Ib	40	23	1,7
sloučenina IIa	52	17	3,0
Taxol	2,400	2,3	1,043

5 Z tabulky je zřejmé, že deriváty podle vynálezu jsou významně výhodnější u rezistentních buněčných linií, které jsou v současné době hlavním terčem působení cytotoxických farmaceutických prostředků.

10 Mimoto mají deriváty podle vynálezu protizánětlivé a antiartritické účinky, a to i v případě degenerativní rheumatoidní artritidy a podobných stavů a je možné je zařadit do farmaceutických prostředků pro léčení uvedených chorob. Běžným způsobem je možno připravit prostředky pro nitrožilní, perorální, transdermální a epikutánní podání.

15 Z pomocných látek, vhodných pro výrobu farmaceutického prostředku s obsahem derivátu podle vynálezu jsou zvláště vhodné přírodní a syntetické fosfolipidy při přípravě liposomových forem, určených pro parenterální a/nebo místní podání. Prostředky jsou účinné například při místním léčení kožních epitheliomů a u jiných hyperproliferativních stavů pokožky, například při lupence. V případě, že je požadován specifický antineoplastický účinek, je možno použít kromě fosfolipidů, které umožní podávání derivátů ve formě liposomů také smáčedlo, například polyethoxylovaný ricinový olej nebo polysorbáty, působící synergicky s účinnou složkou. Účinná  
20 látka se s výhodou mikronizuje ke snadnějšímu rozpuštění ve vodě. Překvapivě účinnou a velmi vhodnou formou je komplex derivátu podle vynálezu s cyklodextrinem.

Při onkologických indikacích se deriváty podle vynálezu užívají v dávkách 1 až 100 mg/m<sup>2</sup>.

25 Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají v žádném směsu sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

### 30 Příklady provedení vynálezu

#### Příklad 1

35 Příprava thiokolchikonu z *N*-deacetylthiokolchicinu  
(Ia: R = SMe, R<sub>1</sub> = Me)

100 ml methylenchloridu a 30 ml DMF se smísí pod dusíkem a pak se přidají 4 mg, 10,7 mmol deacetylthiokolchicinu s molekulovou hmotností 373 a 24,2 g 15 mmol 4-formyl-1-methylpyridinium-*p*-toluensulfonátu s molekulovou hmotností 279 a směs se vaří 3 hodiny pod zpětným chladičem nebo se vaří tak dlouho, až dojde ke spotřebování aminu. Pak se roztok zchladí na 0 °C a po kapkách se přidá 1,94 g, 12,8 mmol DBU s molekulovou hmotností 152, čímž se barva roztoku změni na tmavěčervenou. Po 15 minutách se přidá ještě 150 ml vodného roztoku kyseliny šťavelové, směs se nechá reagovat přes noc a pak se opakovaně extrahuje methylenchloridem, extrakty se spojí, vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se odpaří do sucha. Odparek  
45 se nechá krystalizovat z ethylacetátu, výtěžek je 78 %. Thiokolchikon má teplotu tání 212 °C a následující fyzikálně-chemické a spektroskopické vlastnosti.

MS (E.I.): 372 m/z (35%) – 344 (55%) – 329 (6%) – 311 (13%) – 301 (4%) – 287 (8%) – 267 (4%) – 243 (4%) – 215 (4%) – 84 (64%) – 49 (100%).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

5

ppm	molt	int	typ	J(Hz)	J(Hz)	J(Hz)
2,45	s	3H	SME			
2,68	ddd	1H	H-5eq	13,4	4,8	1,9
2,81	ddd	1H	H-6ax	16,6	13,4	4,8
2,95	ddd	1H	H-6eq	16,6	5,5	1,9
3,11	ddd=td	1H	H-5ax	13,1	13,5	5,6
3,57	s	3H	OMe			
3,88	s	3H	OMe			
3,90	s	3H	OMe			
6,56	s	1H	H-4			
6,96	s	1H	H-8			
7,07	AB	1H	H-11	10,2		
7,27	AB	1H	H-12	10,2		

<sup>13</sup>C-NRM (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

10 15,8 ppm (SMe) – 30,0 (C-5) – 48,0 (C-6) – 56,7 (OMe-3) – 61,8 (OMe-2) – 61,8 (OMe-1) – 107,8 (C-4) – 125,3 (C-12b) – 127,0 (C-11) – 130,7 (C-8) – 134,4 (C-4a) – 136,1 (C-12a) – 136,5 (C-12) – 142,3 (C-2) – 150,4 (C-1) – 152,6 (C-7a) – 154,6 (C-3) – 160,7 (C-10) – 182,9 (C-9) – 206,2 (C-7).

## 15 Příklad 2

Příprava kolchikonu z *N*-deacetylkolchicinu  
(Ib: R = OMe, R<sub>1</sub> = Me)

20 3,58 g *N*-deacetylkolchicinu se zpracovává způsobem podle příkladu 1, čímž se získá 2,6 g kolchikonu s následujícími fyzikálně-chemickými a spektroskopickými vlastnostmi.

MS (E.I): 356 m/z (100%) – 328 (95%) – 313 (25%) – 300 (22%) – 285 (18%) – 271 (26%) – 253 (13%) – 238 (8%) – 227 (13%) – 199 (16%) – 171 (11%).

25

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

ppm	molt	int	typ	J(Hz)	J(Hz)	J(Hz)
2,67	ddd	1H	H-5β	13,7	5,0	2,2
2,82	ddd	1H	H-6β	16,6	13,6	5,0
2,95	ddd	1H	H-6α	16,6	5,4	2,2
3,11	ddd	1H	H-5α	13,7	13,6	5,4
3,55	s	3H	OMe-1			
3,86	s	3H	OMe-2			
3,87	s	3H	OMe-3			
4,00	s	3H	OMe-10			
6,54	s	1H	H-4			
6,85	d	1H	H-11	10,7		
7,12	s	1H	H-8			
7,24	d	1H	H-12	10,7		

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

29,27 ppm (C-5) – 43,33 (C-6) – 55,96 (OMe-10) – 56,44 (OMe-3) – 61,07 (OMe-2) – 61,12 (OMe-1) – 106,96 (C-4) – 112,40 (C-11) – 124,50 (C-12b) – 132,00 (C-4a) – 132,80 (C-8) – 135,30 (C-12) – 136,15 (C-12a) – 141,80 (C-2) – 150,16 (C-1) – 151,83 (C-7a) – 153,70 (C-3) – 164,10 (C-10) – 179,40 (C-9) – 205,60 (C-7).

### Příklad 3

Příprava kondenzačního produktu thiolchicinu a 3,5-diterc-butyl-1,2-benzochinonu (IIa: R = SMe, R<sub>1</sub> = Me)

500 mg, 1,34 mmol deacetylthiolchicinu s molekulovou hmotností 373 a 590 mg, 2,69 mmol 3,5-diterc-butyl-1,2-benzochinonu s molekulovou hmotností 220 se rozpustí v 50 ml methanolu za atmosférických podmínek.

Reakce se sleduje pomocí TLC při použití směsi methylenchloridu a acetonu 30 : 1, přibližně po 18 hodinách se rozpouštědlo odpaří ve vakuu.

Teplý surový produkt se rozpustí v jednom objemu ethylacetátu, přidá se 1 až 1,5 objemu hexanu a směs se zchladí v ledu. Produkt se oddělí filtrací, výtěžek je 70 %. Výsledný derivát má teplotu 238 °C za rozkladu a následující fyzikálně-chemické a spektroskopické charakteristiky.

MS (E.I.): 573 m/z (33%) – 558 (1%) – 545 (100%) – 530 (9%) – 514 (7%) – 314 (4%) – 301 (4%) – 265 (7%) – 249 (7%).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

ppm	molt	int	typ	J(Hz)	J(Hz)
1,30	s	9H	tBu		
1,40	s	9h	tBu		
2,45	s	3H	SMe		
3,05	dd	1H	H-5	14,0	4,0
3,30	dd	1h	H-5	14,0	4,0
3,55	s	3H	OMe		
3,85	3	3H	OMe		
3,87	s	3H	OMe		
3,86	t	1H	H-6	4,0	
6,65	s	1H	H-4		
7,08	d	1H	H-11	11,0	
7,20	d	1H	H-5'	2,0	
7,26	d	1H	H-3'	2,0	
7,28	d	1H	H-12	11,0	
7,33	s	1H	H-8		

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

15,71 ppm (SMe) – 30,33 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) – 31,95 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) – 34,96 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) – 35,25 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) – 36,60 (C-5) – 56,41 (OMe-3) – 61,81 (OMe-1) – 61,64 (OMe-2) – 76,47 (C-6) – 109,80 (C-4) – 123,56 (C-5') – 124,61 (C-3') – 125,75 (C-12b) – 126,80 (C-11) – 132,28 (C-4') – 133,58 (C-6') – 135,13 (C-8) – 135,47 (C-4a) – 136,10 (C-12) – 137,01 (C-12a) – 142,35 (C-2) – 143,21 (C-7a) – 144,88 (C-2') – 147,19 (C-1') – 152,06 (C-1) – 153,78 (C-3) – 159,85 (C-10) – 164,68 (C-7) – 182,26 (C-9).

## Příklad 4

Příprava tablet s obsahem derivátu vzorce Ia

5

složka	množství v mg
derivát Ia	25
laktóza	47
mikrokrystalická celulóza	20
zesíťená sodná sůl karboxymethylcelulózy	5
koloidní oxid křemičitý	1
mastek	1
stearan hořečnatý	1

## Příklad 5

10 Příprava krému, obsahujícího liposomy s obsahem derivátu vzorce IIa

složka	množství v g
sloučenina IIa	0,20
fosfatidylcholin	20,00
cholesterol	0,50
butylhydroxytoluen	0,01
95% ethanol	8,00
hydrogenedetát sodný	0,15
imidazolidinyl močovina	0,30
dehydroacetát sodný	0,20
hydroxyethylcelulóza (Natrosol 250 HHX–Aqualon)	2,00
destilovaná voda	67,75

## Příklad 6

15

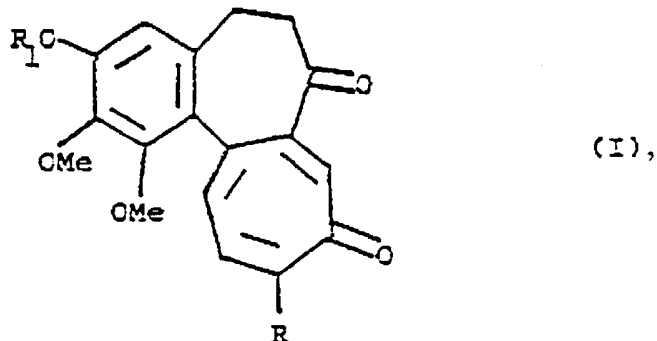
Příprava injekčního roztoku s obsahem derivátu Ia

sloučenina Ia	15 mg
PEG–660–12–hydroxystearát	2500 mg
propylenglykol	1000 mg
alkohol do	5 ml.

## PATENTOVÉ NÁROKY

5

## 1. Deriváty kolchicinu obecného vzorce I



kde

10 R znamená methoxyskupinu nebo methylthioskupinu,

R<sub>1</sub> znamená methyl, izopropyl, cyklopentyl nebo sukcinyl, přičemž v případě, že R znamená methoxyskupinu, má R<sub>1</sub> význam, odlišný od methylové skupiny a

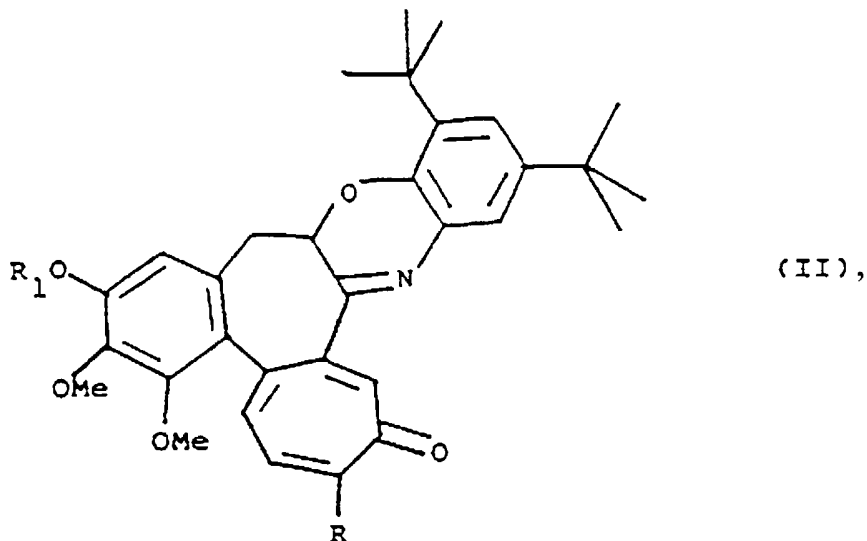
15 Me znamená methyl.

2. Deriváty kolchicinu podle nároku 1 obecného vzorce I, v němž R znamená methoxyskupinu.

3. Deriváty kolchicinu podle nároku 1 obecného vzorce I, v němž R znamená methylthioskupinu.

20

4. Deriváty obecného vzorce II

kde R, R<sub>1</sub> a Me mají význam, uvedený v nároku 1.

25

5. Deriváty podle nároku 4 obecného vzorce II, v němž R znamená methoxyskupinu.
6. Deriváty podle nároku 4 obecného vzorce II, v němž R znamená methylthioskupinu.
- 5 7. Způsob výroby derivátů kolchicinu obecného vzorce I podle nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že se nechá reagovat *N*-deacetylkolchicin nebo *N*-deacetylthiokolchicin se 4-formyl-1-methylpyridinium-*p*-toluensulfonátem a 1,8-diazabicyklo/5.4.0/undec-7-enem.
- 10 8. Způsob výroby derivátů podle nároků 4 až 6, **vyznačující se tím**, že se nechá reagovat *N*-deacetylkolchicin nebo *N*-deacetylthiokolchicin s 3,5-di-*terc*-butyl-1,2-benzo-  
chinonem.
9. Deriváty podle nároků 1 až 6 pro použití k léčebným účelům.
- 15 10. Použití derivátů podle nároků 1 až 6 pro výrobu farmaceutického prostředku s antineoplastickým nebo antiproliferativním účinkem.
11. Použití derivátu podle nároků 1 až 6 pro výrobu farmaceutického prostředku s protizánětlivým a antiartritickým účinkem.
- 20 12. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že jako účinnou složku obsahuje derivát podle některého z nároků 1 až 6.
- 25 13. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že je upraven pro parenterální podání.
14. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že má formu, vhodnou pro enterální podání.
- 30 15. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že má formu, vhodnou pro místní podání.
- 35 16. Farmaceutický prostředek podle nároku 13 nebo 15, **vyznačující se tím**, že je zpracován na formu liposomů.
17. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 12 až 16, **vyznačující se tím**, že jako pomocnou látku obsahuje smáčedla, například polyethoxylovaný ricinový olej nebo polysorbitan.
- 40 18. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 12 až 16, **vyznačující se tím**, že obsahuje účinnou složku ve formě jejího komplexu s cyklodextrinem.
- 45

---

Konec dokumentu

---