(12) **PATENT**

(19) NO (11) **337208** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl.

C07C 323/30 (2006.01)
C07C 323/41 (2006.01)
C07C 323/44 (2006.01)
C07D 213/82 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20063509	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.02.01 PCT/EP2005/00987
(22)	Inng.dag	2006.08.01	(85)	Videreføringsdag	2006.08.01
(24)	Løpedag	2005.02.01	(30)	Prioritet	2004.02.03, IT, MI04A00164
(41)	Alm.tilgj	2006.08.01			
(45)	Meddelt	2016.02.08			

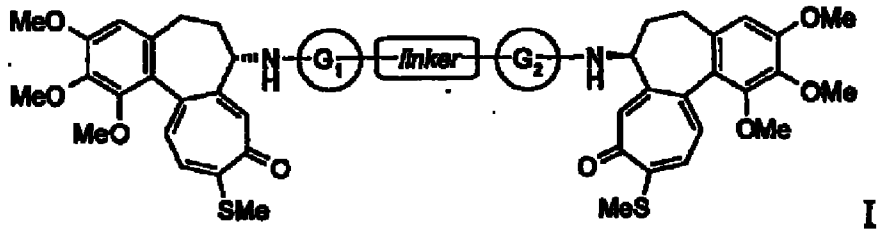
(73) Innehaver Indena SpA, Viale Ortles, 12, IT-20132 MILANO, Italia
(72) Oppfinner Gabriele Fontana, c/o Indena SpA, Viale Ortles, 12, IT-20139 MILANO, Italia
Ezio Bombardelli, Via Gabetta, 13, IT-27027 GROPELLO CAIROLI, Italia
(74) Fullmektig Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge

(54) Benevnelse **N-deacetyltiokolchisinderivater, deres anvendelse samt farmasøytiske formuleringer inneholdende slike**

(56) Anførte publikasjoner WO 0168597 A1

(57) Sammendrag

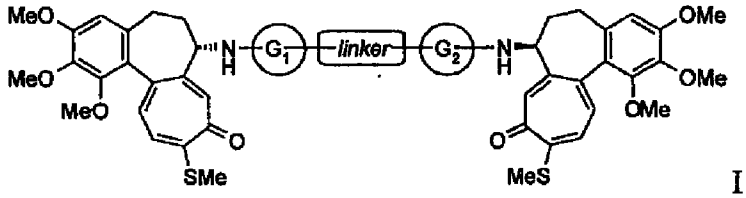
Det er beskrevet en serie av N-deacetyltiokolchisinderivater av formel (I) hvor: - linker er et bivalent rett eller forgrenet C_1-C_8 alkylresiduum, C_3-C_8 cykloalkyl, et fenylen eller en heterocyklisk C_4-C_6-ring; - G_1- og G_2-tilknytningsområdene, som kan være like eller forskjellige, er -CO-, COHN-, -CR_2-grupper hvor R_2 er hydrogen eller et rett C_1-C_4 alkylresiduum, eller G_1-linker-G_2-gruppen er en -CO-gruppe. Forbindelsene av formel (I) har antiproliferativ, antiinflammatorisk, antiartrittisk og antiviral aktivitet.



I

Beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår N-deacetyltiokolchisinderivater av formel I



I

hvor:

- linkeren er C_3-C_8 cykloalkyl, en fenylen eller heterocyklisk gruppe valgt fra pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, piperidinyl, piperazinyl bundet til G1- og G2-gruppene via to karbonatomer av ringen; og

- G_1- og G_2-tilknytningsområdene er begge –CO–, eller –CONH–, som angitt i krav 1.

Forbindelsene av formel I har antiproliferativ, antiinflammatorisk, antiartrittisk og antiviral aktivitet.

Oppfinnelsen vedrører også farmasøytiske sammensetninger inneholdende slike forbindelser som angitt i krav 6.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Kolchisin og tiokolchisin har vært kjent i en tid innen det medisinske felt. Kolchisin blir brukt i behandling av gikt og relaterte inflammatoriske tilstander. 3-O-demetyltiokolchisinglukosid blir brukt som miorelakserende middel ved spastisitet og muskelsmerter grunnet sammentrekninger. Imidlertid er i begge tilfeller bruken av disse forbindelser begrensete grunnet deres høye toksisitet.

Kolchisin og tiokolchisin er også kjente antiblastiske forbindelser, dvs. forbindelser som er i stand til å destabilisere mikrotubulene via interaksjon med tubulin. Den mulige anvendelse av et antall kolchisin- og tiokolchisinderivater som antitumor-medikamenter har blitt studert. Grunnet deres lave terapeutiske indeks har ingen

av dem vært gunstige med et eneste unntak av demekolchisin introdusert i terapi på sekstitallet til behandling av leukemiformer og etterfølgende erstattet av de mer effektive *Vinca* alkaloider.

WO 01/68597 beskriver tiokolchisindimere hvor tiokolchisinresiduene er bundet via en lineær alifatisk amido- eller amido-ureido-bro.

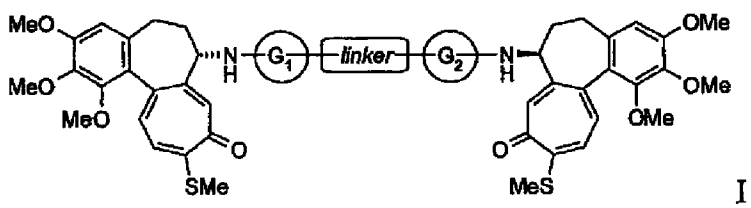
Beskrivelse av oppfinnelsen

Det har nå blitt funnet at forbindelsene av formel I har antiproliferativ aktivitet som er høyere enn kolchisin og tiokolchisin, spesielt på celler som uttrykker MDR (Multi-Droge-Resistens) fenotypen.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er også mer fordelaktige enn dimerene beskrevet i WO 01/68597. Videre har det blitt funnet at innføringen av et aromatisk basisk residuum i linkeren øker eksponensielt cytotoksisiteten av forbindelsene. Introduksjonen av linkere som er i stand til korrekt å orientere tiokolchisinresiduene i rommet, øker aktivitetsspektret på resistente tumorer. Cytotoksisiteten av forbindelsene av formel I viste seg sammenlignbare med den av de mest effektive antitumormedikamenter, mens virkningsspektret er bemerkelsesverdig bredere på resistente tumorer.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Det er beskrevet N-deacetyltiokolchisinderivater av formel



I

hvor:

- linkeren er C_3-C_8 cykloalkyl, en fenylen eller heterocyklisk gruppe valgt fra pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, piperidinyl, piperazinyl bundet til G1- og G2-gruppene via to karbonatomer av ringen; og

- G-tilknytningsområdene er begge –CO– eller –CONH.

Eksempler på cykloalkylgrupper omfatter 1,3-cykloheksylen og 1,4-cykloheksylen.

Eksempler på fenylengrupper omfatter 1,2-, 1,3- eller 1,4-fenylen.

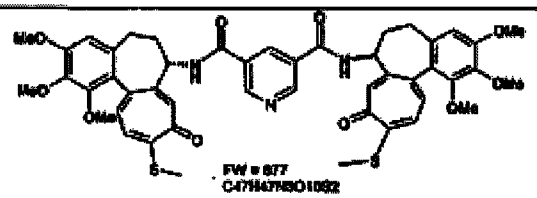
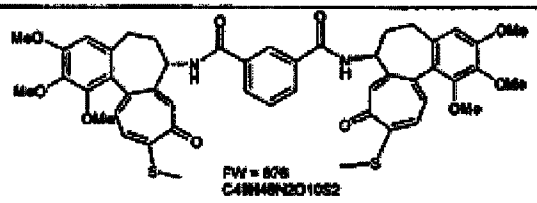
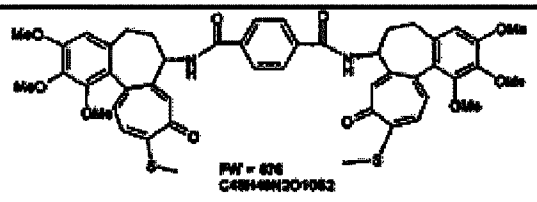
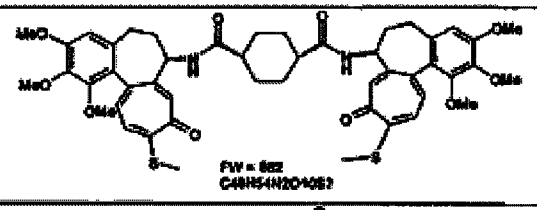
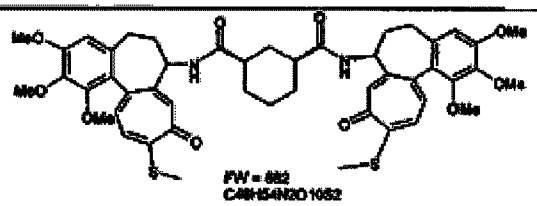
De heterocykliske grupper som er pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, piperidinyl, piperazinyl er bundet til G_1- og G_2-gruppene via to karbonatomer av ringen, for eksempel i posisjonene 3,5 eller 2,5 eller 2,6.

G_1 og G_2 er begge –CO– eller –CONH.

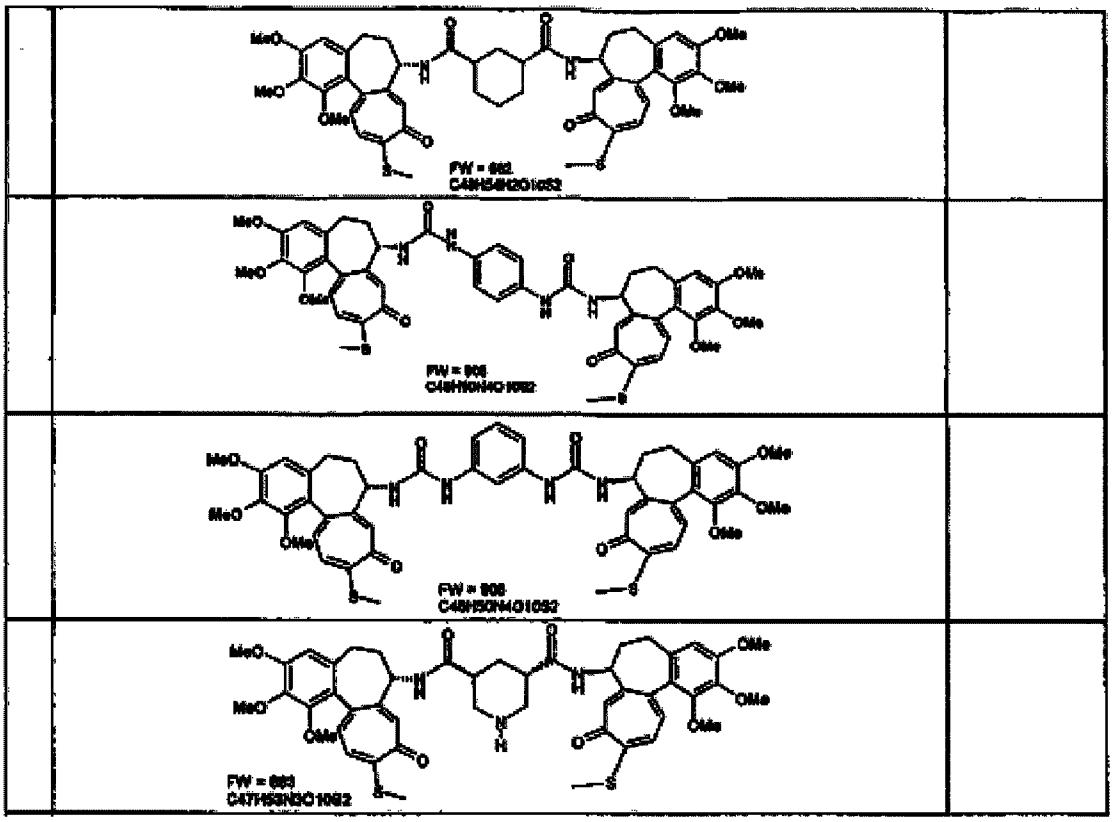
Linkeren er fortrinnsvis pyridyl, pyrimidinyl, pyrazonyl, piperidinyl.

Formlene av enkelte spesifikke forbindelser av formel I er angitt nedenfor:

Tabell 1

	 FW = 877	
	 FW = 876 C48H48N2O10S2	
	 FW = 876 C48H48N2O10S2	
	 FW = 882 C48H54N2O10S2	
	 FW = 882 C48H54N2O10S2	

forts. neste side



Forbindelsene av formel I har anti-proliferativ, anti-inflammatorisk, anti-artrittisk og anti-viral aktivitet.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse blir fremstilt som beskrevet i det følgende.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen av formel I hvor $G_1 = G_2 = CO$ (bis-amider) blir fremstilt ved å omsette N-deacetyltiokolchisin med aktiverte derivater av de ønskede dikarboksylsyrer i inerte oppløsningsmidler. Blant aktiverte dikarboksylsyrederivater er spesielt foretrukket syreklorider og blandede anhydrider, spesielt med trifluoreddiksyre. Blant inerte oppløsningsmidler er klorerte oppløsningsmidler spesielt foretrukket. Som et alternativ blir N-deacetyltiokolchisin omsatt med den ønskede dikarboksylsyre ved nærvær av DMAP (4-N,N-dimetylaminopyridin) og et kondensasjonsmiddel, DCC (dicykloheksylkarbodiimid) ved romtemperatur eller under oppvarming og med kraftig omrøring inntil utgangsmaterialene forsvinner.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen av formel I hvor $G_1 = G_2 = CONH$ (bis-ureaforbindelser) fremstilles ved å omsette N-deacetyl-tiokolchisin med det ønskede bis-isocyanat i et inert oppløsningsmiddel. Når det utvalgte isocyanat ikke er kommersielt tilgjengelig, blir det fremstilt in situ ved Lossen-rearrangering av den tilsvarende hydroksaminsyre ved behandling med karbodiimid og en base. Alternativt blir isocyanatet dannet ved behandling av det tilsvarende amid med blytetraacetat.

Forbindelsene med forskjellige G_1- og G_2-grupper fremstilles i to trinn via en kombinasjon av metodene angitt ovenfor.

Aktiviteten av forbindelsene av formel I ble vurdert på et stort antall tumorceller som uttrykker forskjellig resistens. Den mest interessante aktivitet ble observert i ovarie, tarm, lever og bukspyttkjertel tumorlinjer.

Tabell 2 viser IC_{50}-verdier (uttrykt i nanomol) for enkelte forbindelser ifølge oppfinnelsen i forhold til dimeren beskrevet i eksempel 3 av WO 01/68597.

Tabell 2 – IC_{50} (uttrykt i mMol) av tiokolchisn-dimere etter 72 timer

Forbindelse	IC_{50} (nM) ± S.E.						
	MCF7 (bryst)	MCF7-R (MDR+)	A2780 (ovarie)	A2780/dx (pgp+)	A2780/top (resistent mot topotecan)	A2780/pt (resistent mot tocisplatin)	Widr (tarm)
Eks.3 av WO 01/68597	7,9 ± 0,5	33 ± 2,8	238 ± 74	697 ± 192	288 ± 13	252 ± 0,7	351 ± 4
Eks. 1	0,7 ± 0,1	72 ± 4,3	3 ± 0,4	806 ± 286	6,9 ± 4,2	3,7 ± 0,6	25 ± 26,4
Eks. 3	1,5 ± 0,1	108 ± 14	8 ± 5,6	922 ± 164	5,5 ± 0,1	23 ± 4,6	48 ± 24
Eks. 2	14 ± 0,9	135 ± 11	37 ± 5	1273 ± 382	32 ± 24	26 ± 1,0	230 ± 166
Eks. 4			252 ± 38	3841 ± 224	152 ± 36	331 ± 63	650 ± 40

[1] IC_{50}: Konsentrasjon som inhiberer cellevekst med 50% i forhold til ikke-behandlede celler.

Cytotoksisk aktivitet ble vurdert i henhold til prosedyren beskrevet av M. C. Alley et al., *Cancer Research* 1998, 48, 589-601.

Alle tiokolchisin-dimerene med de krevde avstandsgrupper viste seg å ha antiproliferativ, antiinflammatorisk og antiviral aktivitet. Disse forbindelser er følgelig anvendelige ved behandling av neoplasier av forskjellig opprinnelse, deformerende reumatoid artritt og ved behandling av Kaposi-tumoren hvis retroviral komponent er bekreftet. Den inhiberende virkning av viral replikasjon kombinert med inhiberingen av celleproliferasjon i aktivt prolifererende vev er av spesiell interesse i betraktning av opphavet av flere humane tumorer.

For dette formål vil forbindelsene ifølge oppfinnelsen bli administrert som farmasøytiske sammensetninger som er egnet for intravenøs, parenteral, oral, transdermal administrasjon. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan knyttes til komplekser med plasmaproteiner, spesielt manipulert humant albumin. Proteinkompleksene av disse derivater blir fremskaffet ved å tilføre en konsentrert oppløsning av albuminforbindelsen oppløst i dioksan over en tid som tillater reaksjon mellom de involverte molekyltyper. Etter omsetting av de to molekyltyper (albumin og kolchisinderivatet) under fysiologisk pH- og ionestyrkebetingelser, blir den resulterende oppløsning frysetørket. Dersom den frysetørkede oppløsning fremstilles under forhold med absolutt sterilitet, er den klar for endovenøs injeksjon; den frysetørkede oppløsning kan, etter dispersjon i egnede og kompatible eksipienter, bli presset sammen og administrert via oral rute, noe som gir plasmakonsentrasjoner av medikamenter nær dem som kan bli oppnådd via parenteral rute. Som et alternativ til anvendelsen av plasmaproteiner, gitt den dårlige vannoppløseligheten av forbindelsene, kan forskjellige funksjonaliserte cyklodekstriner eller akrylmatriser som er egnet for parenteral administrasjon i mennesker, fordelaktig bli brukt.

Avhengig av administrasjonsruten vil dosen av forbindelsene strekke seg fra 1 til 20 mg/m^2 kroppsareal. De foretrukne administrasjonsruter er lokoregional injeksjon, intravenøs og oral administrasjon.

Eksempler på sammensetninger omfatter frysetørkede ampuller, støttede frysetørkede tabletter og drikkbare oppløsninger. Ethvert annet middel som oppløser forbindelsene i akseptabel grad for administrasjon, så som Tween, Cremophor av egnede blandinger derav med PEG eller alkoholer er også omfattet av foreliggende oppfinnelse.

De følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen i større detalj.

EKSEMPLER

Eksempel 1 – 3,5-pyridindikarboksylsyre bis-(N-deacetyltiokolchisin)amid

10 g av N-deacetyltiokolchisin oppløses i 60 ml metylenklorid. 2,24 g (0,5 eq) av 3,5-pyridinkarboksylsyre, 1,64 g (0,5 eq) av N,N-dimetylaminopyridin (DMAP) og 8,3 g (0,5 eq) av dicykloheksylkarbodiimid (DCC) tilsettes så under kraftig omrøring. Blandingen holdes under omrøring ved overvåkning av reaksjonen med TLC (AcOEt:MeOH 10:1) inntil reagensene forsvinner (omkring 12 timer). Oppløsningen filtreres så gjennom Celitt under vasking av puten med metylenklorid (2 x 100 ml). De kombinerte organiske faser vaskes først med et likt volum av 1N HCl og med 1N NaOH. Den organiske fase tørkes over natriumsulfat og inndampes under vakuum. Residuet renses med filtrering på silikagel (AcOEt:MeOH 10:1). Det resulterende produkt tørkes over natten i en statisk tørker ved 40°C under vakuum for å gi 7,5 g av sluttprodukt.

^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$): 1,00-1,42 (m, 2H), 1,50-2,00 (m, 2H), 2,05-2,30 (m, 2H), 2,30-2,50 (m, 2H), 2,52 (s, 3H, SMe), 3,71 (s, 3H, MeO-1), 3,90 (s, 3H, MeO-2), 3,96 (s, 3H, MeO-3), 4,80-4,92 (m, 2H, H-7), 6,47 (s, 2H, H-8), 7,18 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,38 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,67 (s, 2H, H-4), 8,52 (br s, 2H, NH), 9,28 (s, 2H, H-2'+H-6'), 9,60 (s, 1H, H-4');

^{13}CNMR (75 MHz, $CDCl_3$): 182,64, 164,25, 158,88, 154,12, 152,59, 152,34, 151,33, 141,92, 139,33, 135,48, 134,47, 132,74, 129,04, 128,54, 127,48, 125,71, 107,74, 61,88, 56,49, 53,03, 30,09, 15,41.

IR (KBr): 2934, 2854, 1664, 1605, 1540, 1485, 1424, 1403, 1349, 1321, 1266, 1235, 1195, 1153, 1137, 1095, 1051, 1021, 978, 921, 842, 796, 703.

Eksempel 2 – *trans*-1,4-cykloheksandikarboksylsyre bis-(N-deacetyltiokolchisin)amid

10 g N-deacetyltiokolchisin oppløses i 60 ml metylenklorid. 2,31 g (0,5 eq) *trans*-1,4-cykloheksandikarboksylsyre, 1,64 g (0,5 eq) DMAP og 8,3 g av (1,5 eq) av DCC blir så tilsatt under kraftig omrøring. Blandingen etterlates under omrøring i 12 timer og overvåkes med TLC (AcOEt:MeOH 10:1), filtreres derpå gjennom Celitt og puten vaskes med metylenklorid (2x20 ml). De kombinerte organiske faser vaskes så med et likt volum av 1N HCl, 1N NaOH og saltlake, tørkes over Na_2SO_4. Etter

inndamping av oppløsningsmiddelet under redusert trykk renses residuet med direkte kolonnekromatografi (AcOEt:MeOH 12:1). Produktet krystalliseres fra metanol (10 v/v) og tørkes over natten i en statisk tørker ved 40°C under vakuum for å gi 6,6 g ren forbindelse.

^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$): 1,30-1,45 (m), 1,45-1,70 (m, 2H), 1,80-1,19 (m), 1,89-2,10 (m), 2,18-2,56 (m), 2,43 (s, 3H, SMe), 3,69 (s, 3H, MeO-1), 3,92 (s, 3H, MeO-2), 3,97 (s, 3H, MeO-3), 4,80-4,92 (m, 2H, H-7), 6,47 (s, 2H, H-8), 7,09 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,34 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,86 (s, 2H, H-4), 8,93 (br s, 2H, NH).

^{13}CNMR (75 MHz, $CDCl_3$): 182,44, 176,35, 158,52, 153,80, 152,96, 151,55, 141,97, 139,22, 135,04, 134,69, 129,93, 127,09, 126,37, 107,04, 62,39, 61,68, 56,45, 51,13, 44,59, 36,92, 30,63, 29,61, 27,84, 15,36.

IR (KBr): 3442, 3285, 2934, 2855, 1674, 1602, 1532, 1484, 1454, 1424, 1403, 1390, 1348, 1321, 1281, 1256, 1236, 1195, 1153, 1136, 1094, 1022, 982, 942, 921, 841, 619, 582.

Eksempel 3 – 3,5-benzendikarboksylsyre *bis*-(N-deacetyltiokolchisin)amid

Fremgangsmåten fra eksempel 1 følges ved å starte fra 5 g isoftalsyre for å oppnå produktet som et krystallinsk fast stoff (utbytte: 82%).

^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$): 1,00-1,42 (m, 2H), 1,50-2,00 (m, 2H), 2,05-2,30 (m, 2H), 2,30-2,50 (m, 2H), 2,52 (s, 3H, SMe), 3,71 (s, 3H, MeO-1), 3,90 (s, 3H, MeO-2), 3,96 (s, 3H, MeO-3), 4,80-4,92 (m, 2H, H-7), 6,47 (s, 2H, H-8), 7,18 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,38 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,67 (s, 2H, H-4), 8,52 (br s, 2H, NH), 8,05 (m, 2H, H-4'+H-6'), 8,50 (m, 1H, H-2'), 7,46 (dd, 8,0 Hz, H-5').

Eksempel 4 – N-deacetyltiokolchisin 1,4-fenylendiamin bis-urea

2,0 g av N-deacetyltiokolchisin oppløses i 150 ml tørr tetrahydrofuran. 0,5 ekvivalenter 1,4-fenylendiisocyanat (0,4 g) blir så tilsatt. Reaksjonsblandingen holdes under omrøring ved romtemperatur i to dager ved overvåkning med TLC (DCM-EtOH 95:5, Rf = 0,30). Oppløsningsmiddelet dampes fra og grovmaterialet rekrystalliseres fra etylacetat for å oppnå 0,95 g renprodukt (38%).

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-6): 1,72-1,88 (m), 2,08-2,36 (m), 2,58-2,70 (m), 2,42 (s, 3H, SMe), 3,58 (s, 3H, MeO-1), 3,82 (s, 3H, MeO-2), 3,87 (s, 3H, MeO-3), 4,24-4,35 (m, 2H, H-7), 6,82 (s, 2H, H-8), 7,17 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,27 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,13 (s, 2H, H-4), 8,52 (br s, 2H, NH).

Eksempel 5 – N-deacetyltiokolchisin 1,3-fenylendiamin bis-urea

Fremgangsmåten fra eksempel IV følges ved å starte fra 2,0 g av N-deacetyltiokolchisin og 0,4 g av 1,3-fenylendiisocyanat for å oppnå det ønskede produkt (utbytte: 42%).

^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d6): 1,72-1,88 (m), 2,08-2,36 (m), 2,58-2,68 (m), 2,43 (s, 3H, SMe), 3,58 (s, 3H, Meo-1), 3,83 (s, 3H, MeO-2), 3,87 (s, 3H, MeO-3), 4,24-4,35 (m, 2H, H-7), 6,82 (s, 2H, H-8), 7,18 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,28 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,14 (s, 2H, H-4), 8,48 (br s, 2H, NH).

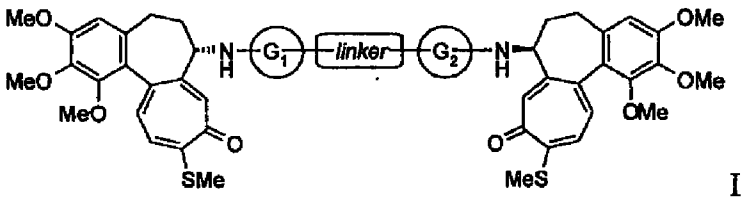
Eksempel 6 – Injiserbar formulering av 3,5-pyridinkarboksylsyre bis-(N-deacetyltiokolchisin)amid kompleksbundet med humant albumin

1 g av 3,5-pyridindikarboksylsyre bis-(N-deacetyltiokolchisin)amid oppløses i 20 ml dioksan. Den resulterende oppløsning slippes sakt inn i en 5% fysiologisk oppløsning av albumin for å oppnå en homogen melkeaktig suspensjon. Blandingen holdes under omrøring under sterile betingelser i to timer, og frysetørkes derpå.

Det frysetørkede produkt er klart for administrering via injeksjonsrute.

Patentkrav

1. Forbindelse av formel I



I

hvor:

- linkeren er C_3-C_8 cykloalkyl, en fenylen eller heterocyklisk gruppe valgt fra pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, piperidinyl, piperazinyl bundet til G1- og G2-gruppene via to karbonatomer av ringen; og

- G-tilknytningsområdene er begge –CO- eller –CONH.

2. Forbindelse ifølge krav 1, hvor linkeren er valgt fra 1,3-cykloheksylen og 1,4-cykloheksylen.

3. Forbindelse ifølge krav 1 eller 2 hvor linkeren er valgt fra 1,2-, 1,3- eller 1,4-fenylen.

4. Forbindelse ifølge krav 1, hvor linkeren er valgt fra pyridyl, piperidinyl, piperazinyl bundet til G_1- og G_2-gruppene i posisjonene 3,5 eller 2,5 eller 2,6.

5. Forbindelse ifølge krav 1 for antitumor, antiartritt, antiinflammatorisk og antiviral anvendelse.

6. Farmasøytisk sammensetning inneholdende forbindelsene av formel I ifølge krav 1 som aktive bestanddeler med egnede bæremidler og/eller eksipienter.