

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239645**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **434775**

(22) Data zgłoszenia: **01.10.2015**

(62) Numer zgłoszenia, z którego nastąpiło wydzielenie:
414240

(51) Int.Cl.

C07D 491/22 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania reaktywnych estrowych pochodnych (S)-(+)- kamptotecyny**

(30) Pierwszeństwo:

01.10.2015, PL, P.414240

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

10.04.2017 BUP 08/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

20.12.2021 WUP 38/21

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ PLICHTA, Warszawa, PL
MONIKA WASYŁECZKO, Nowe Sady, PL
TOMASZ JASKULSKI, Pruszków, PL**

(74) Pełnomocnik:

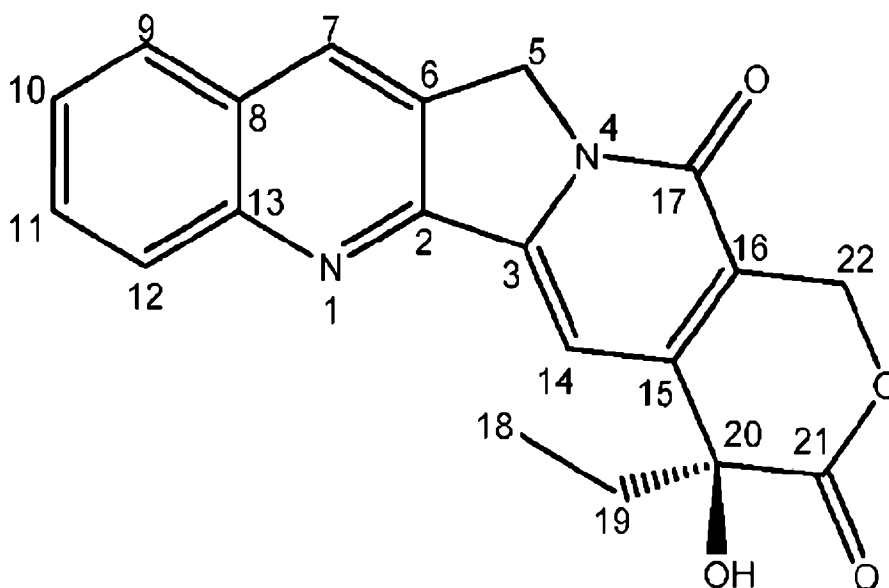
recz. pat. Mirosława Ważyńska

PL 239645 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania reaktywnych estrowych pochodnych (S)-(+)-kamptotecyny, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów.

(S)-(+)-Kamptotecyna (CPT) jest jedną z bardzo perspektywicznych substancji o właściwościach przeciwnowotworowych. Jest ona zmodyfikowanym monoterpenowym alkaloidem indolowym wyizolowanym po raz pierwszy w 1966 r., z drewna i kory *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), drzewa pochodzącego z Chin. Cząsteczka CPT posiada konfigurację S przy atomie węgla C₂₀. Ten fragment cząsteczki odpowiada za doskonałe właściwości przeciwnowotworowe. Izomer R jest farmakologicznie nieaktywny [Chavan S.P. i Venkatraman M.S., *Arkivoc* 2005, 165–169]. Wzór 1 przedstawia strukturę CPT wraz z numeracją atomów.



Wzór 1

CPT jest stosunkowo łatwo dostępnym naturalnym produktem o dobrze poznanym mechanizmie działania *in vitro*. Badania *in vivo* pokazują, że CPT odznacza się istotną aktywnością przeciwnowotworową w badaniu na myszach obciążonych ludzkimi formami raka: płuc, macicy, piersi, trzustki oraz żołądka. Niska toksyczność wobec normalnych komórek w stanie spoczynku to zasługa mechanizmu działania ograniczającym się do fazy S cyklu komórkowego [Lee N-J. i inni, *Polym. Int.* 2003, 52, 1339–1345]. Jak wiadomo, działanie cytostatyków polega m.in. na zaburzeniu cyklu komórkowego i powodowaniu śmierci komórki lub zahamowaniu jej podziałów i rozwoju. Cytostatyki ze względu na mechanizm działania można podzielić na następujące grupy: leki alkilujące, inhibitory mitozy, inhibitory topoizomerazy, antybiotyki cytostatyczne i antymetabolity. Spośród leków należących do inhibitorów topoizomerazy rozróżniamy cytostatyki oddziałujące na topoizomerazę I i topoizomerazę II [The Pharmacological Basic of Therapeutics, Goodman & Gilman 2011 (12th Edition), Janiec W., Kompendium Farmakologii, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008]. CPT i jej pochodne CPT hamują działanie topoizomerazy I, która jest wymagana do replikacji DNA i transkrypcji RNA w komórkach [Wu S-F. i inni, *Molecules* 2008, 13, 1361–1371]. CPT stabilizuje indukowany przez topoizomerazę I rozpad nici DNA, powodując za sobą zapobieganie ponownemu połączeniu się nici DNA, co prowadzi do natychmiastowej apoptozy komórki. W konsekwencji wydłużona inhibicja topoizomerazy I jest uznawana za jeden z najważniejszych czynników wpływających na aktywność terapeutyczną CPT [Wu S-F. i inni, *Molecules* 2008, 13, 1361–1371].

Ponadto, CPT okazuje się również słabym inhibitorem replikacji wirusa HIV oraz wirusa końskiej anemii, podczas gdy jej pochodna 9-nitrokamptotecyna wykazuje działanie inhibicyjne na replikację wirusa HIV-1 w świeżo zainfekowanych komórkach monocytów.

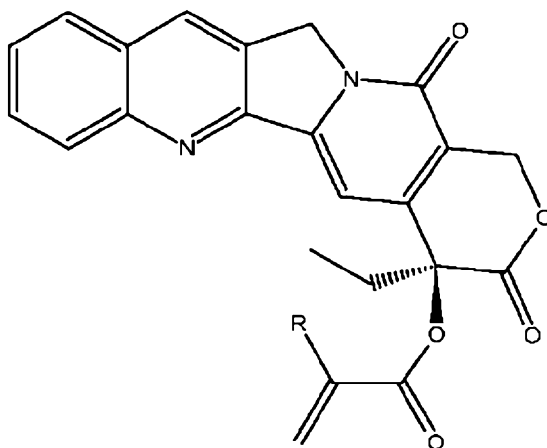
Ograniczeniem w stosowaniu CPT jest jej toksyczność względem różnych organów lub układów powodująca konieczność zmniejszenia wielkości dawki, a z drugiej strony słaba rozpuszczalność CPT w wodzie i płynach ustrojowych. Czasami dyskutowana jest także mała stabilność pierścienia laktonowego w strukturze CPT, prowadząca do jego otwarcia z wytworzeniem ugrupowań karboksylowych i hydroksylowych. W celu zredukowania tych problemów podjęto badania nad syntezą i stosowaniem w terapii licznych analogów i pochodnych CPT. Najpowszechniej spotykanymi analogami CPT, w których podstawione są atomy wodoru przy atomach węgla numer 7, 9, 10 lub/i 11 są topotekan [Patent USA nr 7 547 785], irinotekan [Patent USA nr 7 683 170], exatekan [Patent USA nr 5 834 476] oraz inne pochodne podstawione w tych pozycjach [Patenty USA nr 8 685 997, 8 592 588, 7 687 487, 7 655 640] posiadające lepszą rozpuszczalność w wodzie, będące mniej toksyczne lub charakteryzujące się innymi cechami wspomagającymi terapię lub diagnostykę. Np. topotekan półsyntetyczny analog CPT jest efektywny w leczeniu wieloogniskowej leukoencefalopatii [Li Y-Y i inni, *Molecules* 2010, 15, 138–148].

Oprócz tego w literaturze patentowej opisane są koniugaty CPT tworzone przez wiązanie estrowe z grupą hydroksylową przy atomie węgla 20. Przykładem mogą być związki zbudowane z cząsteczki CPT związanej przez ugrupowanie estrowe łącznikiem do przeciwciał lub ich fragmentów, stanowiących ugrupowanie sterujące koniugatem w kierunku chorych komórek [Patenty USA nr 8 877 901, 8 834 886, 8 617 558]. Dodatkowo opisane są takie estry CPT, które posiadają również podstawniki przy atomach węgla numer 7, 9, 10, 11 lub/i 12 [Patenty USA nr 8 779 138, 6 855 720, 6 492 335, RE39 707] łącząc w sobie różne właściwości lub funkcjonalności, np. zwiększoną wodorozpuszczalność [Patenty USA nr 9 006 439, 5 646 159], lepszą stabilizację pierścienia laktonowego [Patent USA nr 6 218 399], obniżoną toksyczność [Patent USA nr 7 700 612] lub możliwość wykorzystania w radioterapii sprzężonej z chemioterapią [Patent USA nr 8 563 537].

Odrębną grupę koniugatów CPT stanowią jej połączenia z polimerami. Skoniugowanie CPT i polimeru biodegradowalnego czy bioresorbowalnego daje m.in. możliwość zwiększenia jego hydro- lub lipofilowości, możliwość przedłużenia trwałości, zaprogramowania dystrybucji, absorpcji i kinetyki uwalniania. Pomimo licznych prób, do chwili obecnej opracowano bardzo niewiele rozwiązań tego typu. Znaczna większość to koniugaty, w których na jeden łańcuch polimerowy przypada zaledwie 1 lub 2 cząsteczki CPT przyłączone do końca(ów) łańcucha polimerowego. Otrzymano m.in. koniugaty CPT z glikolem polioksyetylenowym [Fleming A.B i inni, *Biocorjugate Chem.* 2004, 15, 1364–1375; Warnecke A. i Kratz F., *Biocorjugate Chem.* 2003, 14, 377–387; Greenwald R.B. i inni, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 11, 2635–2639], poli(kwasem glutaminowym) [DeVries P. i inni, *J. Med. Chem.* 2003, 46, 190–193; Singer J.W. i inni, *J. Control. Release* 2001, 74, 243–247], β -cyclodekstrynami [Cheng J. J. i inni, *Biocorjugate Chem.* 2003, 14, 1007–1017], poli[N-(2- hydroksypropylo)metakrylamidem] [Caiolfa V.R. i inni, *J. Control. Release* 2000, 65, 105–119], poliacetalami lub/i poliketalami [Patent USA nr 8 491 880], poli[(N-karboksybutylo)-L-aspartamidem] [Fan N. i inni, *Colloids and Surf. B Biointerfaces* 2010, 75, 543–549; Zhang W. i inni, *Colloids and Surf. B Biointerfaces* 2010, 81, 297–303], poliamidoaminami [Fan H. i inni, *Polymer* 2010, 51, 5107–5114] poli(metakrylanem 2-fosforylocholinooksyetylu) [Chen X. i inni, *Biocorjugate Chemistry* 2009, 20, 2331–2341] czy z poliestrami [Parrish B. i Emrick T., *Biocorjugate Chemistry* 2007, 18, 263–267; Sobczak M. i inni, *J. Macromol. Sci., Part A Pure Appl. Chem.* 2014, 51, 254–262].

Celem wynalazku było opracowanie sposobu otrzymywania reaktywnych estrowych pochodnych CPT, które ze względu na grupy funkcyjne obecne w ich strukturze są monomerami zdolnymi do polimeryzacji rodnikowej, która jest jedną z najprostszych metod polimeryzacji i w wyniku reakcji (ko)polimeryzacji rodnikowej mogą tworzyć wielkocząsteczkowe koniugaty CPT, w których na jedną cząsteczkę polimeru przypada wiele cząsteczek CPT.

Sposób otrzymywania reaktywnych estrowych pochodnych CPT o wzorze ogólnym 2.



Wzór 2

gdzie:

R = H lub CH₃,

polega na tym, że nadmiar halogenku kwasu akrylowego lub halogenku kwasu metakrylowego poddaje się reakcji nierównowagowej estryfikacji z posiadającą trzeciorzędową grupę hydroksylową cząsteczką CPT, prowadzonej w nieprotonowym polarnym rozpuszczalniku organicznym mogącym zawierać w swojej strukturze oprócz atomów węgla, wodoru i tlenu również atomy chloru, bromu oraz azotu nie wykazującym mieszalności z wodą i zdolnym do rozpuszczenia głównego produktu reakcji oraz wszystkich reagentów poza CPT. Reakcję można prowadzić opcjonalnie w obecności nadmiaru molowego względem CPT odczynnika wiążącego chemicznie produkt uboczny estryfikacji oraz opcjonalnie w obecności katalizatora. Stosuje się co najmniej równomolową względem ilości grup halogenku kwasowego ilość odczynnika wiążącego chemicznie produkt uboczny estryfikacji, przy czym produktem ubocznym estryfikacji jest halogenowodór a odczynnikami wiążącymi chemicznie halogenowodór są trzeciorzędowe aminy lub wieloaminy alifatyczne, aromatyczne lub alifatyczno-aromatyczne w ilości od 100 do 500% molowych względem grup halogenku kwasowego, przy czym najpierw z naczynia reakcyjnego ewakuuje się gaz i wypełnia je gazem obojętnym czynność tę powtarzając od 1 do 5 razy. Następnie do naczynia wprowadza się osuszony rozpuszczalnik, CPT oraz czynnik wiążący halogenowodór, dostosowuje się temperaturę mieszaniny do zakresu od -25 do 0°C, po czym wkraplając dodaje się odmierzoną ilość halogenku kwasowego i miesza przez 1 godzinę po czym podnosi się temperaturę do wartości w zakresie od 10 do 60°C. Reakcję prowadzi się przez 1 do 120 godzin, po czym jeżeli w układzie widoczny jest osad oddziela się go a przesącz stanowiący fazę organiczną ekstrahuje się od 1 do 5 razy kwasem solnym o stężeniu od 0,5 do 10% wagowych, następnie od 1 do 5 razy roztworem wodnym NaHCO₃ o stężeniu wagowym w granicach od 0,5 do 5% i dalej od 1 do 5 razy solanką po czym do fazy organicznej dodaje się środek suszący i suszy ją od 3 do 96 godzin w temperaturze od 0 do 20°C, a następnie osad oddziela się a z przesączu stanowiącego fazę organiczną usuwa się rozpuszczalniki. Osad poddaje się krystalizacji z rozpuszczalnika krystalizacji po czym osad oddziela się i poddaje suszeniu w suszarce próżniowej w temperaturze od 20 do 40°C przez 10 do 96 godzin.

Nadmiar molowy halogenku kwasu korzystnie wynosi od 1,2 do 5 razy, a najkorzystniej od 1,5 do 3 razy względem CPT.

Jako nieprotonowy polarny rozpuszczalnik organiczny w reakcji estryfikacji CPT z halogenkami kwasów karboksylowych korzystnie stosuje się dichlorometan, chloroform, toluen, ksylen, dioksan, tetrahydrofuran lub ich mieszaninę, najkorzystniej dichlorometan.

Jako czynnik wiążący wodę korzystnie stosuje się N-(3-dimetyloaminopropylo)-N'-etylokarbodiimid, jego addukt z chlorowodorem lub dicykloheksylokarbodiimid, a najkorzystniej addukt N-(3-dimetyloaminopropylo)-N'-etylokarbodiimidu z chlorowodorem. Nadmiar molowy czynnika wiążącego wodę korzystnie wynosi od 1,2 do 8 razy względem CPT, a najkorzystniej równomolowo względem grup karboksylowych.

Jako czynnik wiążący halogenowodor korzystnie stosuje się trietyloaminę, pirydynę lub 4-dimetyloaminopirydynę.

Jako katalizator korzystnie stosuje się 4-dimetyloaminopirydynę w ilości molowo od 0,5 do 2 względem grup karboksylowych, a najkorzystniej równomolowo względem tych grup.

Temperatura reakcji estryfikacji korzystnie przez pierwszą godzinę wynosi 0°C, po czym jest podnoszona do temperatury w zakresie 25–40°C.

Reakcję korzystnie prowadzi się do momentu osiągnięcia wizualnej homogeniczności mieszaniny reakcyjnej.

Jako gaz obojętny korzystnie stosuje się azot, argon lub ich mieszaninę.

Do głównych zalet opisanych modyfikatorów zaliczyć można ich reaktywność w procesach polimeryzacji rodnikowej. (Ko)polimeryzacja rodnikowa (met)akrylanowych pochodnych CPT może przebiegać według mechanizmu klasycznej polimeryzacji (wolno)rodnikowej oraz mechanizmów polimeryzacji kontrolowanej (CRP), w tym polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP). W ten sposób cząsteczki CPT mogą być immobilizowane na łańcuchach polimerowych tworząc koniugaty polimer-lek, w których na jeden łańcuch polimerowy przypada znacznie więcej niż 1 cząsteczka CPT. Umożliwia to więc definiowanie porcji leku na gram koniugatu w dość dużym zakresie. Dodatkowo, metoda ATRP umożliwia otrzymanie blokowych lub rozgałęzionych kopolimerów CPT, w których komonomery będą decydowały o wielu właściwościach końcowego koniugatu.

P r z y k ł a d

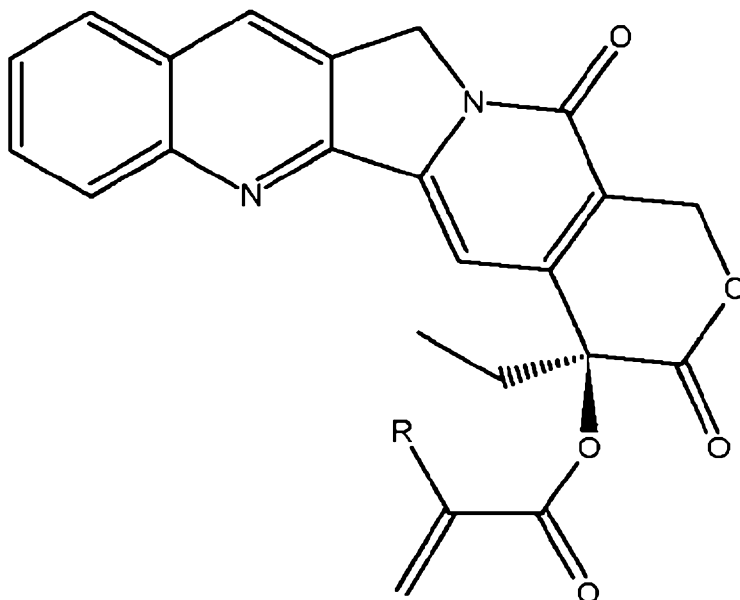
Otrzymywanie metakrylanu CPT (we wzorze 2: $n = 0$, $m = 0$, $k = 0$, $R = CH_3$).

Do kolby dwuszyjnej okrągłodennej zaopatrzonej w magnetyczny element mieszający oraz chłodnicę zwrotną zakończoną balonikiem odważono 300 mg CPT oraz 210 mg DMAP, a następnie trzykrotnie ewakuowano gaz i wypełniano układ czystym azotem, po czym do kolby w przepływie azotu wprowadzono 20 ml osuszonego dichlorometanu, 0,24 ml trietyloaminy. Zawartość schłodzono do 0°C po czym wkroplono roztwór 0,168 ml chlorku metakroilu w 10 ml dichlorometanu. Całość mieszano przez 1 godzinę w temp. 0°C po czym stopniowo temperaturę podwyższono do wartości 60°C i mieszano przez 20 minut, po czym schłodzono do temp. 25°C i mieszano dalej przez 72 godziny. Otrzymaną jasnobrązową ciecz ekstrahowano 1-krotnie 150 ml wodnym 1M roztworem kwasu solnego, następnie 3-krotnie 150 ml roztworu $NaHCO_3$ o stężeniu 0,5% wag., po czym przemyto 1-krotnie 150 ml solanki i fazę organiczną po wysuszeniu bezwodnym $MgSO_4$ zateżono do sucha na wyparce. Otrzymano surowy produkt z wydajnością 98%. Krystalizowano z mieszaniny metanol/dichlorometan 19:1 po czym osad odfiltrowano i suszono w temp. 40°C przez 24 godziny pod obniżonym ciśnieniem. Otrzymano produkt z wydajnością 32%.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.69 (s, 1H), 8.15 (dd, $J = 16.4, 8.3$ Hz, 2H), 7.86 (ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.5$ Hz, 1H), 7.71 (ddd, $J = 8.2, 6.9, 1.2$ Hz, 1H), 6.27 – 6.21 (m, 1H), 5.96 (dq, $J = 2.0, 1.0$ Hz, 3H), 5.60 (q, $J = 1.7$ Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 2.17 (q, $J = 4.5$ Hz, 4H), 1.94 – 1.91 (m, 11H), 0.86 (q, $J = 6.8, 6.2$ Hz, 3H).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania reaktywnych estrowych pochodnych (S)-(+)-kamptotecyny o wzorze ogólnym 2



Wzór 2

gdzie:

R = H lub CH₃,

znamienny tym, że nadmiar halogenku kwasu akrylowego lub halogenku kwasu metakrylowego poddaje się reakcji nierównowagowej estryfikacji z posiadającą trzeciorzędową grupę hydroksylową cząsteczką CPT, prowadzonej w nieprotonowym polarnym rozpuszczalniku organicznym mogącym zawierać w swojej strukturze oprócz atomów węgla, wodoru i tlenu również atomy chloru, bromu oraz azotu nie wykazującym mieszalności z wodą i zdolnym do rozpuszczenia głównego produktu reakcji oraz wszystkich reagentów poza CPT, reakcję prowadzi się z co najmniej równomolową względem ilości grup halogenku kwasowego ilością odczynnika wiążącego chemicznie produkt uboczny estryfikacji, przy czym najpierw z naczynia reakcyjnego ewakuuje się gaz i wypełnia je gazem obojętnym czynność tę powtarzając od 1 do 5 razy i następnie do naczynia wprowadza się osuszony rozpuszczalnik, CPT oraz ewentualnie czynnik wiążący halogenowodór, dostosowuje się temperaturę mieszaniny do zakresu od -25 do 0°C, po czym wkraplając dodaje się odmierzoną ilość halogenku kwasowego i miesza przez 1 godzinę po czym podnosi się temperaturę do wartości w zakresie od 10 do 60°C, reakcję prowadzi się przez 1 do 120 godzin, po czym jeżeli w układzie widoczny jest osad oddziela się go a przesącz stanowiący fazę organiczną ekstrahuje się od 1 do 5 razy kwasem solnym o stężeniu od 0,5 do 10% wagowych, następnie od 1 do 5 razy roztworem wodnym NaHCO₃ o stężeniu wagowym w granicach od 0,5 do 5% i dalej od 1 do 5 razy solanką po czym do fazy organicznej dodaje się środek suszący i suszy ją od 3 do 96 godzin w temperaturze od 0 do 20°C, a następnie osad oddziela się a z przesączu stanowiącego fazę organiczną usuwa się rozpuszczalniki, osad poddaje się krystalizacji z rozpuszczalnika krystalizacji po czym osad oddziela się i poddaje suszeniu w suszarce próżniowej w temperaturze od 20 do 40°C przez 10 do 96 godzin.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję estryfikacji prowadzi się w obecności nadmiaru molowego względem CPT odczynnika wiążącego chemicznie produkt uboczny estryfikacji.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że reakcję estryfikacji prowadzi się w obecności katalizatora.

4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako katalizator stosuje się 4-dimetyloaminopirydynę w ilości molowo od 0,5 do 2 względem grup karboksylowych.
5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że katalizator stosuje się równomolowo względem grup karboksylowych.
6. Sposób według zastrz. 1 albo 3, **znamienny tym**, że odczynnikami wiążącym chemicznie halogenowodór są trzeciorzędowe aminy lub wieloaminy alifatyczne, aromatyczne lub alifatyczno-aromatyczne w ilości od 100 do 500% molowych względem grup halogenku kwasowego.
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że jako czynnik wiążący halogenowodór stosuje się trietyloaminę, pirydynę lub 4-dimetyloaminopirydynę.
8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako halogenki kwasów karboksylowych stosuje się chlorek metakroilu.
9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że nadmiar molowy halogenku kwasu wynosi od 1,2 do 5 razy.
10. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że nadmiar molowy halogenku kwasu wynosi od 1,5 do 3 razy względem CPT.
11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako nieprotonowy polarny rozpuszczalnik organiczny w reakcji estryfikacji CPT z halogenkami kwasów karboksylowych stosuje się dichlorometan, chloroform, toluen, ksylen, dioksan, tetrahydrofuran lub ich mieszaninę.
12. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że jako nieprotonowy polarny rozpuszczalnik organiczny stosuje się dichlorometan.
13. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako czynnik wiążący wodę stosuje się N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimid, jego addukt z chlorowodorem lub dicykloheksylokarbodiimid, a najkorzystniej addukt N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimidu z chlorowodorem.
14. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że nadmiar molowy czynnika wiążącego wodę wynosi od 1,2 do 8 razy względem CPT.
15. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że temperatura reakcji estryfikacji przez pierwszą godzinę wynosi 0°C, po czym jest podnoszona do temperatury w zakresie 25–40°C.
16. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się do momentu osiągnięcia wizualnej homogeniczności mieszaniny reakcyjnej.
17. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako gaz obojętny stosuje się azot, argon lub ich mieszaninę.