

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

236682
(11) (B2)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 15 09 82
(21) [PV 6643-82]
(32) (31) (33) Právo přednosti od 18 09 81
(8128252) Velká Británie
(40) Zveřejněno 17 09 84
(45) Vydáno 15 02 87

(51) Int. Cl.³
C 07 D 309/06
C 07 D 309/30

(72)
Autor vynálezu

CASSINELLI GIUSEPPE, VOGHERA, MILAN, ARCAMONE FEDERICO,
NERVIANO, MILAN, CASAZZA ANNA MARIA, MILAN (Itálie)

(73)
Majitel patentu

FARMITALIA CARLO ERBA, S.p.A., MILAN (Itálie)

(54) Způsob přípravy 3'-deaminovaných analogů glykosidových anthracyklinových antibiotik

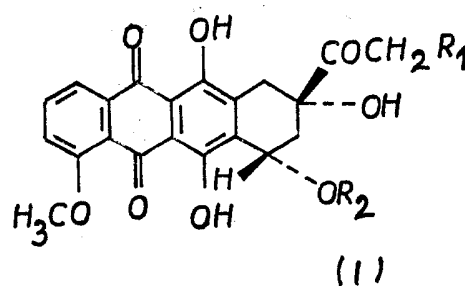
1

Vynález se týká nové skupiny glykosidových anthracyklinových antibiotik, které jsou odvozeny od daunorubicinu a doxorubicinu, dále způsobu přípravy těchto sloučenin, farmaceutických prostředků obsahujících tyto sloučeniny a použití těchto sloučenin při léčení určitých nádorů u savců.

Daunorubicin a doxorubicin, to znamená sloučeniny, od kterých jsou odvozeny sloučeniny podle tohoto vynálezu, jsou známá a používaná protinádorová antibiotika, která jsou běžně popisována v literatuře.

Kromě toho, výchozí sloučeniny, ze kterých se připravují sloučeniny podle vynálezu, to znamená 3',4'-diepi-daunorubicin a 3',4'-diepi-doxorubicin, jsou rovněž běžně známé sloučeniny, které jsou uváděny například v US patentu č. 4 112 076 z 5. září 1978.

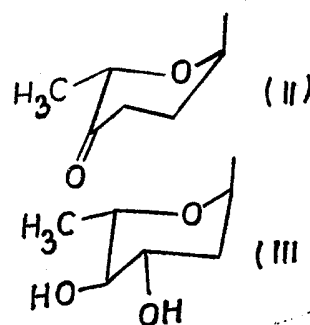
Tento vynález se týká nové skupiny anthracyklinových glykosidů obecného vzorce I:



ve kterém znamená

R₁ vodík nebo hydroxyskupinu a

R₂ je α-L-pyranoxylový zbytek obecného vzorce II nebo III:



Tyto anthracyklinové glykosidy obsahují neutrální glykosidovou část, to znamená buďto 2,3,6-trideoxy- α -L-glycero-hexopyranosid-4-ulosyl (neboli α -L-cineruloxyl obecného vzorce II), nebo 2,6-dideoxy- α -L-hexopyranosyl (III), přičemž se označují následujícím způsobem:

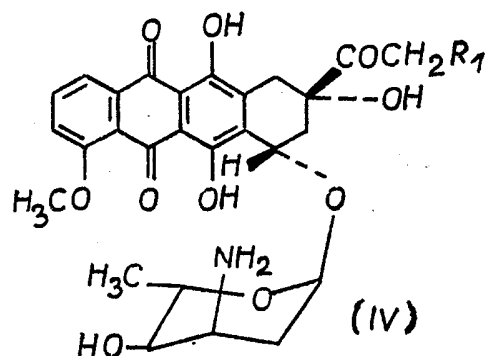
(obecného vzorce I, ve kterém $R_1 = H$, R_2 rovná se II), zde označovaný jako sloučenina obecného vzorce I-A,

2. 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-daunorubicin (obecného vzorce I, ve kterém $R_1 = H$, $R_2 = III$), zde označovaný jako sloučenina obecného vzorce I-B,

3. 3'-deamino-4'-dehydro-doxorubicin (obecného vzorce I, ve kterém $R_1 = OH$, R_2 rovná se II), zde označovaný jako sloučenina obecného vzorce I-C, a

4. 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-doxorubicin (obecného vzorce I, ve kterém $R_1 = OH$, $R_2 = III$), zde označovaný jako sloučenina obecného vzorce I-O.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy enthracyklinových glukosidů. Tyto nové sloučeniny se připraví z 3',4'-diepidaunorubicinu (obecného vzorce IV, ve kterém R_1 rovná se H) a 3',4'-diepi-doxorubicinu (obecného vzorce IV, ve kterém $R_1 = OH$). Obě tyto sloučeniny jsou běžně známými anthracyklinovými glykosidy, které jsou uváděny například ve výše uvedeném US patentu č. 4 112 076 z 5. září 1978 a jsou vyjádřeny tímto vzorcem:



Způsob přípravy nových sloučenin podle vynálezu zahrnuje deaminaci anthracyklinových glykosidů obecného vzorce IV, ve které axiální aminoskupina sousedí s ekvatoreální hydroxyskupinou, probíhající přes diazotovaný mezprodukt za vzniku obecných vzorců I-A a I-C jako výsledek migrace vodíku z polohy C-4', a sloučenin obecného vzorce I-B a I-D jednoduchou nukleofilní reakcí vody v poloze C-3'.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se vodný roztok hydrochloridu 3',4'-diepi-daunorubicinu nebo hydrochloridu 3',4'-diepidoxorubicinu shora uvedeného obecného vzorce IV, kde R_1 znamená vodík nebo hydroxyskupinu, odděleně nechá reagovat při teplotě 0°C po dobu v rozmezí od 3 do 4 hodin s dusitanem sodným a 1 N vodným

roztokem kyseliny octové, za vzniku 3'-deaminované směsi glykosidu obecného vzorce I, to jest směsi 3'-deamino-4'-dehydro-daunorubicinu obecného vzorce I, kde R_1 znamená vodík a R_2 znamená skupinu obecného vzorce II a 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-daunorubicinu obecného vzorce I, kde R_1 znamená vodík a R_2 znamená skupinu obecného vzorce III, nebo glykosidu obecného vzorce I, to jest směsi 3'-deamino-4'-dehydro-doxorubicinu obecného vzorce I, kde R_1 znamená hydroxyskupinu a R_2 znamená skupinu obecného vzorce II a 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-doxorubicinu obecného vzorce I, kde R_1 znamená hydroxyskupinu a R_2 znamená skupinu obecného vzorce III, každá směs se podrobí chromatografickému dělení na sloupci silikagelu při eluování nejprve chloroformem a potom směsí chloroformu a acetonu v objemovém poměru 97 : 3, přičemž každá z uvedených sloučenin obecného vzorce I se získá jako volná báze v čisté formě.

Uvedená deaminační reakce se při výhodném provedení vynálezu provede pomocí dusitanu sodného ve studeném vodném kyselém prostředí, ale je rovněž možno ji provést za pomoci kyslíčnicku dusitého nebo alkylidusitanů v chladném vodném prostředí nebo v alkoholickém prostředí.

Nové anthranilové glykosidy vyrobené podle vynálezu projevují protinádorový účinek. V tomto směru je možno zvláště uvést 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-doxorubicin obecného vzorce I-D, který projevuje značný účinek vůči uměle vyvolaným nádorům u myši. Z výše uvedeného důvodu se vynález také týká farmaceutických směsí, které obsahují terapeuticky účinné množství anthracyklinového glykosidu obecného vzorce I, který je smísen s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo nosičem, a dále způsobu ošetřování určitých nádorů u savců, při kterém se podává postiženému terapeuticky účinné množství sloučenin podle vynálezu.

Vynález bude v dalším detailněji ilustrován pomocí příkladů provedení s uvedeným výsledků biologických testů.

Příklad 1

3'-deamino-4'-dehydro-daunorubicin obecného vzorce I-A a 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epidaunorubicin obecného vzorce I-B

Roztok obsahující 0,55 g (1 mmol) 3',4'-diepi-daunorubicinu ve formě hydrochloridu (obecný vzorec IV, $R_1 = H$) v 25 ml vody se ochladí na teplotu 0°C a potom se zpracuje s 0,72 (7,5 mmolu) dusitanu sodného a 7,5 ml 1 N vodného roztoku kyseliny octové, která se přidá v několika podílech během 20 minut za míchání, přičemž rychlost přidávání je taková, že teplota reakce nepřevyšuje 0°C. Po 3 hodinách, kdy se směs udržuje na teplotě 0°C, se reakční

směs obsahující červeně zbarvenou sraženinu, ponechá ohřát na teplotu místnosti. Potom se roztokem ponechá probublat dusík za účelem odstranění přebytké kyseliny dusité a potom se roztok extrahuje chloroformem. Chloroformový extrakt se promyje vodou, suší bezvodým síranem sodným, odpaří na malý objem a podrobí chromatografické analýze na sloupci naplněném silikagelem. Po eluování chloroformem se získá 3'-deamino-4'-dehydro-daunorubicin obecného vzorce I-A ve formě amorfni pevné látky o teplotě tání v rozmezí od 143 do 144 °C [za rozkladu].

$[\alpha]_D^{23} = +190^\circ$ ($c = 0,05$, v methanolu).

UV a VIS spektrum — λ_{CH_3OH} :

235, 253, 290, 480, 496 a 530 nm,

$(E_{1\%}^{1\text{cm}} \text{ 808, 557, 188, 236, 242 a 143}).$

Desorpční hmotnostní spektrum:

m/z 510 (M^+), 398 a 562.

1H -NMR spektrum ($CDCl_3$):

1,36 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, CH_3-5'),
1,70—2,40 (m, 6H, H-8, H-2', H-3'),
2,41 (s, 3H, $COCH_3$),
2,97 (d, $J = 19,5$ Hz, 1H, H-10_{ax}),
3,25 (dd, $J = 19,5$ Hz, 1H, H-10_{ek}),
4,09 (s, 3H, OCH_3),
4,40 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H, H-5'),
4,62 (s, 1H, OH-9),
5,41 (m, 1H, H-7),
5,67 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, H-1'),
7,30—8,10 (m, 3H, aromatické protony),
13,29, 14,01 δ (dvě s, 2H, OH-6, OH-11).

Po další eluci pomocí směsi chloroformu a acetonu v poměru 97 : 3 se získá 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-daunorubicin obecného vzorce I-B, jehož teplota tání se pohybuje v rozmezí od 165 do 170 °C [za rozkladu].

$[\alpha]_D^{20} = +350^\circ$ ($c = 0,025$, v methanolu).

UV a VIS spektrum — $\lambda_{CH_3OH}^{max}$:

235, 254, 290, 480, 496 a 530 nm,

$(E_{1\%}^{1\text{cm}} = 714, 509, 154, 226, 231 \text{ a } 142).$

Desorpční hmotnostní spektrum:

m/z 528 (M^+), 398, 362.

1H -NMR spektrum ($CDCl_3$):

1,36 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H, CH_3-5'),
1,60—2,40 (m, 4H, H-8, H-2'),
2,41 (s, 3H, $COCH_3$),
2,86 a 3,30 (dvě d, $J = 19$ Hz, 2H, H-10),
3,5—4,0 (m, 2H, H-3', H-4'),
4,07 (s, 3H, OCH_3),
4,65 (m, 1H, H-5'),
5,25 (m, 1H, H-7),
5,48 (m, 1H, H-1'),
7,30—8,10 (m, 3H, aromatické protony),
13,26, 13,98 δ (dvě s, 2H, OH-6, OH-11).

Příklad 2

3'-deamino-4'-dehydro-doxorubicin obecného vzorce I-C a 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-doxorubicin obecného vzorce I-D

Při přípravě výše uvedených sloučenin obecných vzorců I-C a I-D se vycházelo z 3',4'-diepi-doxorubicinu [obecného vzorce IV, $R_1 = OH$], přičemž příprava byla prováděna stejným způsobem jako tomu bylo podle příkladu 1.

Získá se 3'-deamino-4'-dehydro-doxorubicin obecného vzorce I-C ve formě červeně zbarveného prášku, jehož teplota tání je 140 °C [za rozkladu].

$[\alpha]_D^{20} = +145^\circ$ ($c = 0,046$, v methanolu).

UV a VIS spektrum — $\lambda_{CH_3OH}^{max}$:

235, 254, 290, 480, 496 a 530 nm,

$(E_{1\%}^{1\text{cm}} \text{ 690, 490, 190, 228, 230, 140}).$

Desorpční hmotnostní spektrum:

m/z 526 (M^+), 414, 336.

^{13}C -NMR spektrum ($CDCl_3$):

14,9 (C-6'),
27,6 (C-2'),
33,1 (C-3'),
33,9 (C-10),
35,9 (C-8),
56,6 (O— CH_3),
65,4 (C-14),
68,9 (C-7),
71,3 (C-5'),
76,6 (C-9),
100,3 (C-1'),
118,5 (C-3),
119,8 (C-1, C-4a),
133,7 (C-6a, C-10a, C-12a),
135,8 (C-2),
155,6 (C-11),
156,1 (C-6),
161,0 (C-4),
186,9 (C-5, C-12),
210,3 (C-4'),
213,9 δ (C-13).

Podobným způsobem se získá 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-doxorubicin obecného vzorce I-D ve formě červeně zbarveného prášku, přičemž teplota tání této sloučeniny je v rozmezí od 176 do 180 °C [za rozkladu].

$[\alpha]_D^{23} = +280^\circ$ ($c = 0,046$, v methanolu).

UV a VIS spektrum — $\lambda_{CH_3OH}^{max}$:

235, 254, 290, 480, 496 a 532 nm,

$(E_{1\%}^{1\text{cm}} = 674, 478, 186, 223, 228 \text{ a } 148).$

Desorpční hmotnostní spektrum:

m/z 544 (M^+), 414, 378, 336.

¹³C-NMR spektrum (CD₃OD:CDCl₃, 1:1 obj.):

17,8 (C-6'),
33,9 (C-10),
36,3 (C-8),
3,80 (C-2'),
57,0 (OCH₃),
65,4 (C-14),
68,8 (C-7),
69,8 (C-3', C-4'),
77,0 (C-9),
77,9 (C-5'),
101,4 (C-1'),
119,3 (C-3, C-4a),
120,3 (C-1),
134,3 a 135,8 (C-6a, C-10a, C-12a),
136,5 (C-2),
155,7 (C-6, C-11),
161,6 (C-4),
187,3 (C-5),
187,6 (C-5),
214,2 δ (C-13).

Biologická účinnost

Cytotoxická účinnost nových anthracyklinových glykosidů podle uvedeného vynálezu byla testována obvyklým způsobem vůči

He La buňkám in vitro (doba působení sloučenin 24 hodin) ve srovnání s daunorubicinem a doxorubicinem. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

TABULKA 1

Test inhibice růstu kolonií s He La buňkami in vitro

Sloučenina	ID ₅₀ (ng/ml)
Daunorubicin . HCl	12
Sloučenina I-A	350
Sloučenina I-B	60
Doxorubicin . HCl	11
Sloučenina I-C	40
Sloučenina I-D	25

Určité sloučeniny podle vynálezu projevují při testování účinku vůči P-388 a L 1210 leukémiím u myši vynikající výsledky ve srovnání s výsledky, kterých je možno dosáhnout s daunorubicinem a doxorubicinem, zvláště jestliže se tyto sloučeniny podávají orálně. Výsledky týkající se protinádorového účinku sloučenin podle vynálezu vůči různým druhům leukémií u myši jsou uvedeny v následujících tabulkách 2, 3 a 4.

TABULKA 2

Protinádorový účinek u leukémie P 388. Ošetření intraperitoneální první den

Sloučenina	Dávka (mg/kg)	T/C ^a (%)	LTS ^b	Toxická smrt ^c
Daunorubicin ^d	2,9	170, 150,	0/9, 0/10	0/9, 0/10
	4,4	154, 150, 155	0/8, 0/9, 0/10	2/8, 3/9, 0/10
	6,6	145, 150, 160	0/8, 0/9, 0/10	7/8, 5/9, 0/10
Sloučenina I-A ^d	30,8	109	0/8	0/8
	30	127	0/8	0/8
	60	160, 165	0,3, 0/10	0/3, 2/10
	78	95	0/10	5/10
	101	100	1/10	5/10
Doxorubicin ^e	4,4	170	0/10	0/10
	6,6	160	0/10	6/10
Sloučenina I-B ^e	15	180	0/5	0/5
	20	290	0/5	0/5
	26	160	0/5	3/5
Doxorubicin ^e	4,4	225	0/8	0/8
	6,6	290	1/8	0/8
	10	300	2/8	0/8
Sloučenina I-C ^e	10	170	2/10	0/10
	15	180	0/8	0/8
	22,5	210	0/8	0/8
	33,7	230	1/8	0/8
Doxorubicin ^f	4,4	245, 223	0/10, 0/10	0/10, 0/10
	6,6	255, 258	1/10, 0/10	0/10, 0/10
	10	245, 282	2/10, 1/10	0/10, 0/10
Sloučenina I-D ^f	6,6	250	1/10	0/10
	10	290	3/10	0/10
	15	> 630, > 658	6/10, 6/10	0/10, 1/10
	22,5	> 630, > 658	9/10, 5/10	0/10, 2/10
	33,7	194	3/10	5/10
	50,5	76	1/10	7/10

Poznámky k tabulce č. 2:

^a střední doba přežití, v % ve srovnání s kontrolními pokusy

^b dlouhodobé přežití (alespoň 60 dnů)

^c jako toxická smrt se v tabulce 2 až 4 označuje smrt způsobená toxickým působením látky; zjištěno na základě pitevních nálezů u mrtvých myší

^d hodnoty ze tří pokusů

^e látka rozpuštěna v 10% roztoku povrchově aktivní látky (Tween 80)

^f látka rozpuštěna nebo suspendována ve vodě, hodnoty ze dvou pokusů.

TABULKA 3

Účinek sloučeniny I-D vůči leukémii u myší

Nádor	Způsob		Den	Ošetření Pro- středí	Sloučenina	Dávka (mg/kg)	T/C ^a (%)	LTS ^b	Toxická smrt ^c
Grossův	iv	iv	1	H ₂ O	Doxorubicin	10	200	0/8	0/8
						13	241, 275	0/18	1/18
						16,9	233, 175	1/18	6/18
					Sloučenina I-D	13,3	183	0/7	0/7
						26,6	225	0/8	0/8
						39,9	250	0/8	3/8
		orální	1	Tween ^e	Sloučenina I-D	26	133	0/7	0/7
						33,9	158	0/10	0/10
						44	158	0/10	0/10
L 1210	ip	ip	1	Tween ^e	Doxorubicin	4,4	166	0/10	0/10
						6,6	166	0/10	0/10
						10	177	3/10	0/10
					Sloučenina I-D	8,8	> 600	3/6	0/6
						13,3	505	3/8	0/6
						20	238	0/8	2/8
	iv	iv	1	Tween ^e	Doxorubicin	10	157	0/10	0/10
						13	178	0/10	0/10
						16,9	185	0/10	0/10
					Sloučenina I-D	13,3	185	0/9	0/9
						20	264	0/9	0/8
						30	600	3/8	0/8

Poznámka:

a, b, c mají stejný význam jako v tabulce č. 2

^d hodnoty ze dvou pokusů

^e povrchově aktivní látka Tween 80, 10% roztok ve vodě.

TABULKA 4

Účinek sloučeniny I-C vůči Grossově leukémii

Sloučenina	Prostředí	Způsob	Dávka (mg/kg)	T/C ^a (%)	LTS ^b	Toxická smrt ^c
Doxorubicin	Tween 80 ^d	iv	13 ^e	214, 275, 242	0/20	0/20
			16,9 ^e	228, 175, 250	1/28	8/28
Sloučenina I-C	Tween 80 ^d	iv	40 ^f	185, 250	0/17	2/17
			48	116	0/10	7/10
			57,6	116	0/10	10/10
Sloučenina I-C	Tween 80 ^d	orálně	40	192	0/8	0/8
			48	200	0/8	0/8
			57,6	200	0/8	2/8

Poznámky k tabulce č. 4:

a, b, c mají stejný význam jako v tabulce č. 2

^d má stejný význam jako v tabulce č. 3

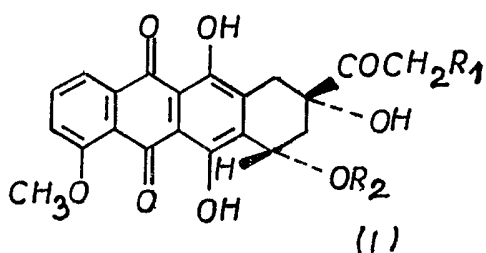
^e hodnoty ze tří pokusů

^f hodnoty ze dvou pokusů.

V rámci vynálezu je možno provádět určité modifikace a alternativní řešení, aniž by se vybočilo z rozsahu uvedeného vynálezu.

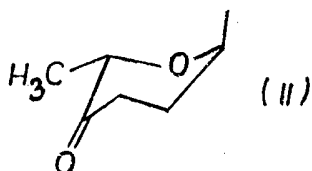
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy 3'-deaminovaných analogů glykosidových anthracyklinových antibiotik obecného vzorce I

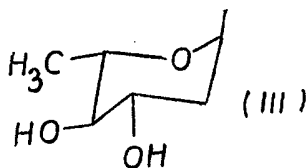


kde

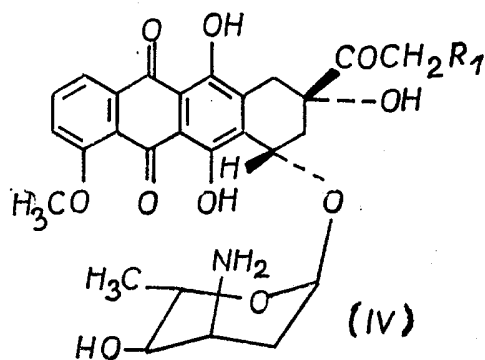
R₁ značí vodík nebo hydroxyskupinu a
R₂ znamená skupinu obecného vzorce II



nebo obecného vzorce III



vyznačující se tím, že se vodný roztok hydrochloridu 3',4'-diepi-daunorubicinu nebo hydrochloridu 3',4'-diepi-doxorubicinu obecného vzorce IV



kde

R₁ znamená vodík nebo hydroxyskupinu, odděleně nechá reagovat při teplotě 0 °C po dobu v rozmezí od 3 do 4 hodin s dusitanem sodným a 1 N vodným roztokem kyseliny octové, za vzniku 3'-deaminované směsi glykosidu obecného vzorce I, to jest směsi 3'-deamino-4'-dehydrodaunorubicinu obecného vzorce I, kde R₁ znamená vodík a R₂ znamená skupinu obecného vzorce II a 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-daunorubicinu obecného vzorce I, kde R₁ znamená vodík a R₂ znamená skupinu obecného vzorce III, nebo glykosidu obecného vzorce I, to jest směsi 3'-deamino-4'-dehydro-doxorubicinu obecného vzorce I, kde R₁ znamená hydroxyskupinu a R₂ znamená skupinu obecného vzorce II a 3'-deamino-3'-hydroxy-4'-epi-doxorubicinu obecného vzorce I, kde R₁ znamená hydroxyskupinu a R₂ znamená skupinu obecného vzorce III, každá směs se podrobí chromatografickému dělení na sloupci silikagelu při eluování nejprve chloroformem a potom směsí chloroformu a acetonu v objemovém poměru 97 : 3, přičemž každá z uvedených sloučenin obecného vzorce I se získá jako volná báze v čisté formě.