



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

268 512

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 31/70
C 07 H 15/24

(21) PV 5423-83.I
(22) Přihlášeno 19 07 83

(40) Zveřejněno 12 07 89
(45) Vydáno 28 09 90

(72) Autor vynálezu

MOSHER CAROL WALKER, STANDFORD,
TONG GEORGE LOW, CUPERTINO,
ACTON EDWARD MC INTOSH, MENLO PARK, CALIFORNIA
(US)

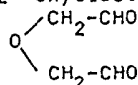
(73) Majitel patentu

SRI INTERNATIONAL, MENLO PARK,
CALIFORNIA (US)

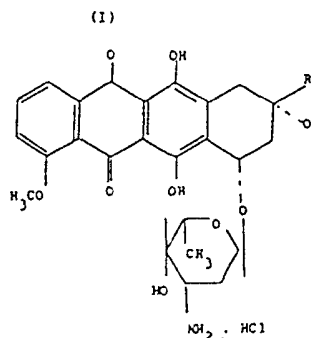
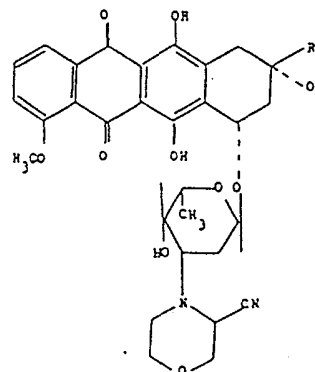
(54)

Způsob výroby nových morfolinových derivátů
daunorubicinu a doxorubicinu

(57) Způsob výroby nových morfolinových derivátů daunorubicinu a doxorubicinu obecného vzorce I, kde R znamená skupinu $-\text{CO}-\text{CH}_3$, $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{OH}$ a $-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$, přičemž se uvede v reakci sloučenina obecného vzorce II, kde R znamená skupinu $-\text{CO}-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{OH}$, $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$, ve směsi vody a polárního organického prostředí s 2,2'-oxydiacetaldehydem vzorce



připraveným in situ rozštěpením 1,4-anhydroerythritolu ve vodném prostředí jodistanem sodným při teplotě místnosti, reakce se provádí za přítomnosti kyanborohydridu alkalického kovu, například kyanborohydridu sodného nebo draselného a surový reakční produkt, získaný po uzavření morfolinového kruhu se rozdělí na neutrální a alkalickou frakci a neutrální frakce se chromatograficky čistí, čímž se získá čistý produkt obecného vzorce I.



Vynález se týká způsobu výroby nových derivátů daunorubicinu a doxorubicinu. Tyto deriváty je možno použít jako protinádorové látky.

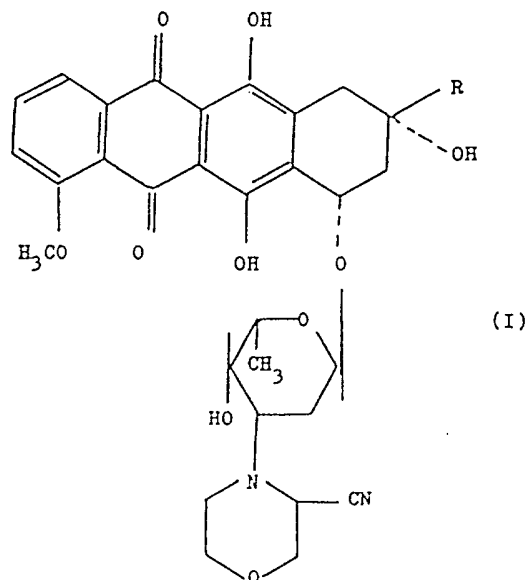
Doxorubicin (adriamycin) popsáný v US patentovém spisu č. 3 590 028 (F. Arcamone a další) je pravděpodobně nejúčinnější současně používanou protinádorovou látkou. Současně s daunorubicinem se užívá k léčbě celé řady nádorů a také leukemie. Někteří nemocní s těmito nádory, zejména s některými závažnými typy nádorů, jako jsou nádory tlustého střeva a melanom však na tuto léčbu příznivě nereagují. Mimoto u některých nemocných při delší léčbě dochází k neléčitelnému poškození srdce, které může samo vést k smrti. Z tohoto důvodu by bylo zapotřebí nalézt analogické látky se širokým účinkem a s nižší toxicitou vzhledem k srdečnímu svalu. Až dosud byly při rozsáhlém výzkumu získány některé účinné nové analogy, například sloučeniny, účinné proti myší leukemii P388, jde o dva lipofilní deriváty AD32 a N,N-dibenzyl-daunorubicin, při jejich použití je však zapotřebí užít vysokých dávek a mimoto tyto látky nepůsobí na DNA in vitro, přestože DNA je pravděpodobně primárním biologickým cílem účinných antracyklinových derivátů. Většina N-alkylových derivátů byla rovněž účinná proti myší leukemii P388, tato účinnost se však nijak významně nelišila od účinnosti doxorubicinu nebo daunorubicinu. Některé z těchto derivátů byly neúčinné.

Známe deriváty doxorubicinu a jeho antracyklinových analogů jsou popsány v publikaci David W. Henry, "Adriamycin", ACS Symposium Series, č. 30, Cancer Chemotherapy, American Chemical Society, str. 15 až 57 (1976) a v knize Doxorubicin (Federico Arcamone, Academic Press, 1981. Sloučenina AD32 byla popsána v US patentovém spisu č. 4 035 566 z 12. července 1977.

3'-deamino-3'-(4-morfolinyl)-daunorubicin, uváděný v US patentovém spisu č. 4 301 277 ze 17. listopadu 1981 (Edward M. Acton a Carol W. Mosher) je účinný v 1/40 dávky doxorubicinu, má však v podstatě stejnou hodnotu T/C, tj. 166 % ve srovnání 160 pro P388. Tato látka a její výroba je rovněž uvedena v publikaci Carol W. Mosher, Helen Y. Wu, Allan N. Fujiwara a Edward M. Acton "Enhanced Antitumor Properties of 3'-(4-Morpholinyl) and 3'-(4-Methoxyl-1-piperidinyl) Derivatives of 3'-Deaminodaunorubicin", J. Medicinal Chem., 25, str. 18 až 24 (1982).

Obecný postup reduktivní alkylace při získávání nových polosyntetických antracyklinových derivátů byl popsán v publikaci G. L. Tong, H. Y. Wu, T. H. Smith a D. W. Henry "Adriamycines With Enhanced Efficacy and Reduced Cardiotoxicity", J. Medicinal Chem., 22, str. 912 až 918 (1979).

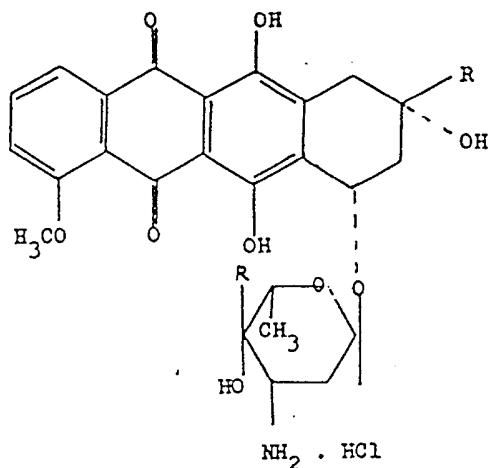
Nyní byla nalezena skupina nových derivátů daunorubicinu a doxorubicinu. Tyto sloučeniny je možno vyjádřit obecným vzorcem I



kde

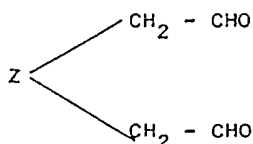
R znamená skupinu $-\text{CO}-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$ v případě derivátů daunorubicinu nebo $-\text{COCH}_2\text{OH}$ nebo $-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ v případě derivátů doxorubicinu.

Sloučeniny obecného vzorce I je možno získat tak, že se uvede v reakci derivát daunorubicinu nebo doxorubicinu obecného vzorce



kde

R znamená skupinu $-\text{CO}-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$,
ve směsi vody a polárního organického prostředí se sloučeninou obecného vzorce



nebo s vhodným prekursorem této látky,

kde

Z znamená atom kyslíku,

reakce se provádí v přítomnosti kyanborohydridu, například kyanborohydridu alkalického kovu, výsledné látky se izolují a čistí známým způsobem. Získané sloučeniny jsou příbuzné známým protinádorovým látkám, daunorubicinu a doxorubicinu (adriamycin) a připravují se z těchto látek chemickým způsobem tak, že se vytváří vhodné deriváty uvedených látek, které jsou rovněž účinné proti nádorům. Tyto látky zřejmě spojují obě výhody, a to vysokou protinádorovou účinnost a možnost použití nízkých dávek. Z tohoto důvodu jsou také nižší vedlejší účinky, například kardiotoxicita ve srovnání se známými sloučeninami.

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu je možno zpracovat na farmaceutické prostředky pro léčbu nádorů běžným způsobem:

Kyanmorfolinyllové deriváty daunorubicinu a doxorubicinu, jsou uvedeny v následující tabulce I.

T a b u l k a I

R	Název sloučeniny
CO-CH ₃	3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)daunorubicin
CHOH-CH ₃	3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin
CO-CH ₂ OH	3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)doxorubicin
CHOH-CH ₂ OH	3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicin

Čtyři z těchto sloučenin jsou nejvýhodnější pro svou velmi dobrou účinnost proti nádorům. Jde o následující látky:

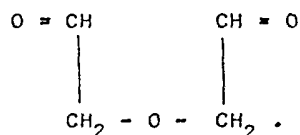
3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)doxorubicin
 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicin,
 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)daunorubicin a
 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin.

První z těchto látek je nejvýhodnější.

Způsob výroby některých výhodných sloučenin.

Uvedené látky je možno získat následujícím obecným způsobem:

Nejprve se běžně dodávaný daunorubicin nebo doxorubicin ve formě své adiční soli s kyselinou uvede v reakci za podmínek reduktivní alkylace s 2,2'-oxodiacetaldehydem vzorce



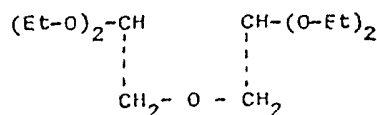
Touto alkylací se získá směsný produkt, který obsahuje čtyři hlavní složky. V případě použití daunorubicinu jsou těmito složkami následující čtyři sloučeniny:

3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)daunorubicin,
 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin,
 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)daunorubicin a
 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin.

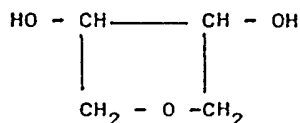
V případě doxorubicinu jsou těmito složkami následující čtyři sloučeniny:

3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)doxorubicin,
 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicin,
 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)doxorubicin a
 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicin.

2,2'-oxodiacetaldehyd je možno získat hydrolýzou 2,2'-oxydiacetaldehyd-bis(diethyl-acetalu) v kyselém prostředí. Výchozí látku je možno vyjádřit vzorcem



postup se provádí způsobem podle belgického patentového spisu č. 655 436 (Field a další), tutéž látku je možno získat také štěpením 1,4-anhydroerythritolu vzorce



způsobem podle publikací Barry a další Carbohydrate Research, 7, 299 (1968) a Greenberg a další Carbohydrate Research, 35, 195 (1974).

Reduktivní alkylaci je možno provádět při použití přebytku dialdehydu ve směsi vody a polárního organického prostředí, například ve směsi vody a acetonitrilu, obvykle při pH 7 za přítomnosti redukčního činidla, například kyanborohydridu alkalického kovu, jako kyanborohydridu sodného nebo draselného. Jde o velmi snadno proveditelnou reakci, která je obvykle dovršena v průběhu 1 hodiny nebo v průběhu ještě kratší doby při teplotě místnosti. Reduktivní alkylace je podrobněji vysvětlena v následujících příkladech a je také užita v US patentovém spisu č. 4 301 277 a popsána v J. Medicinal Chem., 25, str. 18 až 24 (1982).

Reakční směs je možno zpracovávat jakýmkoliv způsobem, který zajistí požadovanou izolaci a dobré oddělení reakčního produktu. Extrakce reakčního produktu kyselinou je účinná při extrakci materiálů, které neobsahují kyanoskupinu z materiálů, které nejsou v kyselině rozpustné a kyanoskupinu obsahují. Výsledné páry materiálů je možno rozdělit na jednotlivé látky chromatograficky, například chromatografií na sloupci, chromatografií na tenké vrstvě nebo vysokotlakou kapalinovou chromatografií.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

Příprava, izolace a identifikace 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4"-morfolinyl)daunorubicinu a 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4"-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicinu.

Roztok 31,5 g (0,30 molu) 1,4-anhydroerythritolu ve 400 ml vody se míchá a chladí v lázni se směsí vody a ledu a současně se po malých podílech přidává 53,0 g (0,25 molu) jodistanu sodného. Směs se míchá ještě 1 hodinu při teplotě místnosti, přičemž se vyloučí malé množství jodičnanu sodného. Směs se nechá stát přes noc a pak se pH upraví na 7,3 několika kapkami nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a přidá se ještě 50 ml vody, aby vznikl čirý roztok.

Roztok 9,2 g (16,3 mmol) daunorubicinhydrochloru v 50 ml směsi methyلكyanidu a vody v poměru 1 : 1 se přidá k roztoku dialdehydu a směs se míchá při teplotě místnosti. Po 45 minutách míchání se směs zakalí a vyloučí se malé množství pevné látky. Po přidání 75 ml methyلكyanidu se pouze část této pevné látky rozpustí. Pak se přidá roztok 2,02 g (32,6 mmol) kyanborohydridu sodného v 6 ml vody. Směs se ještě 1 hodinu míchá, pak se zředí vodou a extrahuje se 5 x 200 ml chloroformu. Pevný podíl v množství 0,91 g, který se nerozpustí v žádné fázi, se oddělí filtrací.

Po odpaření chloroformu obsahuje surový reakční produkt 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-daunorubicin, 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin, 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4"-morfolinyl)-daunorubicin a 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4"-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin. 5,4 g pevného surového produktu se rozpustí v 500 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 9 : 1. Tento roztok se promyje 0,01 N kyselinou chlorovodíkovou (3 x 100 ml), dále 100 ml vody a 100 ml zředěného hydrogenuhličitanu sodného. Organická fáze se vysuší, odpaří se do sucha a odparek se suší ve vakuu při tlaku 13,3 Pa a při teplotě místnosti, čímž se získá 5,10 g sklovitého produktu.

5,09 g tohoto sklovitého produktu se rozpustí v 50 ml směsi methyldichloridu a methanolu v poměru 4 : 1. K tomuto roztoku se za stálého míchání po kapkách přidá 30 ml methylkyanidu. Získá se zakalený roztok, který se odpaří do sucha, čímž se získá polotuhý odparek, který se ve tmě rozetře s 200 ml methylkyanidu. Nerozpustný podíl se oddělí a podruhé se rozetře se 100 ml methylkyanidu. Kapalná fáze z obou postupů obsahuje požadovaný produkt. Tyto kapalně fáze se spojí a odpaří, čímž se získá 2,23 g polotuhého odparku, který je surovou směsí 3'-deamino-3'-(3"-kyano-4"-morfolinyl)daunorubicinu a 3'-deamino-3'-(3"-kyano-4"-morfolinyl)-13-dihydradaunorubicinu.

Polotuhý odparek se pak rozpustí v 5 ml methyldichloridu a nanese se na sloupec o rozměrech 3,1 x 59 cm, který je naplněn silikagelem (Mallinckrodt Silic AR CC-7) o průměrné velikosti částic 200 až 325 mesh v methylenchloridu. Sloupec se vymývá 500 ml methylenchloridu a pak směsí methylenchloridu a methanolu nejprve v množství 1 500 ml a poměru 99 : 1, pak 1 000 ml této směsi v poměru 98 : 2, pak 1 500 ml této směsi v poměru 97 : 3 a nakonec 500 ml této směsi v poměru 90 : 10. Odebírají se frakce po 10 ml, eluce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě. Po odebrání 2 550 ml počátečního eluátu se odebere frakce o objemu 190 ml a tato frakce se odpaří, čímž se získá 0,48 g produktu. Primární složka se stanoví vysokotlakou kapalnou chromatografií a chromatografií na tenké vrstvě, čímž je možno prokázat, že běží o málo čistý 3'-deamino-3'-(3"-kyano-4"-morfolinyl)daunorubicin.

Vzorek 0,35 g tohoto materiálu se dále čistí nejprve ve tmě na pěti silikagelových plotnách o rozměrech 2 mm x 20 x 20 cm, plotny se dvakrát vymyjí se směsí methyldichloridu a methanolu v poměru 29 : 1. Vyřízne se střední pás, který obsahuje 65 % hmotnosti vzorku, materiál se vymyje, roztok se zfiltruje a odpaří do sucha spolu s dalšími podobným způsobem čištěnými materiály, které se získají v množství 0,18 g, načež se vzorek čistí na sloupci silikagelu o rozměru 1,1 cm x 27 cm, silikagel má průměrnou velikost částic 200 až 400 mesh. Sloupec se vymývá směsí methylenchloridu a ethylacetátu, a to nejprve 30 ml směsi v poměru 80 : 20, 30 ml směsi v poměru 60 : 40, 30 ml směsi v poměru 40 : 60 a 30 ml směsi v poměru 20 : 80, nakonec se užije 175 ml ethylacetátu. Po odebrání 162 ml počátečního eluátu (frakce o 2 ml se sledují chromatografií na tenké vrstvě) se odebere frakce o objemu 88 ml a tato frakce se odpaří, čímž se získá 0,15 g čistého výsledného produktu.

Elementární analýzou tohoto čistého materiálu stejně jako NMR spektrem při 360 MHz, spektrem v ultrafialovém světle, infračerveném světle a hmotovou spektroskopii je možno prokázat, že běží o 3'-deamino-3'-(3"-kyano-4"-morfolinyl)daunorubicin.

Výskyt tohoto produktu ve formě diastereoisomerní směsi byl prokázán vysokotlakou kapalinovou chromatografií a NMR spektrem při 360 MHz. Při vysokotlaké kapalinové chromatografii při použití sloupce Waters Radial-Pak C-18 a 0,05M citrátového pufru o pH 4 a methylkyanidu v poměru 60 : 40 při rychlosti 2 ml za minutu je možno prokázat dva blízko sebe uložené vrcholy za 9,6 a 10,2 minut v poměru 53 : 44. Při NMR spektru při 360 MHz je možno prokázat dvojí rezonanci pro 6-OH, 11-OH, 1-H, 2-H, 3-H, 1'-H, 7-H, 9-OH, 10A-H, 14-H₃ a 6-H₃ - protony.

NMR spektrum při 360 MHz v CDCl₃ má maxima při δ 13,99, 13,98 (2s, 6-OH), 13,25, 13,24 (2s, 11-OH), 8,02, 8,00 (2d, 1-H), 7,79, 7,77 (2t, 2-H), 7,40, 7,38 (2d, 3-H), 5,59, 5,56 (2d, 1'-H), 5,29, 5,26 (2bs, 6-H), 4,47, 4,34 (2s, 9-OH), 4,08 (s, OCH₃), 3,97 - 4,07 (m, 2" B-H), 3,92 (t, J = 12Hz 3" -H), 3,74 (m, 2"A-H, 6"B-H), 3,68 (bs, 4'H), 3,58 (t, J = 12Hz, 6"A-H), 3,20 (d, J = 19Hz, 10B-H), 2,91, 2,90 (2d, J = 19Hz, 10A-H), 2,75 - 2,95 (m, 3' - H), 2,68 (m, 5"-H₂), 2,43, 2,42 (2s, 14-H₃), 2,35 (m, 8B).

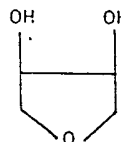
Silikagelový sloupec Mallinckrodt Silic ARCC-7 se po eluci 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4'-morfolinyl)daunorubicinu dále vymývá směsí methyldichloridu a methanolu v objemovém poměru 90 : 10. Po odebrání 3 460 ml eluátu se odebere frakce o objemu 430 ml, která obsahuje 12,5 % původního materiálu ve formě jediné sloučeniny. Tato frakce se odpaří a sloučenina se identifikuje jako nečistý 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4'-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin, který se dále čistí způsobem, který byl uveden pro jeho nehydrogenovaný analog, čímž se získá v podstatě čistý výsledný produkt.

Spektrum při 360 MHz v CDCl_3 je podobné NMR spektru pro první produkt z příkladu 1 s tím rozdílem, že 14-H_3 rezonance ($2,43, 2,42 \delta$, 2s) je posunuta směrem vzhůru ($1,32, 1,30 \delta$, 2d, $J = 6,4 \text{ Hz}$). Hmotové spektrum ve formě trimethylsilylového derivátu (TMS) má m/e 957, $[\text{M}(\text{TMS})_5\text{-HCN}]$, 885 $[\text{M}(\text{TMS})_4\text{-HCN}]$. Při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu při použití směsi chloroformu a methanolu v poměru 19 : 1 je R_f 0,8.

Příklad 2

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4'-morfolinyl)doxorubicinu a 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4'-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicinu.

K roztoku 6,25 g (60,0 mmol) 1,4-anhydroerhritolu



v 75 ml vody, zchlazené na vodní lázni na teplotu 15 až 20 °C se za stálého míchání přidá 6,42 g (30,0 mmol) metajodistanu sodného. Výsledný čirý roztok se míchá při teplotě místnosti 17 hodin. Pak se pH roztoku upraví na rozmezí 4,0 až 7,3 přidáním hydrogenuhličitanu sodného, načež se roztok za stálého míchání zředí 75 ml methylkyanidu. Vytvoří se sraženina. Pak se za stálého míchání přidá 0,126 g (2 mmol) kyanoborohydridu sodného v 5 ml směsi methylkyanidu a vody v objemovém poměru 1 : 1. K výsledné směsi se pak přidá 1,16 g (2,0 mmol) doxorubicinhydrochloridu ve 30 ml směsi methylkyanidu a vody v poměru 1 : 1. Po 10 minutách se reakční směs zředí 50 ml zředěného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a pak se 3x extrahuje vždy 50 ml chloroformu. Tento surový extrakt obsahuje 3'-deamino-3'-(4'-morfolinyl)doxorubicin, 3'-deamino-3'-(4'-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicin, 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4'-morfolinyl)doxorubicin a 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4'-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicin. Extrakty se slíjí a 5x se extrahuje vždy 25 ml kyseliny octové o koncentraci 0,1 N a pak vodou, promyje se zředěným hydrogenuhličitanem sodným a nasyceným vodným roztokem chloridu sodného. Kyselá vodná fáze se odloží. Chloroformová fáze se vysuší síranem sodným, zfiltruje se přes infuzoriovou hlinku Celit a odpaří se, odparek se rozpustí ve 25 ml chloroformu a rozpouštědlo se znovu odpaří ve vakuu při teplotě místnosti. Tímto způsobem se ve výtěžku 40 % získá 0,518 g tmavě červeného pěnovitého sklovitého produktu.

0,424 g tohoto produktu se rozpustí v 1,5 ml methyldichloridu a roztok se nanesne na sloupec o rozměrech 1,5 x 35,5 cm, naplněný silikagelem Bio-Sil A o průměru částic 200 až 400 mesh v methyldichloridu. Sloupec se promyje 50 ml methyldichloridu a pak se vymývá směsí methyldichloridu a methanolu, a to nejprve 150 ml směsi v poměru 99 : 1, 150 ml směsi v poměru 98 : 2, 300 ml směsi v poměru 97 : 3, 100 ml směsi v poměru 95 : 5 a 300 ml směsi v poměru 90 : 100. Nejprve se odebere 445 ml počátečního eluátu, načež se frakce o 80 ml odpaří, čímž se získá 0,217 g produktu. Tento materiál se spojí s 0,039 g čištěného produktu z jiné přípravy a směs se rozpustí ve 2 ml methylenchloridu, roztok se zředí 10 ml methanolu a odpaří se do sucha. Tento odparek se rozetře s 5 ml methanolu, čímž se získá 0,218 g 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4'-morfolinyl)doxorubicinu.

Vysokotlakou kapalinovou chromatografií a NMR analýzou při 400 MHz je možno prokázat, že produktem je diastereoisomerní směs. Při vysokotlaké kapalinové chromatografii na sloupci Waters Radial-Pak C-18 při použití 0,05 M citrátového pufru o pH 4 a methylcyanidu v poměru 65 : 35 při rychlosti 2 ml/min, je možno prokázat dva blízké vrcholy při 14,4 a 15,7 minutách v poměru 58 : 39. NMR spektrum tohoto materiálu při 400 MHz má dvojí rezonanci pro 1-H, 2-H, 3-H, 1'-H, 7-H, 14-H₂, 9-OH, OCH₃, 10A-H a 6'-H₃-protony.

NMR spektrum při 400 MHz v CDCl₃ má maxima při δ 14,02 (s, 6-OH), 13,26 (s, 11-OH), 8,05, 8,04 (2d, 1-H), 7,80, 7,79 (2t, 2-H), 7,41, 7,40 (2d, 3-H), 5,61, 5,57 (2d, 1'-H), 5,34, 5,30, (2m, 7-H), 4,79, 4,78 (2s, 14-H₂), 4,54, 4,42 (2s, 9-OH), 4,11, 4,10, (2s, OCH₃), 4,05 (m, 5'-H), 3,97 (m, 2'-B-H, 3'-H, 6'-B-H), 3,71 (m, 4'-H, 6'-A-H), 3,58 (t, 2'-A-H), 3,30 (d, J = 19 Hz, 10B-H), 3,07, 3,06 (2d, 10A-H), 3,03 (m, 3'-H), 2,69 (m, 5'-H₂), 2,38 (m, 8B-H), 2,22 (m, 8A-H), 1,84 (m, 2'-H₂), 1,61 (s, H₂O), 1,40, 1,39 (2d, J = 6,5 Hz, 6'-H₃).

Absorpční spektrum v ultrafialovém světle v methanolu má maxima při 234 nm (ϵ 40,100), 252 (27,700), 289 (9,420), 478 (13,000), 495 (13,000), 495 (12,900), 530 (7,190).

Hmotové spektrum ve formě trimethylsilylového (TMS) derivátu, m/e 899 M(TMS)₄-HCN.

Analýza pro C₃₂H₃₄N₂O₁₂·2H₂O

vypočteno: C 56,97, H 5,68, N 4,15 %

nalezeno: C 57,07, H 5,37, N 4,17 %.

Při další eluci sloupce se získá 0,041 g 3'-deamino-3'-(3'-kyano-4'-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicinu.

Spektrum v ultrafialovém světle v methanolu má maxima při 234 nm (ϵ 37,400), 252 (28,000), 289 (9,390), 475 (12,700), 496 (12,800), 530 (7,410). Hmotové spektrum ve formě trimethylsilylového derivátu (TMS), m/e 985 M(TMS)₅-CH₃, 973 M(TMS)₅-HCN.

Analýza pro C₃₂H₃₆N₂O₁₂·1,5 H₂O

vypočteno: C 57,57, H 5,89, N 4,20 %

nalezeno: C 57,35, H 5,94, N 3,82 %.

Sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu je možno použít u savců proti zhoubným nádorům. Tato jejich účinnost byla ověřena pokusy in vivo i in vitro. Při jednom pokusu in vivo, který byl proveden podle publikace Cancer Chemotherapy Reports, National Cancer Institute, 3, č. 2, část 3, září 1972, bylo zdravým myším intraperitoneálně naočkováno určité množství břišního výpotku lymfocytární leukemie P-388. Po naočkování byly myši léčeny 5., 9. a 13. dne různým množstvím sloučenin, vyrobených způsobem podle vynálezu. Kontrolami byly neléčené myši, další myši byly léčeny pro srovnání daunorubicinem nebo doxorubicinem: 3'-deamino-3'-(4'-morfolinyl)daunorubicin nebo 3-deamino-3'-(4'-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin podle US patentu č. 4 301 277 nebo 3'-deamino-3'-4'-methoxy-1-piperidinyl)-daunorubicin nebo jeho 13-dihydroekvivalent podle US patentového spisu č. 4 314 054.

Byla stanovena průměrná doba přežití u různě ošetřených myší a tato doba byla srovnána s kontrolními neléčenými zvířaty. V následující tabulce A jsou uvedeny získané údaje jako % T/C, což znamená dobu přežití léčených myší, dělenou dobou přežití kontrolních myší x 100. Jak je zřejmé z tabulky A, byly sledovány různé dávky u jednotlivých sloučenin tak, aby bylo možno dosáhnout největšího zlepšení.

T a b u l k a A

Účinnost proti leukemii Leukemia P-388 u myších L-1210 buněk.

sloučenina	NSC č. ^x	Doba přežití % T/C	Optimální dávka (q4d, 5, 9, 13) (mg/kg)	Inhibice syntézy	
				ED ₅₀ DNA	UM RNA
3'-deamino-3'-(3'-kyan-4'- -morfolinyl)daunorubicin	332,304	197	0,4	0,12	0,002
3'-deamino-3'-(3'-kyan-4'- -morfolinyl)13-dihydro- daunorubicin	332,305	143	0,1	0,019	0,002
3'-deamino-3'-(3'-kyan-4'- -morfolinyl)doxorubicin	357,704	187	0,075	0,003	0,0005
3'-deamino-3'-(3'-kyan-4'- -morfolinyl)13-dihydro- doxorubicin	360,291	150	0,2	0,021	0,0030
Pro srovnání:					
daunorubicin	82,151	130	8	0,66	0,33
doxorubicin	123,127	130	8	1,5	0,58

^x NSC č. = registrační číslo National Service Center of US National Cancer Institute

3'-deamino-3'-(4'-morfolinyl)- -daunorubicin	327,451	166	0,2	0,76	0,10
3'-deamino-3'-(4'-morfo- linyl)-13-dihydrodauno- rubicin	327,450	132	0,2	2,2	0,67

Výsledky ukazují, že sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu mají dobrou, až velmi dobrou protinádorovou účinnost in vivo v nízkých optimálních dávkách. Sloučenina č. NSC 357 704 má optimální dávku přibližně 1/150 optimální dávky původních látek. I další sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu mají optimální dávku daleko nižší než daunorubicin a doxorubicin, což je slibné při hledání protinádorových látek se sníženou toxicitou na srdeční sval.

Při testech in vitro s použitím 3'-deamino-3'-(3'-kyan-4'-morfolinyl)daunorubicinu a 3'-deamino-3'-(3'-kyan-4'-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicinu bylo rovněž možno prokázat vysokou účinnost této skupiny látek. Tyto materiály byly zkoumány jako inhibitory syntézy DNA a RNA u leukémie L-1210 způsobem, popsaným v publikaci G. Tong, W. W. Lee, D. R. Black a D. W. Henry, J. Medicinal Chem., 19, 395 (1976). Sloučeniny byly účinné v dávkách až 600x nižších než jsou potřebné dávky daunorubicinu, doxorubicinu nebo jejich dříve známých analogů. Bylo také možno pozorovat, že působí vyšší inhibici syntézy RNA než DNA ED 50 pro poměr DNA/RNA = 10 k 11. Jak bylo uvedeno v publikaci S. T. Crooke a další, Mol. Pharmacol., 14, 290 (1978), takový poměr prokazuje u třídy II anthracyklinů dobré léčebné vlastnosti. Údaje o inhibici jsou rovněž uvedeny v tabulce A.

Z údajů v tabulce A je zřejmé zvýšená protinádorová účinnost u derivátů s morfolinovou strukturou a kyanomorfolinovou strukturou, která je zřejmě typická pro tuto skupinu látek.

Další testy in vivo u myši proti leukemii P-388 a L-1210 a melanomu B-16 byly provedeny podle svrchu uvedené publikace Cancer Chemotherapy Reports 1972. Byly sledovány různé cesty podání, například intraperitoneálně, nitrožilně a perorálně, výsledky jsou uvedeny v následující tabulce B.

T a b u l k a B

Protinádorová účinnost u myši v optimální dávce XT/C (mg/kg)

sloučenina NSC č.	daunorubicin 82151 ^x	doxorubicin 123127 ^x	327451(4) ^x	327450(I) ^x	332304	332305
<u>ip L1210</u>						
d 1, ip		168(5)				
q3d 1,5,9, ip						
qd 1-9, ip		173(1)				
<u>ip P388</u>						
d 1, ip		252(7,5)	155(0,25)		175(0,25)	
d 1, ip		185(10)	152(0,5)		157(0,5)	
q4d 1,5,9, ip		257(4)				
q4d 1,5,9, po						
qd 1-9, ip		>285(2)				
<u>ip B16d</u>						
d 1, ip		>197(20)				
q4d 5,9,13, ip		129,146(3)				
<u>ip B16</u>						
d 1, ip	195(4)	292(4)	135(0,25)	121(0,25)	138(0,15)	131(0,0375)

sloučenina NSC č.	354646(2) ^x	355277(3)	357704	360291
<u>ip L1210</u>				
d 1, ip	152(0,05)		164(0,025)	152(0,025)
q4d, 1,5,9,ip			>164(0,0125)	128(0,05)
qd 1-9, ip	>141(0,025)		166(0,0063)	>148(0,025)
<u>ip P388</u>				
d 1, ip	182(0,05)	>193(2)	262(0,0125)	183(0,05)
d 1, iv	>143(0,062)	166(2,5)	152(0,05)	
q4d 1,5,9,ip	224(0,05)			
q4d 1,5,9,po	175(0,05)		>158(0,1)	
qd 1-9, ip	209(0,0125)		>360(0,0063)	267(0,025)
<u>ip B16d</u>				
d 1, ip			>138(0,0063)	149(0,025)
q4d 5,9,13,ip			123(0,0125)	121(0,025)
<u>ip B16</u>				
d 1, ip				

Vysvětlivky k tabulce B:

* známé látky pro srovnání

- (1) 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydrodaunorubicin (bod 4 patentu US 4 031 277)
- (2) 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)doxorubicin (bod 6 patentu USA 4 301 277)
- (3) 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicin (bod 5 patentu US 4 301 277).

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu včetně svých solí mohou být podávány jakoukoli cestou, například perorálně a parenterálně, tj. nitrožilně, intraperitoneálně, podkožně nebo nitrosvalově. Výhodná je zejména parenterální aplikace, zvláště nitrožilní. Dávky a množství tak jak bylo svrchu udáno je možno užít ke zlepšení leukemie nebo jiného typu zhoubného nádoru, proti němuž jsou tyto látky účinné. Například při léčbě malých pokusných zvířat je možno užít dávek 0,0010 až 25 mg/kg denně ke zlepšení leukemie. Horní hranice dávky je dávka, která již může vyvolat toxické vedlejší účinky a u pokusných zvířat se stanoví pokusem a omylem. Obvykle je dávka sloučenin, vyrobených způsobem podle vynálezu přibližně 1/20 až 1/200 původních sloučenin. Je možno podávat jednu dávku každých 2 až 7 dnů, je však možno užít i kratších intervalů mezi jednotlivými dávkami těchto sloučenin.

Sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu a jejich soli je možno zpracovávat na farmaceutické prostředky, zvláště na jednotlivé dávky. Sloučeniny je možno podávat jako takové, běžnější je podání spolu s farmaceutickým nosičem, který sloučeninu zřeďuje a usnadňuje podávání. Je známo, že tento nosič musí být stejně jako výsledný přípravek sterilní a netoxický.

Při perorálním podání může být nosič užítý jako ředidlo pevný, polotuhý nebo kapalný a je prostředím, v němž se účinná látka užívá pro farmakologické pokusy. Při parenterálním podání se účinná látka rozpouští nebo uvádí v suspenzi ve vhodné injekční kapalině známým způsobem.

Při výrobě svrchu uvedených lékových forem je možno užít běžných způsobů zpracování ve vodě rozpustných farmaceutických látek v případě solí a ve vodě nerozpustných látek v případě volných bazí. Injekční prostředky je například možno získat následujícím způsobem.

Prostředek A

Sterilní suspenzi ve vodném prostředí, vhodnou pro injekční podání je možno získat z následující směsí:

složka	mg
sloučenina z příkladu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 nebo 10 ve formě suspendovatelného prášku	3
citronan sodný	5,7
sodná sůl karboxymethylcelulózy (s nízkou viskozitou)	2,0
methylparahydroxybenzoát	1,5
propylparahydroxybenzoát	0,2

Svrchu uvedená směs se doplní vodou, vhodnou pro injekční podání na objem 1,0 ml.

Prostředek A'

Sterilní suspenzi ve vodném prostředí, vhodnou pro injekční podání je možno získat z následující směsi.

složka	mg
3'-deamino-3'-(3'-kyan-4'-morfoli- nyl)doxorubicin z příkladu 4	0,5
citronan sodný	5,7
sodná sůl karboxymethylcelulózy (s nízkou viskozitou)	2,0
methylparahydroxybenzoát	1,5
propylparahydroxybenzoát	0,2

Svrchu uvedená směs se doplní vodou, vhodnou pro injekční podání na objem 1,0 ml.

Prostředek B

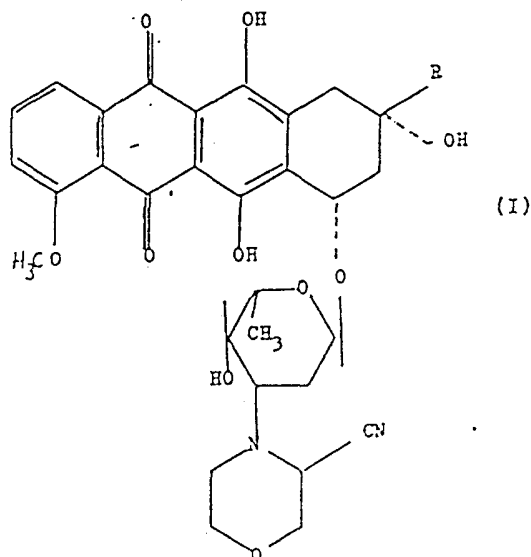
Kapsle je rovněž možno získat z následující směsi:

složka	mg
3'-deamino-3'-(3'-kyan-4'- -morfoliny)doxorubicin z příkladu 4(C)	1
laktóza	199

Sloučenina z příkladu 4(C) a laktóza se protlačí sítí a prášková směs se dobře promísí, načež se plní do kapslí z tvrdé želatiny vhodného rozměru tak, že se do každé kapsle vloží 200 g získaného práškového materiálu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

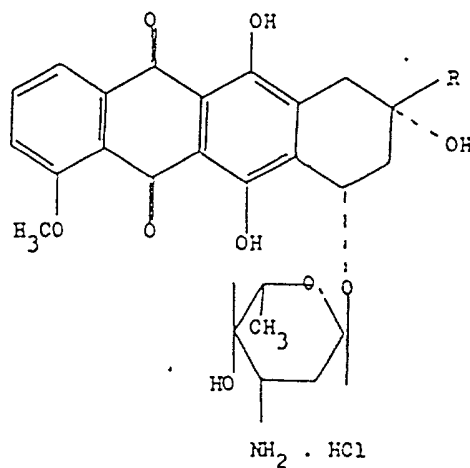
1. Způsob výroby nových morfolinových derivátů daunorubicinu a doxorubicinu obecného vzorce I



kde

R znamená skupinu $-\text{CO}-\text{CH}_3$, $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ a $-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$,

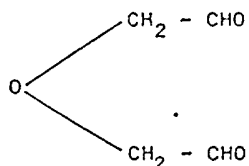
vyznačující se tím, že se uvede v reakci sloučenina obecného vzorce



kde

R znamená skupinu $-\text{CO}-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{CHOH}-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$,

ve směsi vody a polárního organického prostředí s 2,2'-oxydiacetaldehydem vzorce



připraveným in situ rozštěpením 1,4-anhydroerythritolu ve vodném prostředí jodistanem sodným při teplotě místnosti, reakce se provádí za přítomnosti kyanborohydridu alkalického kovu, například kyanborohydridu sodného nebo draselného a surový reakční produkt, získaný po uzavření morfolinového kruhu se rozdělí na neutrální a alkalickou frakci a neutrální frakce se chromatograficky čistí, čímž se získá čistý produkt obecného vzorce I.