



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ OPIS PATENTOWY

Nr 47461

Kl. 30 h, 2/04
Kl. internat. A 61 k

Egyesult Gyogyszer — es Tapszergyar

Budapeszt, Węgry

**Sposób wytwarzania substancji działających antymetabolicznie
i cytostatycznie**

Patent trwa od dnia 17 października 1961 r.

Pierwszeństwo: 19 października 1960 r. (Węgry)

Wiedomo, że stosowane w ostatnich czasach tak zwane substancje cytostatyczne do leczenia złośliwych guzów, wykazują działanie niespecyficzne, wpływając nie tylko na funkcje życiowe komórek guza, lecz również na pozostałe komórki leczonego organizmu. Środki te są z tego względu w wysokim stopniu toksyczne, przez co utrudnione jest ich stosowanie terapeutyczne.

Poza tym wiadomo, że przy schorzeniach wywołanych guzami spada znacznie ilość heparyny zawartej w organizmie i równocześnie rozmnażają się w okolicy guzów i innych zbyt szybko wyrosniętych tkanek, tak zwane komórki (Mastrellen) Ehrlicha zawierające heparynę.

Z tego względu komórki guza potrzebują również heparyny do swego rozwoju.

Stwierdzono, że utworzone z heparyną związki substancji działających cytostatycznie jak też substancji działających na system enzymatyczny komórek, w sposób hamujący lub wykazujących równocześnie obydwa działania, posiadają specyficzne działanie w hamowaniu rozwoju guzów. Tę właściwość wymienionych nowych związków heparyny można wytłumaczyć tym, że substancje te wykazują pod względem biologicznym charakter heparynowy i w związku z tym gromadzą się przede wszystkim w komórkach wykazujących powinowactwo do heparyny, a więc w komórkach guzów uszkadzając komórki guza, w bardzo znacznym stopniu również przy tak niskich stężeniach, przy których nie wywierają wcale, albo zaledwie dostrzegalne działanie niszczące komórki

*) Właściciel patentu oświadczył, że współtwórcami wynalazku są: dr Gyorgy Csaba i dr Jenő Körösi.

zdrowej tkanki. Ta właściwość wymienionych związków heparyny jest tym bardziej nieoczekiwana, ponieważ znane elementy budowy kwasu heparynowego, kwas D — glikuronowy i D — glikozoamid nawet ułatwiają rozwój guzów doświadczalnych.

Te nowe związki heparyny, specyficznie hamujące rozwój guzów, można wytwarzać z kwasu heparynowego (który niekoniecznie musi wykazywać działanie hamujące krzepnięcie krwi) i z substancji cytostatycznych stosowanych w terapii i (lub) z substancji hamujących działalność enzymów, odgrywających rolę w przemianie materii komórek guza.

Kwaśnym składnikiem nowego związku według wynalazku o charakterze soli, jest kwas heparynowy reagujący silnie kwaśno, związek ten stosuje się w terapii przeważnie w postaci soli sodowej, do regulowania czasu krzepnięcia krwi, poza tym przy transfuzjach krwi i do leczenia tromboz. Różne naturalne heparyny składają się z mieszanin makrocząsteczek, które różnią się nie tylko przeciętnymi ciężarami cząsteczkowymi, lecz również składem chemicznym. Najczęściej występujący rodzaj kwasu heparynowego składa się z równoważnych ilości D — glikozoamina — N — kwas siarkowy i kwas D — glikuronowy, przy czym co drugi składnik w postaci kwasu D — glikuronowego w pozycji grupy wodorotlenowej przy C₂ i każdy składnik w postaci D — glikozoamidu w pozycji grupy wodorotlenowej przy C₄ jest zestryfikowany kwasem siarkowym, przy czym z atomami azotu glikozoamidu związana jest każdorazowo grupa SO₃H.

Teoretycznie łańcuch cząsteczek heparyny jest więc zbudowany z powtarzających się jednostek czterosacharydu, które w niżej podanej kolejności zawierają zestryfikowany kwasem siarkowym przy C₂ związek D — glikozoamina — N — kwas siarkowy, kwas D — glikuronowy, zestryfikowany kwasem siarkowym przy C₂ związek D — glikozoamina — N — kwas siarkowy i zestryfikowany kwasem siarkowym przy C₄ kwas D — glikuronowy. Ciężar cząsteczkowy tych powtarzających się wielokrotnie w makrocząsteczce jednostek czterosacharydu wynosi 1002,8; zawierają one po 5 grup SO₃H i 2 grupy COOH.

Silną skłonność heparyny do wiązania się z proteinami można wytłumaczyć jej wysoką kwasowością, wywołaną przede wszystkim grupami SO₃H. Na działanie heparyny na krzepliwość krwi wpływa jej ciężar cząsteczko-

wy i zawartość kwasu siarkowego. Średni ciężar cząsteczkowy heparyny, wykazującej dobre działanie hamujące krzepliwość krwi wynosi około 20.000. W różnych naturalnych heparynach w części cząsteczki obejmującej 4 wyżej wymienione jednostki pierścieniowe, nie zawsze występuje 5 grup SO₃H, lecz liczba tych grup waha się na ogół między 2—5. Te naturalne heparyny są wprawdzie dość stabilne w środowisku alkalicznym, jednak w środowisku kwaśnym wykazują tendencje do hydrolytycznej depolimeryzacji, przez co ich działanie hamujące krzepliwość krwi spada, albo całkowicie zanika. Ponieważ komórki guza wykazują powinowactwo również do heparyny pod względem terapeutycznym mało — lub zupełnie bezwartościowych, można je stosować jako substancje wyjściowe w sposobie według wynalazku. Jako „kwas heparynowy” należy rozumieć tutaj każdy z wyżej wymienionych rodzajów naturalnej heparyny w postaci wolnego kwasu.

Jako zasadowe składniki przy wytwarzaniu nowych związków sposobem według wynalazku, można stosować takie zasadowe związki o działaniu niszczącym komórki, które znane są jako stosowane w terapii leki cytostatyczne, albo jako środki stosowane do hamowania działalności enzymów, odgrywających rolę w przemianie materii guzów. Spośród substancji stosowanych w terapii i działających bezpośrednio na podział komórek, najbardziej odpowiednie jako substancje wyjściowe w sposobie według wynalazku są N,N — bis — (β — chloroetyloamino) — pochodne N — (β — chloroetyloamino) — pochodne oraz pochodne etylenoiminy, na przykład 2 — [Bis — (β — chloroetylo) — aminometylo] — benzimidazol, 1,6 — bis [β — chloroetyloamino] — 1,6 — dezoksy — D — mannit oraz pochodne etylenoiminy np. 2,5 — bis — etylenoiminohydrochinon.

Zasadowe substancje stosowane do hamowania działalności enzymów, odgrywających rolę w przemianie materii komórek guza, należą do różnych grup związków organicznych. Związki te w postaci wolnej lub w postaci innych soli, w stężeniach praktycznie stosowanych, nie wykazują działania hamującego rozwój guzów, lecz tylko ich sole z kwasem heparynowym wykazują działanie hamujące rozwój guzów; ta okoliczność jest oczywistym dowodem specyficznego charakteru nowych związków otrzymywanych sposobem według wynalazku.

Spośród tych związków zasadowych, hamujących działanie enzymów, sulfonamidy np. p-aminobenzenosulfonamid, p-aminobenzenosulfoguanidyna lub 2-(4-aminobenzenosulfonamido) - 4-metylotiazol, wykazują działanie hamujące w stosunku do glukozo-6-fosforan-dehydrogenazy, kwas mlekowy - dehydrogenazy, glukoza - dehydrogenazy, cytochromo-reduktazy, kwas pirogronowy - karboksylazy, cytochromooksydazy, sukcynodehydrogenazy itp. enzymów. Niektóre alkaloidy jak np. chinina i podobne do chininy syntetyczne środki przeciwmalaryczne jak np. 3-chloro-7-metoksy-9-(α -metylodwuetyloamino - butyloamino)-akrydyna, 6-metoksy-8-(δ -dwuetyloamino- α -metylobutylo) - aminochinolina - i 7 chloro-(4-dwuetyloamino - 1-metylobutyloamino) - chinolina, wykazują działanie hamujące w stosunku do cytochrom - reduktazy, fosforoglicerynoaldehydodehydrogenazy, fosforylasy, heksokinazy, cytochromooksydazy, kwas pirogronowy - dehydrogenazy, fosforoglikomutazy, kwas mlekowy - dehydrogenazy itd. Różne organiczne związki arsenu jak na przykład p-amino-fenylodwuchloroarsyna i tlenek 3-amino-4-hydroksyfenyloarsinu, hamują również funkcje enzymatycznego układu utleniająco-redukującego.

Różne chinony wykazują jak wiadomo również hamujące działanie na enzymy np. w stosunku do kwas pirogronowy - dehydrogenazy, sukcyno - dehydrogenazy, kwas pirogronowy - karboksylazy i katalazy. U tak zwanych chinonów nie zawierających azotu i u pochodnych chinonoetylenoiminy np. 2,5-bis- β -chloroetyloaminobenzochinonu - (1,4), 2,5-bis-dwu- β -chloroetyloaminobenzochinonu - (1,4), 2,5-bis-etylenoiminobenzochinonu - (1,4) i 2,5-bis-n-propoksy-3,6-bis- - etylenoiminobenzochinonu - (1,4) przypuszcza się, że istnieją obydwie wymienione działania (cytostatyczne i hamujące enzymy), (porównaj S. Petersen, W. Gauss i E. Urbchat, *Angew. Chem.* 67, 217 (1955); W. Gauss i S. Petersen op. cit. 69, 252 (1957). Jako spokrewniony związek można zaliczyć do tego typu również 2,5-bis-etylenoiminohydrochinon, u którego stwierdzono również działanie hamujące rozwój guza (porównaj A. Marxer, *Experimentia*, 11, 186 (1955)). Ponieważ z tego rodzaju związków nie powstają sole z heparyną, zastosowano do tworzenia soli ich pochodne, podstawione zasadowo np. 2,5-bis- β -dwumetyloaminoetoksy-3,6-bis-etylenoiminobenzochinon - (1,4), 2,5-dwuchloro-3,6-

bis- β -piperydino-etyloaminobenzochinon - (1,4) orfaz 2,5-dwu-n-metylopiperazynobenzochinon - (1,4).

W przypadku soli sodowej heparyny, jak też wolnego kwasu heparynowego, nie stwierdzono podczas doświadczeń ze zwierzętami żadnego działania hamującego wzrost guzów; substancje te wykazują nawet wręcz przeciwnie działanie, powodują wzrost guzów oraz wywołują równocześnie spadek ciężaru ciała. Jest to również dowodem tego, że w przypadku związków otrzymanych sposobem według wynalazku chodzi o nowe, całkiem specyficzne i nieoczekiwane ich działanie.

Znane są również z literatury pewne sole kwasu heparynowego z organicznymi zasadami, które nie zawierają jednak jako składowej zasadowej związków o działaniu cytostatycznym lub zdolnych do hamowania działalności enzymów, odgrywających rolę w przemianie materii komórek guzów. Te znane sole heparyny nie posiadają właściwości hamowania wzrostu guzów; wykazują tylko działanie podobne do heparyny, hamujące krzepliwość krwi. Tak np. opisano roztwór wodny z 20 części heparyny i 1 części histaminy (R. K. Sanyal i G. B. West, *Nature*, 178, 1293 (1956) i sole heparyny utworzone z N,N'-bis-(α -metylobenzyl)-etylenodwuaminy (A. Cantone, *Minerva Med.* I 230 (1953) i z aminoakrydynami (K.S. Dodgson, F. A. Rose i B. Spencer, *Biochem. J.* 60, 346 (1955)), które nie wykazują jednak żadnego działania hamującego wzrost guzów.

Nowe sole heparyny pochodzące z zasadowych związków o działaniu cytostatycznym i hamującym działalność enzymów można według wynalazku otrzymywać przez wprowadzanie w reakcję kwasu heparynowego z jakimkolwiek z wyżej wymienionych zasadowych związków o działaniu cytostatycznym lub hamującym. Nie jest przy tym konieczne, ażeby kwas heparynowy, zastosowany jako substancja wyjściowa, wykazywał działanie hamujące krzepliwość krwi. Obydwie składniki można stosować w ilościach równoważnych albo w takim stosunku ilościowym, ażeby ilość związku zasadowego była mniejsza, aniżeli równoważna ilość obliczona z liczby obecnych grup - NH-SO₃H i - O-SO₃H; w ostatnim przypadku jako produkt otrzymuje się kwaśne sole heparyny. Obydwie rodzaje soli heparyny otrzymanych jako produkt w wyniku reakcji

wykazują korzystne działanie hamujące wzrost guzów.

Reakcję można przeprowadzić w rozpuszczalniku nieorganicznym lub organicznym korzystnie w wodzie, niższych alkoholach pierwszorzędowych albo w mieszaninie tych rozpuszczalników, korzystnie w zakresie temperatur od -10 do $+20^{\circ}\text{C}$.

Przy wytwarzaniu nowych pochodnych heparyny sposobem według wynalazku, nie jest konieczne stosowanie jako materiału wyjściowego stałego, wyizolowanego kwasu heparynowego, jako materiał wyjściowy można stosować również wodny lub organiczny roztwór kwasu heparynowego, otrzymywanego jako produkt surowy przy wytwarzaniu kwasu heparynowego.

Sole heparyny wytworzone sposobem według wynalazku, są najczęściej dobrze rozpuszczalne w wodzie; wartość pH roztworu zależy od liczby grup SO_3H obecnych w kwasie heparynowym i od ilości zastosowanej składowej zasady. Korzystnie stosunek tych czynników dobiera się tak, ażeby wartość pH 5%-owego wodnego roztworu produktu wynosiła poniżej 9, korzystnie 1,5—7,5.

Nowe pochodne heparyny wytworzone sposobem według wynalazku, wykazują działanie cytostatyczne przewyższające znacznie podobne działanie dotychczas znanych środków cytostycznych, ponieważ te nowe związki, ze względu na ich specyficzny sposób działania, działają głównie na tkankę guza. Zostaje to także potwierdzone przez to, że podczas, gdy np. 8 mg/kg dwuchlorowodoru 1,6 - bis - (β - chloroetyloamino) - 1,6 - dezoksy - D - mannitu powoduje 20—25% straty wagi u zwierząt z powodu ogólnie szkodliwego działania na komórki, to sól tego samego związku utworzona z heparyną w tej samej ilości, nie powoduje żadnego, spadku wagi, a z drugiej strony w przypadku dużo mniejszej dawki np. 2,5 mg/kg, chlorowodorek wymienionego związku cytostycznego nie wykazuje żadnego działania hamującego wzrost guzów, podczas, gdy sól utworzona z kwasem heparynowym wykazuje bardzo widoczne działanie hamujące wzrost guzów.

Praktyczne wykonanie sposobu według wynalazku przedstawiono w następujących przykładach.

Przykład I. 4,55 g (0,012 mola) dwuchlorowodoru 1,6 - bis - (β - chloroetyloamino) - 1,6

- dezoksy - D - mannitu rozpuszcza się w 20 ml wody i przy chłodzeniu lodem zadaje roztworem zawierającym 1,34 g (0,024 mola) wodorotlenku potasowego w 5 ml wody następnie do mieszaniny dodaje się roztwór 8,75 g kwasu heparynowego w 20 ml wody. Kłarowny roztwór odparowuje się w temperaturze 30°C do konsystencji syropu i zadaje 75 ml absolutnego etanolu. Wydzieloną sól heparyny odsąca się i przemywa 20 ml absolutnego etanolu, a następnie 20 ml bezwodnego eteru. Otrzymuje się 14,10 g soli kwasu heparynowego z 1,6 - bis - (β - chloroetyloamino) - 1,6 - dezoksy - D - mannitem (teoretyczna wydajność 14,21 g), w postaci jasnokremowego, bezpostaciowego produktu rozpuszczalnego w wodzie, zawierającego 12,6% KCl i nie wykazującego charakterystycznej temperatury topnienia.

Stosowany jako produkt wyjściowy dwuchlorowodorek 1,6 - bis - (β - chloroetyloamino) - 1,6 - dezoksy - D - mannitu (Degranol, Mannomustin) jest znanym środkiem cytostycznym, którego wytwarzanie opisano w publikacji L. Wargha itd. (J. Chem. Soc. 1957, str. 805).

Kwas heparynowy zastosowany do powyższej reakcji wykazuje działanie hamujące krzepliwość krwi odpowiadające 3,2 jedn. międz./mg; nie posiada on charakterystycznej temperatury topnienia, powyżej 180°C powoli brunatnieje, a powyżej 205°C zwęgla się. Analiza: $N = 2,7\%$, $S = 11,9\%$. Ten kwas heparynowy zawiera więc na każdą grupę czterosacharydu zamiast maksymalnie pięciu, tylko przeciętnie 3,7 grup SO_3H . W związku z tym ciężar cząsteczkowy tych powtarzających się grup czterosacharydów wynosi tylko 898, zamiast 1002,8.

W produkcie końcowym 80% grup SO_3H pierwotnie obecnych w kwasie heparynowym, związanych jest z zasadową mannomustyną. Obecność tych wolnych grup SO_3H widoczna jest również z wartości pH wodnego roztworu produktu (6—6,5).

Heparynian — mannomustyny otrzymany w powyższy sposób dał następujące wyniki przy doświadczeniach na zwierzętach:

Guz Grocker S. 180 u myszy: dzienne dawki 25 mg/kg przy 10-dniowym podawaniu zahamowały wzrost guzów o 40%. Doświadczenia porównawcze przeprowadzone równocześnie z dwuchlorowodorkiem mannomustyny wywołały przy podawaniu dawek zawierających taką samą ilość mannomustyny tylko 25% zahamowanie wzrostu guzów.

Guz Solider — Erlich: przy 10-dniowym podawaniu dawki 25 mg/kg heparynian mannomustyny zahamował o 63% przyrost wagi guzów. Doświadczenia porównawcze przeprowadzone równocześnie z dwuchlorowodorkiem mannomustyny wywołały 24%-owe przyspieszenie wzrostu guzów.

Ascites - Lymphona Nemeth - Kellner'a: 100 mg/kg heparynianu mannomustyny podano po 24 — i po 48 godzinach po zaszczepieniu guza, po 6 dniach stwierdzono 76 %-owe zahamowanie wzrostu guza.

Przykład II. Postępuje się w podobny sposób jak w przykładzie I, z tą różnicą, że zamiast 0,012 mola mannomustyny wprowadza się do reakcji z kwasem heparynowym ilość równoważną ilości grup SO_3H w kwasie heparynowym, a więc w przypadku heparyny stosowanej w przykładzie I, 0,016 mola mannomustyny. Dzięki temu jako produkt otrzymuje się sól obojętną, zawierającą KCl , która w roztworze wodnym posiada wartość $\text{pH} = 7-7,3$. Produkt ten w doświadczeniach na zwierzętach dał takie same wyniki jak w przykładzie I.

Przykład III. 0,55 g czystej zasady mannomustyny (temperatura rozkładu 278°C , wytworzenie — patrz Vargh'a itd. loc. cit) rozpuszcza się z 1,31 g kwasu heparynowego, o jakości, podanej w przykładzie I w 15 ml wody, a otrzymany roztwór klarowny zagęszcza przy wentylacji lub pod próżnią w temperaturze poniżej 30°C do konsystencji syropu. Przez dodanie 20 ml absolutnego etanolu wytrąca się słabo kwaśny heparynian mannomustyny wolny od KCl , odsącza i przemywa 10 ml absolutnego etanolu, a następnie 10 ml bezwodnego eteru. Otrzymuje się 1,81 g heparynianu mannomustyny wolnego od KCl , zawierającego 4,26% azotu. Produkt ten z powodu większej czystości posiada odpowiednio wzmocnione działanie.

Guz Solider Ehrlich: przy 10-dniowym podawaniu w dziennych dawkach 150 mg/kg zahamował wzrost guza o 50%.

Sarkoma - Benevolenskaja: przy 21-dniowym podawaniu szczurom zaszczepionym tym guzem, przy dziennych dawkach 60 mg/kg uzyskano 64 %-we zahamowanie wzrostu guza.

Sarkoma - Voschida na szczurach: przy 7-dniowym podawaniu w dziennych dawkach 50 mg/kg uzyskano 99,2 %-owe zahamowanie.

Przykład IV. Kwas heparynowy zawierający przeciętnie 3,5 grup SO_3H na jednostkę czterosaharydu rozpuszcza się w wodzie, a roztwór zobojętnia się obliczoną ilością zasady 2 - [bis - (β - chloroetylo) - aminometylo] - benzimidazolu. Otrzymany klarowny roztwór zagęszcza się przy wentylacji do konsystencji syropu, zjada 25 ml bezwodnego acetonu, wytrąconą sól odsącza i przemywa bezwodnym acetonem i bezwodnym eterem. Otrzymany w ten sposób heparynian 2 - [Bis - (β - chloroetylo) - aminoetylo] - benzimidazolu w doświadczeniach na zwierzętach wykazuje podobne działanie hamujące wzrost guzów jak heparynian mannomustyny. Wzrost guza Ehrlicha został zahamowany przy 10-dniowym podawaniu w dziennych dawkach 100 mg/kg o 42%.

Stosowaną jako substancję wyjściową zasadę 2 - [bis - (β - chloroetylo) - aminometylobenzimidazol], otrzymano w zwykły sposób z dwuchlorowodorku w temperaturze 0°C , otrzymywanie dwuchlorowodorku zostało opisane przez E. Hirschberga itd. Cancer Research 17, 904 i W.S. Gump i E.J. Nikawitz, J. Org. Chem.

Przykład V. 0,90 g kwasu heparynowego (zawierającego przeciętnie 3,5 grup SO_3H na jednostkę czterosaharydu bez działania hamującego krzepnięcie krwi) i 0,80 g sulfaguanidyny rozpuszcza się w 20 ml wody, roztwór sącza się w temperaturze pokojowej odparowuje do sucha. Otrzymaną jako pozostałość sól umieszcza się z 20 ml bezwodnego etanolu na filtrze, odciąga etanol i osad przemywa 20 ml bezwodnego eteru. Otrzymuje się 1,62 g heparynianu sulfaguanidyny; produkt nie posiada charakterystycznej temperatury topnienia, powyżej 180°C powoli zwęglą się. 5%-owy wodny roztwór produktu wykazuje wartość $\text{pH} = 7$. Analiza: $\text{N} = 13,3\%$.

W podobny sposób można wytworzyć również sole kwasu heparynowego z następującymi sulfamidami: p — aminobenzenosulfamidem, 2 - (4 - aminobenzenosulfamido) - 4 - metylotiazolem i 2 - sulfaniloamido - 4,6 - dwumetylopirymidyną.

W doświadczeniach na zwierzętach produkty te wykazały również dobre hamujące działanie na wzrost guzów. Heparynian p-aminobenzenosulfamidu przy 10 dniowym podawaniu w dziennych dawkach 40 mg/kg zahamował wzrost guza Ehrlicha o 24%. W przypadku 2 -

(4 - aminobenzenosufamido) - 4 - metylotiazolu w podobnych warunkach stwierdzono 40% — owe zahamowanie, w przypadku heparynianu sulfaguanydiny, zahamowanie wynosiło 49,8% a w przypadku heparynianu 2 - sulfanilamido - 4,6 - dwumetylopirymidyny, w tych samych warunkach, zahamowanie nastąpiło w 25%.

Przykład VI. 1,31 g kwasu heparynowego (zawierającego przeciętnie 3,7 grup SO_3H na jednostkę czterosacharydu i wykazującego aktywność 3 j.m./mg na hamowanie krzepliwości krwi) rozpuszcza się w 25 ml wody i w temperaturze 0°C zadaje 0,58 g chininy. Otrzymany roztwór sączy się i przy próżni 10 torrów w temperaturze 30°C zagęszcza do konsystencji syropu. Przez dodanie 20 ml bezwodnego czterohydrofuranu wytrąca się słabo — kwaśną sól, sączy i następnie dwukrotnie przemywa eterem po 5 ml. Otrzymuje się 1,84 g heparynianu chininy, którego wodny roztwór wykazuje wartość $\text{pH} = 6,3$. Analiza: $\text{N} = 4,8\%$ (odpowiada teoretycznej zawartości azotu). Produkt nie posiada charakterystycznej temperatury topnienia, zwęglą się powyżej 190°C .

Produkt ten w stosunku do guza Ehrlicha przy 10 dniowym podawaniu w dawkach 100 mg/kg wykazywał 26%-owe działanie hamujące.

Przykład VII. 0,655 g kwasu heparynowego (o zawartości siarki 13,15%, zawiera więc przeciętnie 3,7 grup SO_3 na jednostkę czterosacharydu, wykazuje działanie hamujące krzepliwość krwi odpowiadające 3 j.m./mg) rozpuszcza się w wodzie, a roztwór podczas chłodzenia lodem zadaje 0,358 g tlenku 3 - amino - 4 - hydroksyfenyloarsyny. Roztwór zagęszcza się w temperaturze poniżej 30°C prawie do sucha a pozostałość przenosi na filtr razem z 10 ml absolutnego etanolu. Otrzymaną sól przemywa się dwukrotnie po 10 ml bezwodnego eteru. Otrzymuje się 0,93 g heparynianu tlenku 3 - amino - 4 - hydroksyfenyloarsyny. Analiza: $\text{As} = 13,5\%$, $\text{N} = 4,3\%$.

Przykład VIII. 1,31 g. kwasu heparynowego (jakość jak w przykładzie VII) zawieszają w stanie drobno — sproszkowanym w 50 ml bezwodnego eteru i w temperaturze -10°C zadaje 0,92 g 3 - amino - 4 - hydroksyfenylo dichloroarsyny, następnie mieszaninę miesza się przez 5 godzin w suchym strumieniu azotu przy 0°C . Następnie mieszaninę odparowuje się do sucha

przy niewielkiej próżni i w temperaturze pokojowej, a pozostałość homogenizuje przez rozcieńczenie w atmosferze azotu.

Analiza otrzymanego związku arsenowego: $\text{As} = 12,0\%$, $\text{Cl} = 11,2\%$, $\text{N} = 4,0\%$. Produkt przy doświadczeniach na zwierzętach wykazuje takie same działanie jak produkt otrzymany według przykładu VII, ponieważ pod wpływem wody hydrolizuje on do takiego samego związku.

Przykład IX. 0,655 g kwasu heparynowego (jakość jak w przykładzie VII i VIII) rozpuszcza się w 15 ml wody i zadaje 0,144 g 2,5 — bis — etylenoiminohydrochinonu. Roztwór odparowuje się do sucha w próżni w temperaturze pokojowej a słabo — kwaśną sól otrzymaną jako pozostałość, przenosi się na filtr z 10 ml absolutnego etanolu i przemywa 10 ml bezwodnego eteru. Wydajność: 0,75 g, analiza: $\text{N} = 5,05\%$. Produkt jest rozpuszczalny w wodzie, wartość pH roztworu 5,5.

Przykład X. 0,850 g kwasu heparynowego (zawartość siarki 11,75%, zawiera więc przeciętnie 3,1 grup SO_3H na jednostkę czterosacharydu, nie wykazuje działania hamującego krzepliwość krwi) rozpuszcza się w 25 ml wody, następnie roztwór zadaje się 0,636 g D (-) - treo - 1 - p - nitrofenylo - 2 - amino - 1,3 - propandiolu. Otrzymany klarowny roztwór wykazujący wartość $\text{pH} = 6$, przerabia się dalej jak w przykładzie V. Wydajność 1,40 g. Produkt ten jest dobrze rozpuszczalny w wodzie. Przy 10 dniowym podawaniu przy dziennych dawkach 100 mg/kg spowodował zahamowanie guza Ehrlicha o 34%.

Przykład XI. 0,830 g kwasu heparynowego (zawartość siarki 11,0%, zawiera więc przeciętnie 2,85 grup SO_3 na jednostkę czterosacharydu; nie wykazuje działania hamującego krzepliwość krwi) rozpuszcza się w 25 ml wody i zadaje 0,60 g kwasu 3 - amino - 4 - hydroksyfenyloarsenowego. Po zwykłej przeróbce roztworu otrzymano 1,35 g jasnobrazowej soli. Wartość pH produktu wynosi 1,7 z powodu obecności wolnych grup kwasu arsenowego.

Produkt w roztworze soli fizjologicznej przy podawaniu dootrzewnym w ciągu 10 dni w dziennych dawkach 150 ml/kg wykazuje 41% zahamowania guza Ehrlicha.

Przykład XII. 0,850 g kwasu heparynowego (jakość jak w przykładzie X) rozpuszcza się w

25 ml wody i dodaje 0,465 g 7-chloro-4-(4-dwuetyloamino-1-metylobutyloamino)-chinyliny, poczym roztwór przerabia w zwykły sposób. Wartość roztworu otrzymanej soli posiada pH = 4,2, jej analiza odpowiada wyliczonym wartościom. Produkt przy 10 dniowym stosowaniu w dziennych dawkach 150 mg/kg wykazuje 25% zahamowania guza Ehrlicha.

Przykład XIII. 1,7 g kwasu heparynowego, (jakość jak w przykładzie X) rozpuszcza się w 40 ml wody i zadaje 1,07 g 2,5-bis-β-dwu-metyloaminoetoksy-3,6-bis-etylenoimino-benzochinonu - (1,4), (temperatura topnienia 60 - 61°C).

Roztwór (pH = 6) sący się i przy wentylacji zagęszcza na parownicy o dużej powierzchni w ciągu 3 godzin do konsystencji syropu. Otrzymany stężony roztwór zadaje się 30 ml acetonu, a wytrąconą jasnobrązową sól odsącza się i przemywa 3 x 10 ml acetonu. Wydajność: 2,62 g (97% teorii).

Przykład XIV. Postępuje się jak w przykładzie X, jednak jako składową zasadową stosuje się 0,91 g 2,5-dwu-N-metylopiperyzyno-benzochinonu - (1,4) (temperatura topnienia 188—190°C). Otrzymuje się 2,37 g jasnobrązowej soli heparyny (95% teorii). Produkt jest dobrze rozpuszczalny w wodzie; wartość pH wodnego roztworu = 6.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych pochodnych wykazujących zwiększone i specyficzne działanie związków cytostatycznych lub hamujących przemianę materii komórek guza, znamieny tym, że poddaje się reakcji kwas heparynowy ze związkami zasadowymi, które działają cytostatycznie lub hamują działanie enzymów biorących udział w przemianie materii komórek guza, przy czym reakcję prowadzi się w środowisku wodnym lub

alkoholowym, względnie wodno-alkoholowym, w temperaturze między -10°C i +20°C, a powstałą sól heparyny wydziela się z mieszaniny reakcyjnej.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że stosuje się kwas heparynowy zawierający przeciętnie 3 - 4 grup SO_3H na jednostkę czterosacharydu o średnim ciężarze cząsteczkowym poniżej 25000.
3. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako związki cytostatyczne, stosuje się 2 - [bis - (β - chloroetylo - aminometylo) - benzimidazol, lub 1,6-bis-[β - chloroetylo - amino] - 1,6 - dezoksy - D - mannit albo pochodne etylenoiminy, zwłaszcza 2,5 - bis - etylenoiminohydrochinon.
4. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako związki hamujące przemianę materii komórki stosuje się organiczne związki arsenu, sulfamidy albo zasadowe podstawione pochodne chinonu.
5. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako związki hamujące przemianę materii komórki stosuje się alkaloidy chininy lub syntetyczne środki przeciwmalaryczne.
6. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako związek hamujący przemianę materii komórki stosuje się D (-) - (treo - 1 - p - nitrofenylo - 2 - amino - 1,3 - propandiol.
7. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że związek zasadowy i kwas heparynowy stosuje się w takim stosunku ilościowym, że otrzymana sól w 5 %-owym roztworze wykazuje wartość pH = 1,5-7,5.

Egyesült Gyógyszer - és
Tápszergyár

Zastępca: mgr Józef Kamiński
rzecznik patentowy