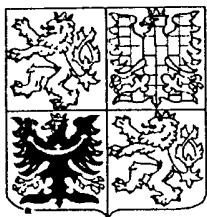


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 14.10.92
(32) 15.10.91
(31) 91/774107
(33) US
(40) 12.05.93

(21) 3122-92

(13) A3

(51) Int. Cl.⁵:

C 07 D 305/14

A 61 K 31/335

(71) Virginia Tech Intellectual Properties, Inc., Blacksburg,
Virginia, US;

(72) Kingston David G.I., Blacksburg, Virginia, US;
Zhao Zhin-Yang, Blacksburg, Virginia, US;

(54) Deriváty taxolu rozpustné ve vodě

(57) Sulfonované 2'-akryloyltaxolové a sulfonované 2'-O-acyl-kyselinové deriváty taxolu ze zlepšenou rozpustností ve vodě a stabilitou při udržení bioaktivity, byly syntetizovány. Zejména se syntetizuje sodná sůl 2'-//3-sulfo-1-oxopropyl/oxy/taxolu reakcí taxolu s akrylovou kyselinou a následující reakcí 2'-akryloyltaxolu s bisulfitem Michaelovou reakcí. Sodná sůl 2'- //4-//2-sulfoethyl/amino-/1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu se syntetizují reakcí 2'-sukcinyltaxolu s tetrabutylamoniovými solemi taurinu a kyselinou 3-aminopropylsulfonovou a potom se nahradí amoniová skupina sodíkem. Glykolové deriváty 2'-O-acyl kyselinových taxolů se zlepšenou rozpustností ve vodě se syntetizují reakcí glykolu s 2'-O-axyl-kyselinovým taxolem.

Deriváty taxolu rozpustné ve vodě

Oblast techniky

Vynález se týká ve vodě rozpustných derivátů taxolu s antineoplastickou aktivitou a týká se především sulfonovaných 2'-akryloyltaxolových derivátů, 2'-sulfoalkylamino-0-acylkyselinových taxolových derivátů a 2'-ethylenglykol-0-acylkyselinových taxolových derivátů.

Dosavadní stav techniky

Taxol je přírodní diterpenoid, který má značnou účinnost jako léčivo proti rakovině a projevuje účinek v některých tumorových systémech. Taxol byl prvně izolován a jeho struktura popsána autory Wani a spol., v publikaci "Plant Anti-Tumor Agents.VI. The Isolation And Structure Of Taxol, A Novel Anti-Leukemic And Anti-Tumor Agent From *Taxus brevifolia*", J. Am. Chem. Soc., 1971, 93, 2325. Taxol byl nalezen v kůře kmene tisů západního /Western Yew/, *Taxus brevifolia*, jakož i v druhu *T. baccata* a *T. cuspidata*.

Biologická aktivita taxolu je založena na jeho působení na dělení buněk. Taxol podporuje tvorbu mikrotubulů které vytvářejí mitotické vřeténko během dělení buněk. Avšak taxol brání depolymeraci tubulinu, vytvářejícího mikrotubuly mitotického vřeténka, které má hlavní význam pro to, aby nastalo dělení buňky. Taxol způsobuje tudíž zastavení dělení buňky. Taxolový mechanismus je unikátní protože podporuje tvorbu tubulinových polymerů, zatímco ostatní protirakovinová léčiva jako je vinblastin a kolchicin, zabráňují tvorbě mikrotubulů.

Rozsáhlejší výzkum taxolu nebyl dosud uskutečněn, protože je obtížně dostupný a dosud nebyl s úspěchem vyroben

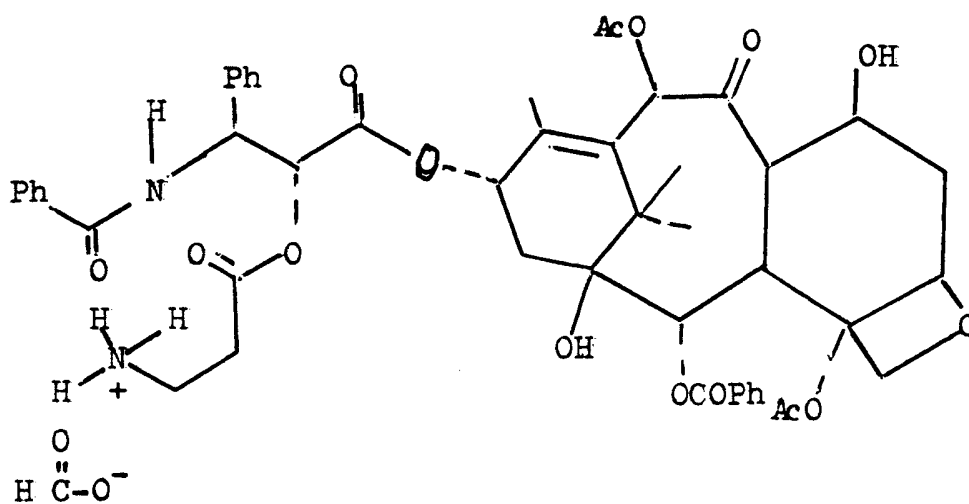
synteticky. Předběžnými studiemi se prokázalo, že taxol může mít okrajový účinek při akutní leukemii a melanomu a byl zaznamenán určitý účinek u jiných tumorů. Studiemi provedenými McGuirem a spol. Bylo zjištěno, že taxol je aktivním činidlem proti rakovině vaječníků, na níž ostatní léky nemají náležitý účinek. Viz "Taxol: A Unique Antineoplastic Agent With Significant Activity In Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms", Ann. Int. Med., 1989, 111, 273-279, která je zde citována jako odkaz. Nicméně vzhledem k malé rozpustnosti taxolu ve vodě se musí dávky podávat ve formě infuzí zředěných ve vodných roztocích dextrozy.

Je nutno poznamenat, že v 1. fázi klinických zkoušek neprojevuje samotný taxol nadměrné toxické účinky, avšak některá alergická reakce jsou způsobovány emulgátory podávanými spolu s taxolem proto, aby se kompenzovala malá rozpustnost taxolu ve vodě. Skutečně alespoň smrt jednoho pacienta byla způsobena alergickou reakcí způsobenou emulgátory. Výzkumní pracovníci se proto snažili získat ve vodě rozpustné deriváty taxolu, které si zachovávají svoji antineoplastickou a protirakovinovou účinnost.

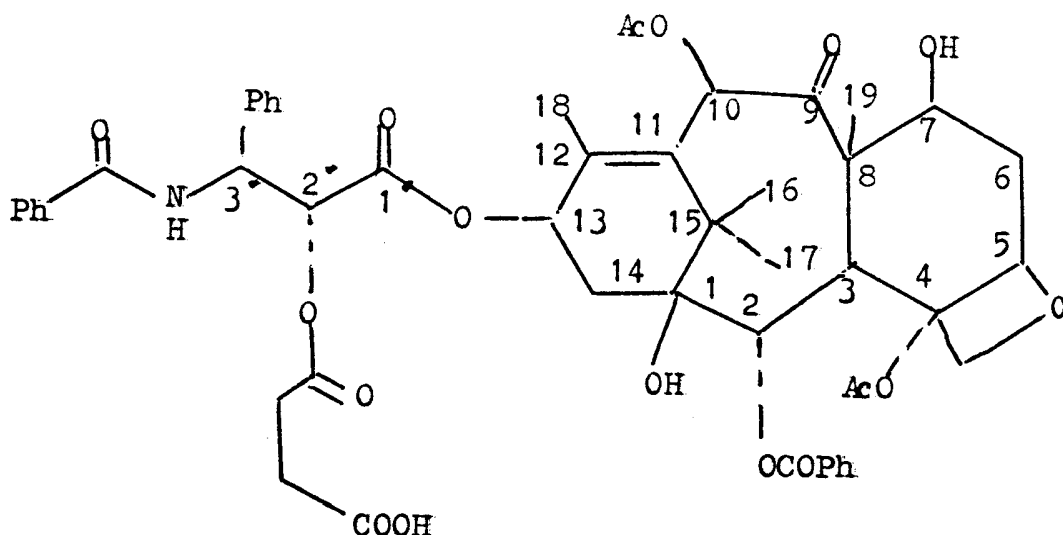
Vzhledem k obr. 1 je struktura taxolu znázorněna dále spektrem ^1H magnetické nukleární rezonance /NMR/ vzorku taxolu. Signály NMR jsou dobře oddělené a pokrývají oblast od 1,0 do 8,2 ppm. Pro zjednodušení je spektrum rozdělené do tří oblastí: první oblast mezi 1,0 a 2,5 ppm je tvořena silnými signály 3-protonu methylové a acetátové skupiny jakož i komplexem multipletů působených určitými methylenovými skupinami; druhá oblast mezi 2,5 a 7,0 ppm představuje signály, které jsou pozorovány u většiny protonů taxanového skeletu a vedlejšího řetězce; třetí oblast mezi 7,0 a 8,2 ppm je tvořena signály aromatických protonů C-2 benzoátu, C-3' fenyly a C-3' benzamidové skupiny. Píky NMR spektra na obr. 1 jsou označeny čísla uhlíků ve vzorci taxolu, ke kterým jsou připojeny signály indukující protony.

Magri a Kingston popisují biologickou aktivitu taxolů substituovaných v polohách C-2' a C-7 s cílem dosáhnout u nich větší rozpustnosti ve vodě. Viz "Modified Taxols, 4.Synthesis And Biological Activity Of Taxols Modified In The Side Chain", Journal Of Natural Products, sv.51.č. 2, str.208-306, březen-duben 1988; tato publikace je zde uvedena jako odkaz. Podařilo se syntetizovat 2'-/terc.butyldimethylsilyl/taxol, u kterého se zjistilo, že je v podstatě neúčinný; tato skutečnost byla hodnocena tak, že pro biologickou aktivitu je nezbytná hydroxyskupina v poloze 2'postranního řetězce taxolu. Dále se acylové substituenty v poloze 2' ve 2'-acetyltaxolu a 2',7-di-acetyltaxolu snadno hydrolyzovaly za podmínek in vivo a v obou případech se projevovала aktivita ve zkoušce s buněčnou kulturou. Labilita acylsubstituentů v poloze 2'naznačuje, že by 2'-acetyltaxoly mohly sloužit jako prodrug-formy taxolu. /Obecně je prodrug sloučenina, která vykazuje farmakologickou aktivitu po biotransformaci/.

Magri a Kingston uvádějí, že byly připraveny dva taxoly se zvýšenou rozpustností ve vodě,
2'-/β-alanyl/taxol:



a 2'-sukcinyltaxol:



2'-/ β -Alanyl/taxol byl nalezen jako aktivní in vivo a in vitro, ale byl nestabilní. 2'-Sukcinyltaxol, připravený zpracováním taxolu s anhydridem kyseliny jantarové, měl značně zmenšenou aktivitu P-388 in vivo ve srovnání s taxolem. Úsilí výzkumných pracovníků se proto soustředilo na jiné deriváty taxolu, které netrpí nestabilitou nebo nedostatkem aktivity in vivo nebo in vitro.

Deutsch a spol. v "Synthesis Of Congeners And Prodrugs.3.¹ Water-Soluble Prodrugs Of Taxol With Potent Antitumor Activity," J.Med.Chem. 1989, 32 788-792, tato práce je zde zahrnuta jako odkaz, uvádějí, že soli 2'-sukcinyltaxolu a 2'-glutaryltaxolu měly zlepšenou protinádorovou aktivitu ve srovnání s volnými kyselinami. Poněvadž se tito výzkumníci domnívali, že soli připravované s různými opačnými ionty mají často rozdílné vlastnosti, bylo syntetizováno a testováno mnoho solí 2'-substituovaného taxolu. Triethanolaminové a N-methylglukaminové soli 2'-substi-

tuovaného taxolu vykazují většinou zlepšenou rozpustnost ve vodě a vyšší aktivitu než sodné soli. Byla dále nalezena serie 2'-glutaryltaxolových solí, které měly vyšší aktivitu než jejich 2'-sukcinyltaxolové analogy. Nejmenší taxolová sůl vzniklá spojením 2'-glutaryltaxolu s 3-/dimethylamino/-1-propylaminem za použití N,N'-karbonyldiimidazolu /CDI/, projevovала dobrou rozpustnost a bioaktivitu.

Kromě zvýšení rozpustnosti a bioaktivity taxolu je žádoucí, aby připravené taxolové deriváty měly zvýšenou stabilitu, čímž by se prodloužila doba jejich skladovatelnosti. Předpokládá se, že soli taxolových esterů jsou velmi citlivé k zásadité hydrolyze a skupiny ve vodě rozpustné, jako jsou karboxylátové sole nebo aminové sole, mají sklon být zásaditými. Je tedy žádoucí, aby byly syntetizovány neutrální, ve vodě rozpustné taxolové deriváty, které mají zlepšenou nebo stejnou aktivitu ve srovnání s taxolem. Organické sulfonátové soli mají sklon být neutrální nebo jen slabě bázičké a proto by měly sulfonátové soli taxolových esterů mít zlepšenou stabilitu. Vzhledem k obtížím při syntéze karboxylových a aminových solí esterů taxolu, je potřebné nalézt méně nákladné ve vodě rozpustné taxolové deriváty a způsoby jejich přípravy.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká přípravy ve vodě rozpustných taxolových derivátů, ve vodě rozpustných taxolových sulfonátových solí. Ve výhodném provedení se připraví 2'-//3-sulfo-1-oxopropyl/-oxytaxol-sodná sůl reakcí taxolu s akrylovou kyselinou za vzniku 2'-akryloyltaxolu; 2-akryloyltaxol se pak podrobí Michaelově reakci s bisulfitem sodným za vzniku 2'-sulfonylethylesterové soli taxolu. K dalším členům skupiny akrylové kyseliny patří, ale nejsou na ně omezeny, skořicová kyselina, krotonová kyselina

a další alkyl a/nebo aryl alfa a/nebo beta substituované akrylové kyseliny, které také reagují s taxolem za vzniku 2'-akryloylových taxolových derivátů. V dalším výhodném provedení se 2'-O-acylkyselinové taxoly, jako je 2'-sukcinyltaxol a 2'-glutaryltaxol, podrobí nové reakci s tetrabutylamoniovou solí taurinu za vzniku sulfoalkylaminových solí 2'-O-acylkyselinových taxolů. Další výhodné provedení zahrnuje reakci solí aminosulfonové kyseliny s anhydridem kyseliny jantarové nebo glutarové a reakci produktu s taxolem za vzniku sulfoalkylaminových 2'-O-acyl kyselinových taxolových derivátů. V dalším provedení jsou vytvořeny ethylenglykolové deriváty 2'-O-acyl kyselinových taxolů. Tyto sloučeniny vykazují vysekou rozpustnost ve vodě a projevují antileukemickou, antineoplastickou a/nebo protirakovinovou aktivitu.

Hlavním předmětem vynálezu je připravit ve vodě rozpustné deriváty taxolu s vysokou bioaktivitou a stabilitou.

Dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnutí jednoduchého a nenákladného postupu pro výrobu 2'-akryloyltaxolů a jejich sulfonátových solných derivátů.

Ještě dalším předmětem předloženého vynálezu je příprava 2'-O-acylkyselinových taxolů a jejich sulfoalkylaminových solí.

Ještě jiným dalším předmětem předloženého vynálezu je příprava sulfoalkylaminových derivátů 2'-O-acyl-kyselinových taxolů jednoduchým a nenákladným způsobem.

Ještě dalším předmětem předloženého vynálezu je příprava hydroxyalkoxyderivátů 2'-O-acylkyselinového taxolu.

Popis připojených obrázků

Obr.1 představuje vzorec taxolu a jeho ¹H-NMR spektrum magnetické rezonance, NMR, s píky označenými podle části struktury taxolu, které odpovídají.

Obr.2 je NMR spektrum 2'-O-cinnamoyltaxolu /2'-cinnamoyltaxol/.

Obr.3 je NMR spektrum 2'-O-krotonyltaxolu /2'-krotonyltaxol/.

Podrobný popis vynálezu

Taxol byl získán od National Cancer Institute. ¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra byla získána na spektrometru Bruker WP200 200 MHz. Chemické posuny jsou všechny zaznamenány jako "parts per Million/ppm/" vzhledem k TMS v ¹H-NMR a ¹³C-NMR chemické posuny jsou vztaženy na posunu chloroformu při 77,0 ppm nebo na TMS posun při 0 ppm. Vzorky se obvykle proměřují v CDCl₃ nebo CD₃OD při teplotě místnosti. Hmotová spektra byla získána za použití Finnegan-MAT 112 hmotového spektrometru s plynovou chromatografií a VG 7070 HF hmotového spektrometru vybaveného počítačem, zdrojem FAB a zdrojem EI/CI. NMR a údaje hmotové spektroskopie jsou nejvíce použitelné při studiu taxolu a jeho derivátů ve spojení s dalšími metodami jako je IR a UV, kterými se získávají další informace pro potvrzení struktury.

Jiné analytické přístroje, které byly použity, jsou 710B Perkin-Elmer infračervený a Perkin-Elmer 330 UV-viditelný spektrofotometr a Perkin-Elmer polarimetr. HPLC byla pro-

vedena na zařízení, skládajícím se z Waters M6000 čerpadla, vstřikovacího ventilu Rheodyne, kolony Waters Radial-Pak RLM-100 RP-8 a UV detektoru Waters 440.

2'-Akryloyltaxoly

2'-Akryloyltaxoly byly připraveny reakcí taxolu s různými zástupci derivátů akrylové kyseliny. Sodná sůl 2'-//3-sulfo-1-oxopropyl/oxy/taxolu byla připravena spojením taxolu s akrylovou kyselinou Michaelovou adicí bisulfitového iontu. Taxol reagoval s akrylovou kyselinou za použití isobutylchlorformiátu jako kopulačního činidla. Takto se získá 2'-akryloyltaxol v 94% výtěžku po čištění rychlou chromatografií /silikagel, 1/1 dichlormethan/ethylacetát/. Za použití TLC se prokázalo, že kopulace kyseliny akrylové k taxolu byla úplná z 90 % za 15 hodin při 60 °C. Disubstituovaný C-2',C-7 produkt se nevytváří po prodloužení reakční doby. MNR protonové spektrum 2'-akryloyltaxolu ukazuje, že signál pro C-2' proton je posunut na 5,46 ppm /d, J=3/, z posunu 4,73 ppm pro C-2' proton v nesubstituovaném taxolu. Posun je v souladu s acylací C-2' hydroxylové skupiny. Jelikož signál pro C-7 proton při 4,43 ppm se v podstatě nezmění ve srovnání s C-7 protonovým signálem při 4,38 ppm pro nesubstituovaný taxol, lze předpokládat, že v poloze C-7 neproběhla žádná reakce. Hmotová spektroskopie udává molekulovou hmotnost 907 s píky při m/z 930 /MNa⁺/ a 908 /MH⁺/.

2-Akryloyltaxol pak reaguje s bisulfitem sodným Michaelovou adiční reakcí. Bisulfit sodný byl použit protože je dobrým nukleofilem a protože poskytuje vhodné pH podmínky pro reakci. Protonová NMR spektra reakčního produktu Michaelovy reakce se lišila od spektra 2'-akryloyltaxolu. Signály v NMR spektru 2'-akryloyltaxolu, způsobené přítomností vinylprotonů nebyly přítomny ve spektru pro-

duktu Michaelovy adice. Avšak dva triplety při 3,14 ppm a 2,93 ppm indikují přítomnost dvou nových methylenových skupin v produktu Michaelovy adice. Hmotová spektroskopie produktu Michaelovy reakce udává molekulovou hmotnost 1011 píky přítomnými při m/z 1034 $/MNa^+ /$ a 1012 $/MH^+ /$.

Tvorba sodné soli 2'-//3-sulfo-1-oxopropyl/oxy/-taxolu byla dosažena jednostupňovou reakcí spojením taxolu s 3-hydroxy-3-oxopropylsulfonovou kyselinou za přítomnosti pyridinu a DCC /dicyklohexylkarbodiimid/, ale nebyl získán žádný produkt. To je možné vzhledem k intermolekulárnímu napadení reakčního meziprojektu sulfonylovou skupinou.

Skořicová kyselina /fenylakrylová kyselina/ byla kopulována k poloze 2' taxolu sdicyklohexylkarbodiimidem za přítomnosti 4-dimethylaminopyridinu /je třeba poznamenat, že byly použity mírné bazické podmínky pro zabránění substituci v jiných polohách struktury taxolu a pro zabránění možným vedlejším reakcím/. Na obr.2 je znázorněno NMR spektrum výsledného 2'-O-cinnamoyltaxolu a ukazuje, že se tato sloučenina vytvořila ve vysokém výtěžku a čistotě. Je třeba uvést, že jiné alfa a/nebo beta aryl substituované nebo cyklickým uhlovodíkem substituované akrylové kyseliny mohou reagovat s taxolem za vzniku 2'-akryloyl-derivátů.

Krotonová kyselina /methylakrylová kyselina/ byla kopulována k taxolu za použití dicyklohexylkarbodiimidu za přítomnosti 4-dimethylaminopyridinu. Na obr. 3 je uvedeno protonové NMR spektrum 2'-O-krotonyltaxolu, které potvrzuje syntézu 2'-O-krotonyltaxolu ve vysokém výtěžku a čistotě. Je třeba uvést, že akrylová kyselina substituovaná v alfa a/nebo beta poloze jinými alkyly nebo alkeny může reagovat s taxolem za vzniku 2'-akryloylových derivátů s touto podmínkou, že alkylové a/nebo alkenylové skupiny nevstu-

pují do reakce nebo nesnižují rozpustnost výsledných sloučenin ve vodě /obvykle delší řetězce uhlovodíků mohou poskytnout nižší rozpustnost výsledných sloučenin ve vodě/.

Deriváty 2'-O-acylkyselinového taxolu

Sodná sůl 2'-//4-//2-sulfoethyl/amino/-1,4-dioxobutyl/-oxy/taxolu a sodná sůl 2'-//4-//3-sulfopropyl/amino-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu se získají ve vysokém výtěžku kopulací 2'-sukcinyltaxolu s taurinem /2-aminoethylsulfonová kyselina/ a tetrabutylamoniovou solí 3-aminopropylsulfonové kyseliny. Je třeba poznamenat, že může být použita kvarterních amoniových solí pro získání rozpustnosti aminoalkylsulfonových kyselin v organickém rozpouštědle.

2'-Sukcinyltaxol se vytvoří reakcí sukcinanhydridu s taxolem po dvě hodiny při teplotě místnosti v pyridinu nebo DMP. Ve srovnání s NMR spektrem taxolu vykazuje NMR spektrum 2'-sukcinyltaxolu posun C-2' protonového signálu na 5,51 ppm a sukcinylového protonu vyvolávajícího multiplety umístěný při asi 2,6 ppm.

2'-Sukcinyltaxol pak reaguje s tetrabutylamoniovou solí taurinu za použití isobutylchlorformiátu jako kopulačního činidla. Tetrabutylamoniová sůl 2'-//4-//2-sulfoethyl/amino/-1,4-dioxobutyl/-oxy/taxolu byla získána ve 100% výtěžku po izolaci rychlou chromatografií na silikagelu za použití 7/1 dichlormethanu/methanolu. Reakce byla po 2 hodinách kompletní jen z 80 % podle TLC, za účelem získání 100% výtěžku byla reakční doba v případě potřeby prodloužena. NMR spektrum sulfoalkylaminových derivátů 2'-sukcinyltaxolu vykazuje nové píky při 3,6 ppm a 2,94 ppm pro dvě methylenové skupiny. Sodná sůl 2'-//4-//sulfoethyl/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu byla získána průchodem tetrabutylamoniové soli 2'-//4-//2-sulfoethyl/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu iontovýměnnou kolonou Dowex 50

/Na⁺ forma/. NMR spektrum sodné soli vykazuje absenci signálů pro tetrabutylovou skupinu. Hmotová spektroskopie sodné soli indikuje molekulovou hmotnost 1082 přítomností píků při m/z 1105 /MNa⁺/ a 1083 /MH⁺/. Sodná sůl 2'-//4-//3-sulfopropyl/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu byla připravena stejným postupem jak byl použit pro sulfoethyl-amino-taxolovou sodnou sůl. Avšak taurin byl nahrazen tetrabutylamoniovou solí 3-amino-1-sulfopropionové kyseliny. NMR potvrzuje syntézu 3-sulfopropylaminoderivátu; nové píky jsou přítomny při 3,28, 1,98 a 2,87 ppm a představují tři další methylenové skupiny, tvořící propylovou skupinu.

Tvorba sodné soli sulfopropylamino-sukcinyltaxolového derivátu se provádí průchodem tetrabutylamoniové sole sloupcem iontovýměnné pryskyřice Dowex 50 /Na⁺ forma/. Hmotová spektroskopie sodné soli sulfopropylamino-sukcinyltaxolového derivátu udává molekulovou hmotnost 1096 přítomností píků při m/z 1119 /MNa⁺/ a 1097 /MH⁺/.

Lze rovněž předpokládat, že se může vytvořit amidová vazba mezi aminosulfonovou kyselinou a anhydridem nebo dikyselinou a že produkt může reagovat s taxolem za vzniku ve vodě rozpustných 2'-O-acylkyselinových taxolových derivátů. Výhodně je aminosulfonová kyselina ve formě soli rozpustná v organickém rozpouštědla.

Pokusy připravit sodnou sůl 2'-//4-//2-sulfoethyl/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu přímo z 2'-sukcinyltaxolu jednostupňovou reakcí byly neúspěšné. 2'-Sukcinyltaxol byl spojen s triethanolaminem, isobutylchlorformiátem, tetrahydrofuranem /THF/, taurinem, DMF a vodou. Avšak voda, nezbytná pro solubilizaci taurinu, hydrolyzuje směsný anhydridový meziprodukt zpět na výchozí materiál. Jestliže se zkouší bezvodé podmínky není reakce úspěšná, protože taurin se v organických rozpouštědlech nerozpouští.

2'-//4-//2-Ethanthiol/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxol

se připraví v malém výtěžku spojením 2'-sukcinyltaxolu s triethylaminem, isobutylchlorformiátem, THF, 2-thioethylaminem a dichlormethanem. Pokusy oxidovat thiol na požadovanou sulfonovou kyselinu kyselinou meta-chlorperbenzoovou, MCPBA a dichlormethanem, nevedou k získání výraznějších množství požadovaného sulfoalkylaminosukcinyltaxolového derivátu.

Ethylenglykolové deriváty sukcinyltaxolu

2'-//4-//Hydroxyethyl/oxy/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxol byl připraven kopulací sukcinyltaxolu s ethylenglykolem. Hydroxyethyloxysukcinyltaxolový derivát byl vytvořen v 83% výtěžku po reakční době 20 hodin při teplotě místnosti. Derivát hydroxyethyloxysukcinyltaxolu byl vytvořen za účelem převedení sekundární hydroxylové skupiny v poloze 2' v taxolu na primární hydroxylovou skupinu; existuje domněnka, že hydroxylová skupina v produktu je reaktivnější než hydroxyl v taxolu a že tedy umožní přípravu jiných taxolových derivátů za mírných podmínek. NMR spektrum ethylenglykolového derivátu vykazuje přítomnost nových píků při 3,7 ppm a 4,1 ppm, které se připisují dvěma novým methylenovým skupinám hydroxyethyloxyderivátu. Hmotová spektroskopie udává molekulovou hmotnost 997 přítomností píků při m/z 1020 $/MNa^+ /$ a 998 $/MH^+ /$.

2'- η -Aminobutyryltaxolformiát

2'- η -Aminobutyryltaxolformiát byl syntetizován kopulací taxolu s N-karbobenzyloxy/CBZ/- η -aminomáselnou kyselinou s následujícím odstraněním chránicí skupiny aminu. Taxol reagoval s N-CBZ- η -aminomáselnou kyselinou za použití dicyklohexylkarbodiimidu /DCC/ jako kopulačního činidla. Výsledný 2'-NCBZ- η -aminobutyryltaxol byl připraven v 75% výtěžku po čištění preparativní TLC na silikagelu a 3/2 hexan/ethylacetátu. DCC se rozkládá na dicyklohexylmočovinu při-

davkem vody, takže přebytek činidel použitých pro řízení reakce nečiní potíže; většina dicyklohexylmočoviny a N-CBZ- γ -aminomáselné kyseliny se odstraní filtrací. Odstranění chránicí skupiny 2'-N-CBZ- γ -aminobutyryltaxolu se provede použitím 5% Pd/c jako katalyzátoru a kyseliny mravenčí jako zdroje vodíku. Kyselina mravenčí poskytuje aktivní formu vodíku pro odstranění CBZ chránicích skupin, a reakce poskytuje 2'- γ -aminobutyryltaxolový derivát jako formiátovou sůl, která je rozpustnější ve vodě než neutrální forma. NMR potvrzuje syntézu formiátu 2'- γ -aminobutyryltaxolu. Nicméně byla sloučenina nestabilní v methanolovém roztoku a po několika málo hodinách se rozkládá zpět na taxol. Tato nestabilita vylučuje další úvahy o formiátu 2'- γ -aminobutyryltaxolu jako formě pro-drug taxolu.

Rozpustnost ve vodě

Rozpustnost všech sloučenin ve vodě byla stanovena rozdělovacím koeficientem mezi 1-oktanol a vodu. Pro stanovení rozpustnosti byl použit oktanol nasycený destilovanou vodou a destilovaná voda nasycená oktanolem. Výsledky rozdělovacích pokusů ukazují, že sodná sůl 2'-//3-sulfo-1-oxopropyl/oxy/taxolu je 210krát rozpustnější ve vodě než taxol, sodná sůl 2'-//4-/2-sulfoethyl/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu je 191krát rozpustnější než taxol a sodná sůl 2'-//4-//3-sulfopropyl/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu je 118krát rozpustnější ve vodě než taxol

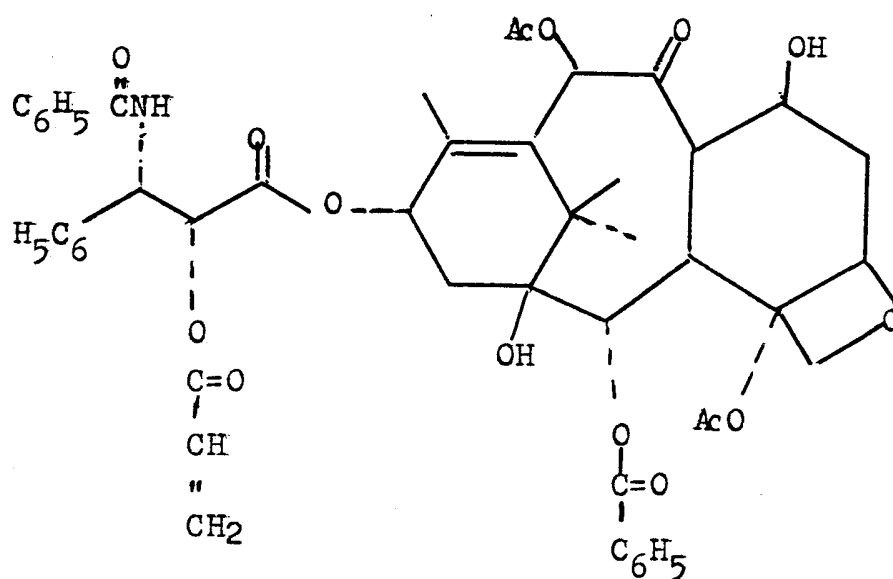
Příklady provedení vynálezu

Následující neomezující příklady poskytují specifické syntetické postupy pro přípravu derivátů taxolu rozpustných ve vodě podle předloženého vynálezu. Všechny technické a vědecké výrazy, které jsou zde použity, mají význam,

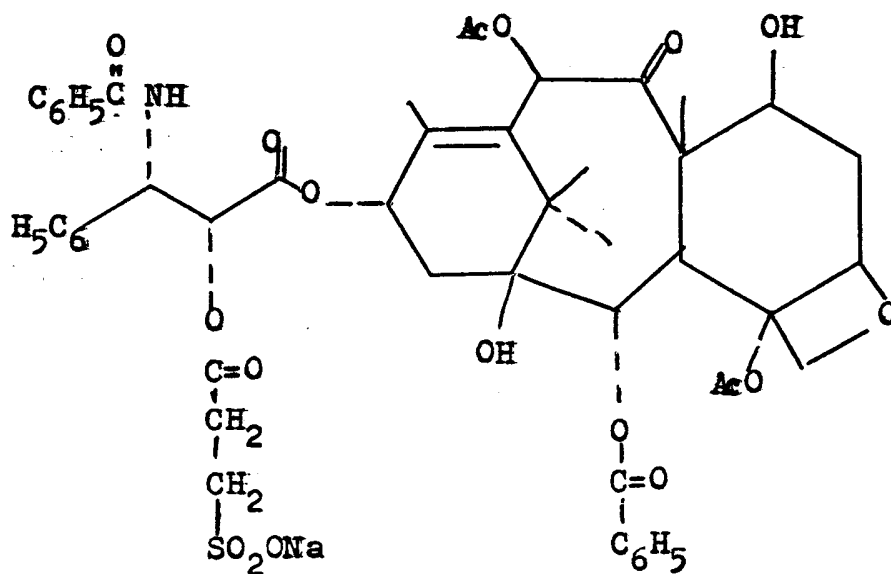
běžně používaný odborníky. Jiné metody a materiály, které jsou podobné nebo ekvivalentní zde popsaným, mohou být použity v praktickém provedení nebo testování předloženého vynálezu.

Příklad 1

Triethylamin, 50 μ l a akrylová kyselina 30 μ l se rozpustí v 5 ml suchého THF ve 25 ml baňce s kulatým dnem za argonové atmosféry. Po ochlazení roztoku na 0 °C na ledové lázni, se přidá 50 μ l isobutylchlorformiátu a reakční směs se nechá ohřát na teplotu místnosti během 15 minut. K reakční směsi se přidá sto miligramů taxolu a roztok se míchá při 60 °C 15 hodin a sleduje se pomocí TLC s dichlormethanem/ethylacetátem/2/1/. Hydrochlorid triethylaminu, vysrážený během reakce se odstraní filtrací. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu a produkt se čistí rychlou chromatografií za použití silikagelu a 1/1 dichlormethanu/ethylacetátu. Poskytne 100 mg /94 %/ 2'-akryloyl-taxolu:



Akryloylová skupiny 2'-akryloyltaxolu je dobrým Michaelovým akceptorem vzhledem k elektrofilnímu alkenovému atomu uhlíku, který je subjektem nukleofilního ataku. Reakce 2'-akryloyltaxolu se vhodným nukleofilem ~~xx~~ bude probíhat jako Michaelova adice v poloze 2'. 85 mg 2'-akryloyltaxolu se rozpustí v asi 3 ml destilovaného isopropanolu a 84 mg meta-bisulfitu sodného se rozpustí v asi 1 ml destilované vody. Tyto dva roztoky se spolu smísí a reakční směs se míchá při 60 °C asi 15 hodin. Pro sledování reakce byla použita TLC s 10/1 dichlormethanem/methanolem. Rozpouštědla se pak odstraní za vakua a voda se odstraní azeotropně s acetonitrilem. Pro čištění produktu se použije rychlá chromatografie se směsí 2/1 dichlormethan/isopropanol. Získá se 83,5 mg /83,5 %/ sodné soli 2'-//3-sulfo-1-oxopropyl/oxy/taxolu:



U vzorku produktu byla proměřena NMR, MS, UV a IR /KBr/ a byly stanoveny optická otáčivost a teplota tání. Tyto hodnoty a údaje NMR jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2 dále.

Tabulka 1

Charakteristiky sodné soli 2^{*}-//3-sulfo-1-oxopropyl/-oxy/taxolu

t.t.	175-176 °C
/α _D ²⁰	-30° /0,0012, MeOH/
IR /KBr/:	3500, 2950, 1760, 1660, 1380, 1250, 1190, 1100, 800 cm ⁻¹
UV λ MeOH max:	279 nm /ε 579/, 270 nm /ε 869/, 228 nm /ε 15072/
MS /FAB/:	1034 /MNa ⁺ /, 1012 /MH ⁺ /

Tabulka 2

NMR hodnoty pro sodnou sůl 2^{*}-//3-sulfo-1-oxopropyl/-oxy/-taxolu

Poloha	¹ H posun /ppm od TMS/ vazby /hertz/	¹³ C posun /ppm od
C-1		*
C-2	6,2 /d,7/	75
C-3	3,82 /d,7/	45,8
C-4		80,5
C-5	5,0 /d,9/	84
C-6	2,48 m	35,2
C-7	4,35 m	76
C-8		57,9
C-9		203,8
C-10	6,45 s	70,8

Tabulka 2 /pokračování/

C-11		131
C-12		141
C-13	6,09 /t,8/	75,4
C-14	2,48 m	35,8
C-15		43
C-16	1,15 s	25,9
C-17	1,17 s	19,8
C-18	1,95 s	13,8
C-19	1,67 s	9,4
C-20	4,21 s	70,8
C-1*		171
C-2*	5,45 /d,3/	74
C-3*	5,84 /d,7/	53,1
N-H	7,26 /t,9/	
CH ₃ /OAc/	2,2 s	21
CH ₃ /OAc/	2,4 s	21,9
Bz	7,4-8,1 m	126,8-138,1
CO/OAc/		168,4
CO/OAc/		169,9
CO/PBz/		166,2
CO/NBz/		168,2
C-1"		170,2
C-2"	2,93 /t,8/	29,2
C-3"	3,14 /t,8/	63,2

* pod CHCl₃ signálem

Je nutno poznamenat, že lze předpokládat, že použitá akrylová kyselina může být nahrazena jinými sloučeninami z derivátů akrylové kyseliny, které jsou také dobrými Michaelovými akceptory a že solitvorná skupina může být jiný alkalický kov nebo amoniová skupina jako je tetrabutylamoniová skupina. Lze rovněž také předpokládat, že solitvorná skupina může být nahrazena H. Biologické testování

sodné soli 2'-//3-sulfo-1-oxopropyl/oxy/taxolu dokládá, že sloučenina má zlepšenou rozpustnost ve vodě a je navíc bioaktivní.

Příklad 2

206 mg taxolu bylo smíseno se 2,9 mg 4-dimethylaminopyridinu /DMAP/ a 49 mg anhydridu kyseliny jantarové ve 25ml baňce opatřené magnetickým míchadlem. 2,0 ml suchého pyridinu se přidá a roztok se míchá při teplotě místnosti 2,5 h. Přidá se několik mililitrů vody pro vznik bílé sraženiny v zakalené suspenzi. Pro extrakci produktu se přidá několik mililitrů dichlormethanu. Přídavek 1 ml koncentrované HCl způsobí, že zmizí bílá vodná suspenze. Pro sušení dichlormethanové vrstvy se použije síran sodný, který se pak odfiltruje a odpaří. TLC se 7/1 CH₂Cl₂/MeOH indikuje pouze stopy zbylého pyridinu. Zbylý pyridin se odstraní opakovaným přídavkem heptanu s následujícím odpařením. Získá se 218 g sukcinyltaxolu, což představuje 96,6% výtěžek. Protonové NMR spektrum produktu je shodné s hodnotami, které jsou uváděny v literatuře. Struktura byla také potvrzena použitím 2D-NMR HOMO COSY /homonukleární korelační spektroskopie/.

Taurin, H₂NCH₂CH₂SO₃H, je vysoce polární sloučenina, která je v podstatě nerozpustná v organických rozpouštědlech jako je chloroform. Taurinové deriváty organických kyselin se vyráběly dříve zpracováním chloridu kyseliny s taurinem za Schotten-Baumannových podmínek /tj. ve vodném-bázickém nebo vodném-ethanolickém roztoku/. Tato metoda je nepříjemná pro taxol, protože tento snadno hydrolyzuje na bázi, a takto by se za reakčních podmínek rozkládal. Za účelem odstranění tohoto problému, byla vyvinuta nová metoda, která je dále následována odstraněním nezreagovaných materiálů a odpařením. Získá se tak tetrabutylamoniová sůl taurinu místo dříve užívané

sodné soli. Tetrabutylamoniová sůl taurinu je rozpustná v organických rozpouštědlech jako je dichlormethan. 2'-Sukcinyltaxol v THF a triethylamin mohou tak reagovat s isobutylchlorformiátem a tetrabutylamoniovou solí taurinu za vzniku tetrabutylamoniové soli taurinového derivátu taxolu. Meziprodukt je směsný anhydrid, který hydrolyzuje zpětně na výchozí sloučeninu za přítomnosti vody.

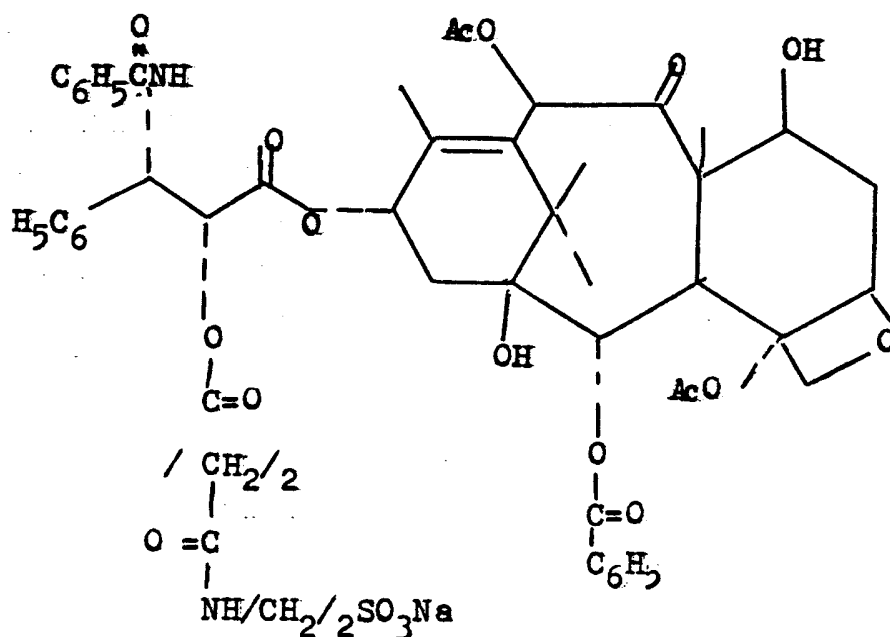
Pro rozpuštění 250 mg taurinu v baňce se použije minimální objem destilované vody a k roztoku se přidá 1 ml vodného tetrabutylamoniumhydroxidu. Roztok se míchá jednu hodinu při teplotě místnosti a pak se odpaří do sucha. Suchý produkt se rozpustí v suchém THF /asi 15 ml/, filtruje a filtrát se odpaří do sucha. Sušený produkt se pak znovu rozpustí ve 2 ml sušeného THF.

Příprava tetrabutylamoniové soli 2'-//4-//2-sulfoethyl/-amino-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu

Roztok 2'-sukcinyltaxolu, vzniklý rozpuštěním 122 mg 2'-sukcinyltaxolu v asi 4 ml sušeného THF a 50 μ l triethylaminu se ochladí asi na 0 °C. Roztok se pak spojí s 50 μ l isobutylchlorformiátu, reakční směs se zahřívá na teplotu místnosti během 15 minut a přidá se 0,5 ml tetrabutylamoniové soli taurinu v THF /ekvivalent k 91 mg tetrabutylamoniové soli taurinu /. Po přidavku tetrabutylamoniové soli taurinu se reakční směs míchá při teplotě místnosti 5 hodin a reakce se sleduje pomocí TLC se směsí 2/1 EtOAc/MeOH. Reakční směs se pak odfiltruje a rozpouštědla se odpaří. Purifikací rychlou chromatografií za použití silikagelu /300 x 15 mm lože, 7/1 CH₂Cl₂/MeOH se získá 168 mg /100 %/ tetrabutylamoniové soli 2'-//4-//2-sulfoethyl/-amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/-taxolu.

Tetrabutylamoniové sůl se převede na sodnou sůl tak, že se umístí 160 mg tetrabutylamoniové soli do kádinky s iontovýměnnou pryskyřicí Dowex 50 v Na^+ formě /asi 3 ml pryskyřice ve 3 ml deionizované vody/. Po míchání směsi 1,5 hodiny při teplotě místnosti se směs nechá projít malým sloupcem pryskyřice, který obsahuje 2 ml pryskyřice v Na^+ formě, za použití deionizované vody jako rozpouštědla.

Roztok azeotropní destilací s acetonitrilem poskytne 122 mg /91,7 %/ sodné soli 2'-//4-//2-sulfoethyl/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu:



V dále uvedené tabulce 3 jsou charakteristické hodnoty této sloučeniny a hodnoty chemických posunů NMR jsou uvedeny dále v tabulce 4.

Tabulka 3

Tabulka 3 Charakteristiky sodné soli 2'-//4-//2-sulfoethyl/-amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu

T.t.	174-175 °C
α_D^{20}	-29,8° /0,0055, MeOH/
IR/KBr/:	3450, 3000, 1760, 1730, 1660, 1560, 1400, 1260, 1190, 1050 cm ⁻¹
UV λ MeOH max,	279 nm / ϵ 649/, 271 nm / ϵ 8920/, 228 nm / ϵ 12824/
MS /FAB/:	1105 /MNa ⁺ /, 1083 /MH ⁺ /

Tabulka 4

NMR hodnoty pro sodnou sůl 2'-//4-//2-sulfoethyl/-amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu

Poloha	¹ H posun /ppm od TMS/ vazba /hertz/	¹³ C posun /ppm od TMS/
C-1		79
C-2	5,66 /d,7/	76,6
C-3	3,8 /d,7/	47,2
C-4		81,6
C-5	5,02 /d,9/	85,4
C-6	2,52 m	36
C-7	4,35 m	77,3
C-8		58,8
C-9		204,8
C-10	6,43 s	72,8
C-11		132,6
C-12		142,2
C-13	6,05 /t,8/	75,9
C-14	2,14 m	36,2
C-15		44,1
C-16	1,18 s	26,8
C-17	1,18 s	21

Tabulka 4 /pokračování/

C-18	1,94 s	14,9
C-19	1,67 s	10,2
C-20	4,23	72
C-1*		173,4
C-2*	5,46 /d,7/	75,8
C-3*	5,8 /dd,7,7/	55
N-H	7,27 /t,7/	
CH ₃ /OAc/	2,2 s	22,2
CH ₃ /OAc/	2,4 s	23,3
Bz	7,4-8,1 m	126,8-138,1
CO/OAc/		170,2
CO/OAc/		170,2
CO/OBz/		167,2
CO/NBz/		171,2
C-1*		173,1
C-2*	2,72 m	30
C-3*	2,52 m	30
C-4*		173,1
C-1"	3,58 m	47
C-2"	2,96 m	51
N-H	3,58 /t,7/	

Je třeba poznamenat, že tetrabutylamoniová sůl tau-
rinu může snadno reagovat s jinými 2'-O-acyl-kyselinovými
deriváty taxolu jako je 2'-glutaryltaxol. 2'-Glutaryl-
taxol může být snadno získán náhradou anhydridu kyseliny
jantarové anhydridem kyseliny glutarové. Předpokládá se,
že jiné deriváty kyseliny šťavelové a jiné anhydrody mo-
hou reagovat s taxolem více či méně stejně jako zde spe-
cificky popsané sloučeniny. Je třeba uvést, že v některých
případech může být 2'-glutaryltaxol preferován při po-
užití před jinými 2'-O-acylkyselinovými taxoly. Dále je

možno předpokládat, že skupina tvořící sůl může být nahrazena vodíkem nebo jiným alkalickým kovem nebo kovem alkalické zeminy.

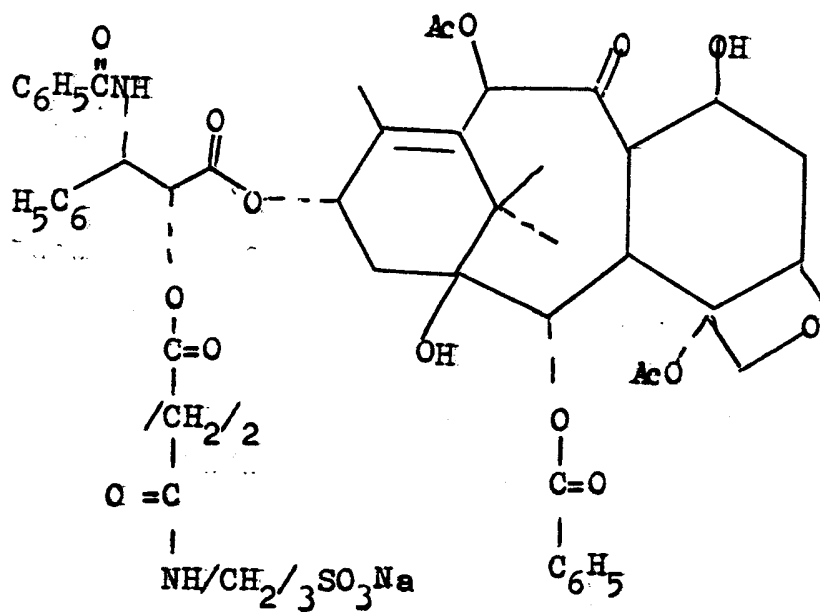
Příklad 3

Připraví se roztok 280 mg 3-amino-1-sulfopropionové kyseliny v destilované vodě a přidá se 1 ml hydroxidu tetrabutylamonného. Roztok se míchá při 60 °C jednu hodinu a pak se odpaří do sucha. Produkt se rozpustí v asi 15 ml THF a přebytek kyseliny 3-amino-1-sulfopropionové se odstraní filtrací. Filtrát se odpaří a znovu se rozpustí ve 2 ml sušeného THF pro následující reakci.

Připraví se roztok 130 mg 2'-sukcinyltaxolu a 50 μ l triethylaminu ve 4 ml suchého THF a roztok se ochladí na 0 °C. Přidá se 50 μ l isobutylchlorformiátu k reakční směsi a roztok se za asi 15 minut ohřeje na teplotu místnosti. Přidá se 0,6 ml tetrabutylamoniové soli kyseliny 3-amino-1-sulfopropionové v roztoku THF /ekvivalent 108 g tetrabutylamoniové soli kyseliny 3-amino-1-sulfopropionové/. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po tři hodiny a postup reakce se sleduje pomocí TLC se směsí 4/1 ethylacetátu/methanolu. Reakční roztok se pak zfiltruje a odpaří, produkt se čistí rychlou chromatografií za použití silikagelu /300 mm x 15 mm lože s elučním činidlem 10/1 dichlormethan/methanol/. Výtěžek 128 mg /71,2 %/ homogenní tetrabutylamoniové soli taxolu.

Tetrabutylamoniová sůl se převede na sodnou sůl umístěním tetrabutylamoniové soli 2'-//4-//3-sulfopropyl/-amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu do kádinky s iontovýměnnou pryskyřicí Dowex 50 v Na⁺ formě /asi 3 ml pryskyřice na 3 ml deionizované vody/. Směs se míchá při teplotě místnosti asi 1,5 hodiny a pak se nechá projít sloupem pryskyřice, který obsahuje 2 ml pryskyřice v Na⁺ formě a za použití deionizované vody jako rozpouštědla.

Roztok se azeotropně oddestiluje s acetonitrilem a získá se 84 mg /79,3 %/ sodné soli 2'-//4-//3-sulfopropyl/-amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu:



Charakteristické hodnoty této sloučeniny jsou uvedeny v tabulce 5 a NMR chemické posuny jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 5

Charakteristické hodnoty pro sodnou sůl 2'-//4-//3-sulfopropyl/-amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu

T.t.	168-169 °C
α_D^{20}	-29° /0,001, MeOH/
IR /KBr/:	3480, 3000, 1760, 1660, 1550, 1400, 1260, 1050 cm ⁻¹
UV λ MeOH max:	279 nm / ϵ 974/, 271 nm / ϵ 1240/, 228 nm / ϵ 12719/
MS /FAB/:	1119 /MNa ⁺ /, 1097 /MH ⁺ /

Tabulka 6

NMR hodnoty pro sodnou sůl 2'-//4-//3-sulfopropyl/-
amina/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu

P _o loha	¹ H posun /ppm od TMS/ vazba /hertz/	¹³ C posun /ppm od TMS/
C-1		✱
C-2	5,63 /d,7/	74,8
C-3	3,8 /d,7/	46
C-4		80,8
C-5	4,99 /d,9/	84,2
C-6	2,5 m	34,7
C-7	4,34 m	75,9
C-8		57,5
C-9		204,2
C-10	6,44 s	71,3
C-11		131,6
C-12		141,2
C-13	6,05 /t,8/	75,2
C-14	2,14 m	35,7
C-15		42,8
C-16	1,16 s	25,6
C-17	1,16 s	19,4
C-18	1,93 s	13,6
C-19	1,67 s	8,9
C-20	4,21 s	70,8
C-1'		172
C-2'	5,44 /d,7/	74,2
C-3'	5,79 /dd, 7,7/	53,6
N-H	7,25 /t,7/	
CH ₃ /OAc/	2,2 s	20,9
CH ₃ /OAc/	2,4 s	21,6
Bz	7,4-8,1 m	126,8-138,1
CO/OAc/		169
CO/OAc/		170,2
CO/OBz/		166,4

Tabulka 6 /pokračování/

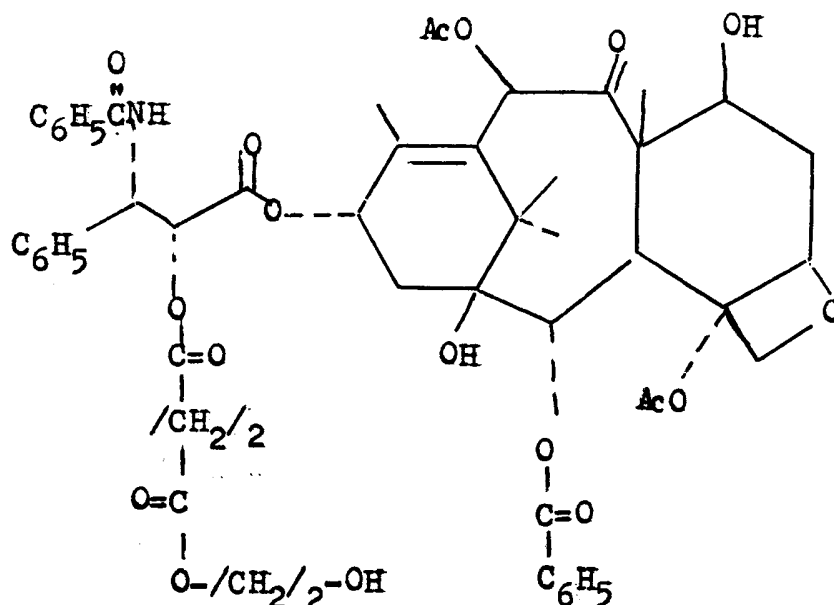
CO/NBz/		170,2
C-1°		171,9
C-2°	2,75 /t,7/	29
C-3°	2,54 /t,7/	29,8
C-4°		171,9
C-1"	3,25 m	37,9
C-2"	1,98 m	28,3
C-3"	2,85 /t,7/	**

* pod signálem CHCl_3 ** pod signálem MeOH

Je třeba poznamenat, že sodík může být nahrazen H nebo jinou solitvornou skupinou jako jsou alkalické kovy nebo kovy alkalických zemin a amoniová skupina.

Příklad 4

Roztok 26 mg 2°-sukcinyltaxolu a 20 μl triethylami-
nu ve 2 ml sušeného THF se připraví pod argonovou atmo-
sférou a roztok se ochladí na 1 °C. K roztoku se přidá
10 μl isobutylchlorformiátu a reakční směs se během asi
15 minut ohřeje na teplotu místnosti. Po ohřátí se přidá
5 μl ethylenglykolu a reakční směs se míchá 15 hodin při
teplotě místnosti. Postup reakce se sleduje TLC s elucí
směsí 1:1 dichlormethan/ethylacetát. Reakce se ukončí od-
filtrováním sraženiny a odpařením rozpouštědla. Surový
produkt se čistí preparativní TLC /1:3 dichlormethan/ethyl-
acetát/, získá se 25 mg /83,3 %/ 2°-//4-//2-hydroxy-
ethyl/oxy-1,4-dioxobtyl/oxy/taxolu:



Charakteristické hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7 a hodnoty NMR posunů v tabulce 8.

Tabulka 7

Charakteristické hodnoty pro 2'-//4-//2-hydroxyethyl/-oxy/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxol

T.t.	164-165 °C
α_D^{20}	-32,5° /0,002, MeOH/
IR /KBr/:	3500, 2950, 1760, 1740, 1660, 1390, 1260, 1160, 1080, 1040 cm ⁻¹
UV λ MeOH max:	279 nm / ϵ 609/, 272 nm / ϵ 831/, 228 nm / ϵ 14404/
MS /FAB/:	1020 /MNa ⁺ /, 998 /MH ⁺ /

Tabulka 8

NMR hodnoty pro 2'-//4-//2-hydroxyethyl/oxy/-1,4-dioxo-butyl/oxy/taxol

Poloha	^1H posun /ppm od TMS/ vazba /hertz/	^{13}C posun /ppm od TMS/
C-1		79,1
C-2	5,7 /d,7/	75,8
C-3	3,8 /d,7/	45,8
C-4		81
C-5	4,95 /d,9/	84,3
C-6	2,56 m	35,6
C-7	4,43 m	75,8
C-8		58,2
C-9		204
C-10	6,29 m	72,1
C-11		132
C-12		142,3
C-13	6,23 /t,8/	75,8
C-14	2,42 m	35,6
C-15		43,2
C-16	1,23 s	26,8
C-17	1,15 s	20,5
C-18	1,94 s	14,3
C-19	1,70 s	9,8
C-20	4,19 /d,8/	72,1
C-1'		172,2
C-2'	5,48 Pd,3/	74,3
C-3'	5,97 /dd, 3,9/	52,9
N-H	7,14 /d,9/	
CH ₃ /OAc/	2,25 s	22,1
CH ₃ /OAc/	2,45 s	22,8
Bz	7,4-8,1 m	126,8-138,1
CO/OAc/		168
CO/OAc/		169,9
CO/OBz/		167
CO/NBz/		167,3

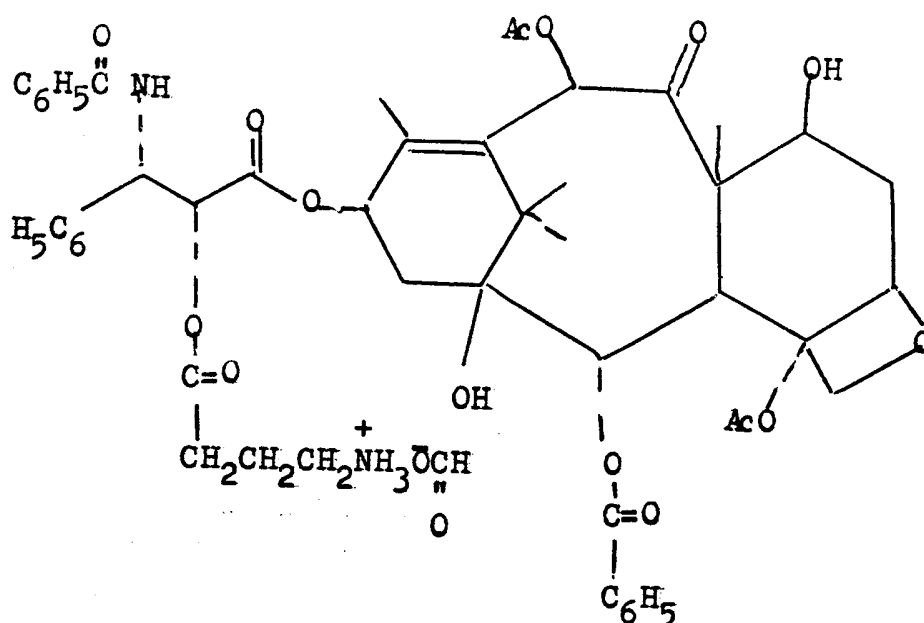
Tabulka 8 /pokračování/

C-1*		171
C-2*	2,65 m	29
C-3*	2,78 m	29
C-4*		171
C-1"	3,7 /t,7/	66,2
C-2"	4,1 m	61

Příklad 5

Do 10ml banky se vloží 20 mg taxolu, 40 mg dicyklohexylkarbodiimidu a 20 mg kyseliny N-karbobenzyl- β -aminomáselné. Reaktanty se rozpustí ve 4 ml suchého acetonitrilu /suchý acetonitril se získá průchodem acetonitrilu aktivovaným oxidem hlinitým/. Po 30hodinovém míchání reakční směsi při teplotě místnosti se roztok odfiltruje pro odstranění vysrážené dicyklohexylmočoviny. Rozpuštědlo se pak odstraní ve vakuu a surový produkt se oddělí preparativní TLC s elucí 45:55 hexan/ethylacetát. Získá se 19,1 mg /75,9 %/ čistého 2'-N-CBZ- β -aminobutyryl-taxolu.

2'- β -Aminobutyryltaxolformiát se syntetizuje přidavkem 6 mg 2'-N-CBZ- β -aminobutyryltaxolu k 1,5 ml methanolu. Po rozpuštění CBZ-taxolového derivátu se přidá 1 ml kyseliny mravenčí pro vznik 40% roztoku kyseliny mravenčí v methanolu. Reakce se provádí přidavkem 5 mg 5% Pd/C k roztoku a jeho mícháním při teplotě místnosti po 26 hodin. Reakce se ukončí odfiltrováním Pd/C a sušením filtrátu za vakua. Získá se 2'- β -aminobutyryltaxol-formiát:



Po několika hodinách NMR a TLC se 2:1:0,02 směsí dichlormethanu/ethylacetátu/methanolu ukazuje, že 2'- γ -aminobutyryltaxol-formiát se rozložil zpět na taxol.

Příklad 6

Rozpustnost taxolu ve vodě byla stanovena rozpouštěním 1,6 mg taxolu v 10 ml destilované vody nasycené 1-oktano-lem v 60ml dělicí nálevce a potom se přidá 10 ml 1-oktanolu nasyceného destilovanou vodou. Nálevkou se třepe a ponechá se stát asi 30 minut až se oddělí organická a vodná fáze. Provede se měření UV absorpce při 228 nm u vodné vrstvy a/nebo oktanolové vrstvy, oktanolová vrstva se pětkrát ředí před měřením.

Postupem výše uvedeným se stanoví rozpustnosti 0,8 mg sodné soli 2'-//3-sulfo-1-oxopropyl/oxy/taxolu, 0,8 mg sodné soli 2'-//4-//2-sulfoethyl/amino/-1,4-dioxobutyl/oxy/taxolu a 0,7 mg sodné soli 2'-//4-//3-sulfopropyl/amino/-1,4-dioxybutyl/oxy/taxolu vzhledem k taxolu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9:

Tabulka 9

Rozpustnost derivátů taxolu ve vodě vzhledem k taxolu

Sloučenina	relativní rozpustnost
taxol	1
sodná sůl 2'-7/3-sulfo-1-oxopropyl/-oxy/taxolu	210
sodná sůl 2'-7/4-//2-sulfoethyl/amino/-1,4-dioxybutyl/oxy/taxolu	191
sodná sůl 2'-//4-//3-sulfopropyl/amino/-1,4-dioxybutyl/oxy/taxolu	118

Z tabulky 9 je zřejmé, že 2'-akryloyltaxolový derivát má nejvyšší rozpustnost ve vodě a je 210krát rozpustnější ve vodě než taxol. Je třeba poznamenat, že taurin-2'-sukcinyltaxolový derivát má větší rozpustnost ve vodě než derivát 3-amino-1-sulfopropionové kyseliny a 2'-sukcinyltaxolu. Obě sloučeniny však mají rozpustnosti větší 100krát než taxol. Snížení rozpustnosti 3-amino-1-sulfopropionové kyseliny a taxolu je převděpodobně způsobeno zvětšením délky alkylového řetězce.

Příklad 7

I když je zřejmé z příkladu 1 výše, že další sloučeniny ze skupiny derivátů akrylové kyseliny, jako je - aniz by docházelo k omezení na tyto sloučeniny - akrylová kyselina substituovaná v alfa nebo beta poloze alkyly, alkeny, aryly a cyklickými sloučeninami, byly připraveny další deriváty akrylové kyseliny a taxolu, aby bylo ověřeno, že i další deriváty akrylové kyseliny mohou reagovat s taxolem stejně jako akrylová kyselina.

Taxol /22 mg/ ve vysušené baňce promyté argonem, byl zpracován při 0 °C s 1 mol roztoků připraveného z dicyklo-

hexylkarbodiimidu /DCC, 39,9 mg/, kyseliny trans-slořicové /16,0 mg/ a suchého acetonitrilu /asi 4,0 ml/. Bylo přidáno katalytické množství dimethylaminopyridinu /DMAP/, a reakce byla sledována chromatografií na tenké vrstvě. Po 15 minutách byl přidán 1 ml /druhý podíl/ reakčního činidla. Po asi půl hodině se směs ohřeje na 25 °C a ponechá se stát 1 hodinu. Reakce poskytne 10,4 mg 2'-trans-cinnamoyltaxolu /výtěžek asi 65 %/. NMR spektrum 2'-trans-cinnamoyltaxolu je uvedeno na obr.2.

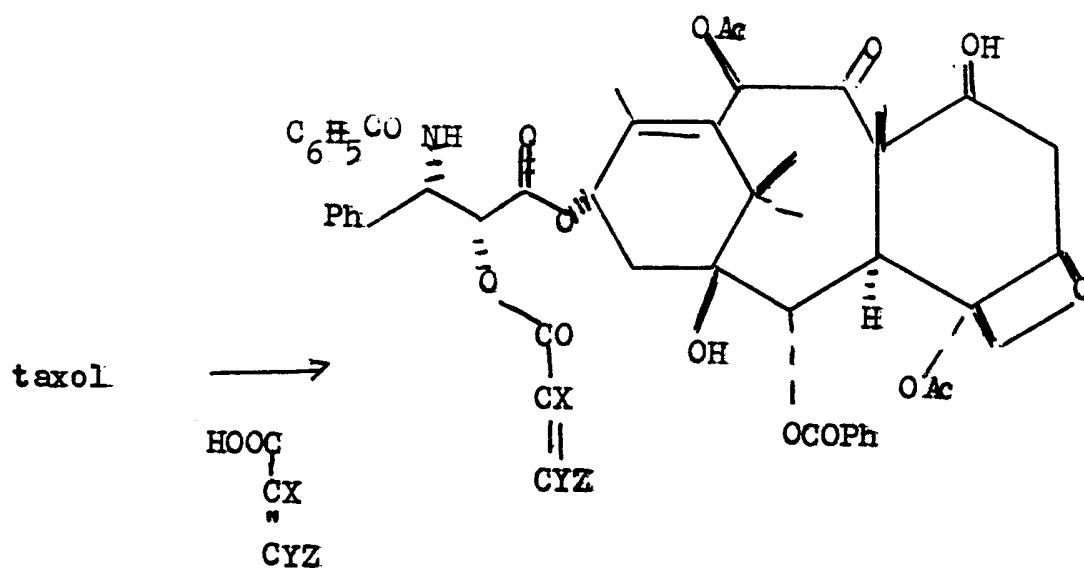
Příklad 8

Taxol /23 mg/ ve vysušené baňce promyté argonem, byl zpracován při 0 °C s 1 ml roztoku připraveného ze 43 mg DCC, 10,0 mg kyseliny krotonové a 4 ml suchého acetonitrilu. Bylo přidáno katalytické množství dimethylaminopyridinu /DMAP/ a reakce byla sledována TLC. Po 15 minutách byl přidán druhý 1 ml podíl reakčního činidla a po asi půl hodině byla směs ohřata na 25 °C a ponechána stát 1 hodinu. Čištění a analýza potvrzují syntézu 2'-trans-krotonyltaxolu /45 % výtěžek/. NMR spektrum 2'-trans-krotonyltaxolu je uvedeno na obr. 3.

Příklad 9

Stejným postupem jako v příkladu 1 se taxol převede na 2'-acyltaxoly uvedené v tabulce 10 reakcí se vhodnými kyselinami.

Teploty tání se mění v závislosti na čistotě získané sloučeniny.



Tabulka 10

Struktury analogů taxolu

Karboxylová kyselina			2'-acyltaxol		
X	Y	Z	X	Y	Z
H	CH ₃	H	H	CH ₃	H
CH ₃	H	H	CH ₃	H	H
C ₆ H ₅	H	H	C ₆ H ₅	H	H
C ₄ H ₉	H	H	C ₄ H ₉	H	H
C ₈ H ₁₇	H	H	C ₈ H ₁₇	H	H
H	Cl	Cl	H	Cl	Cl
Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl
CN	H	H	CN	H	H
H	CN	CN	H	CN	CN
Cl	CH ₃	CH ₃	Cl	CH ₃	CH ₃
CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	C ₆ H ₅	H	H	C ₆ H ₅	H

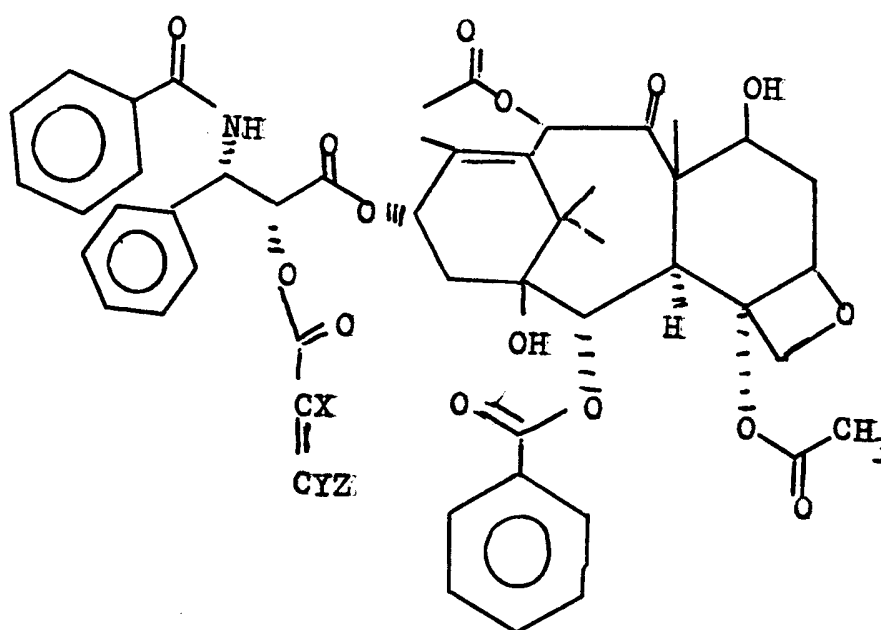
Předložený vynález tak poskytuje nové deriváty taxolu se zvýšenou rozpustností ve vodě ve srovnání s nerivatizovaným taxolem, které jsou stabilní po delší dobu, než určité dřívější deriváty taxolu, které mají ve vodě zvýšenou rozpustnost. Tyto sloučeniny jsou produkovány novými způsoby, které vedou ve vysokých výtěžcích v podstatě k čistým sloučeninám. Charakteristické hodnoty a NMR studie potvrzují strukturu a vlastnosti taxolových derivátů podle předloženého vynálezu. Kromě toho, že mají vysokou rozpustnost ve vodě a zlepšenou stabilitu, udržují si tyto sloučeniny biologickou aktivitu a jsou použitelné jako antineoplastická, antileukemická a antikancerogenní prodrugs.

Ekvivalenty ve vodě rozpustných taxolových derivátů podle předloženého vynálezu zahrnují 2'-akryloyl a 2'-O-acylkyselinové deriváty taxolu, které mají jeden nebo více vedlejších řetězců nebo kruhových substituentů substituovaných neinterferující skupinou /např. substituovanou skupinou, která podstatně nemění žádoucí vlastnosti taxolových derivátů podle předloženého vynálezu./, jako je substituce -H, -OH, -OR, -NR, -Ar nebo =O jinou neinterferující skupinou, přičemž vynález není těmito příklady nikterak omezen.

Z výše uvedeného je zřejmé, že existuje mnoho modifikací a variací tohoto vynálezu. Je proto nutné vycházet z toho, že vynález prakticky může být proveden i jinak, než jak bylo specificky popsáno.

PATENTOVÉ NÁROKY

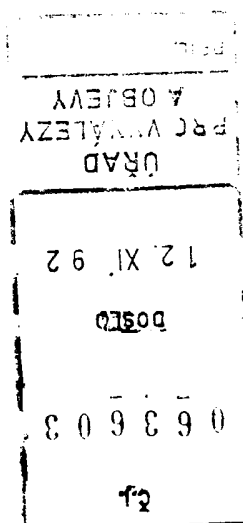
1. Taxolová sloučenina obecného vzorce

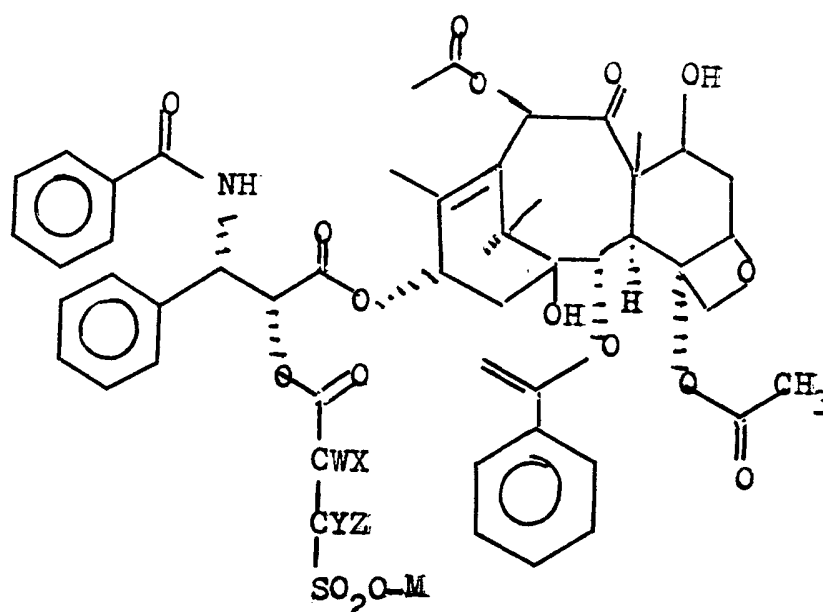


kde

X, Y a Z mohou být stejné nebo rozdílné a X, Y a Z jsou vybrány ze skupiny, zahrnující H, alkyly nebo aryly.

2. Ve vodě rozpustná taxolová sloučenina obecného vzorce





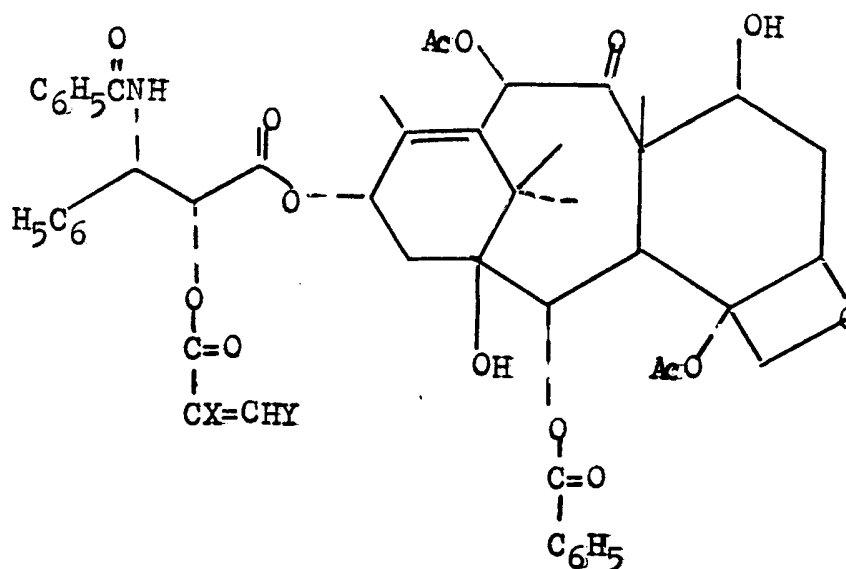
kde

W, X, Y a Z mohou být stejné nebo rozdílné a

W, X, Y a Z jsou vybrány ze skupiny, zahrnující H, aryle a alkyly.

3. Sloučenina podle nároku 2, která je ve vodě rozpustnější než taxol a udržuje si nejméně stejnou antineoplastickou aktivitu jako taxol.

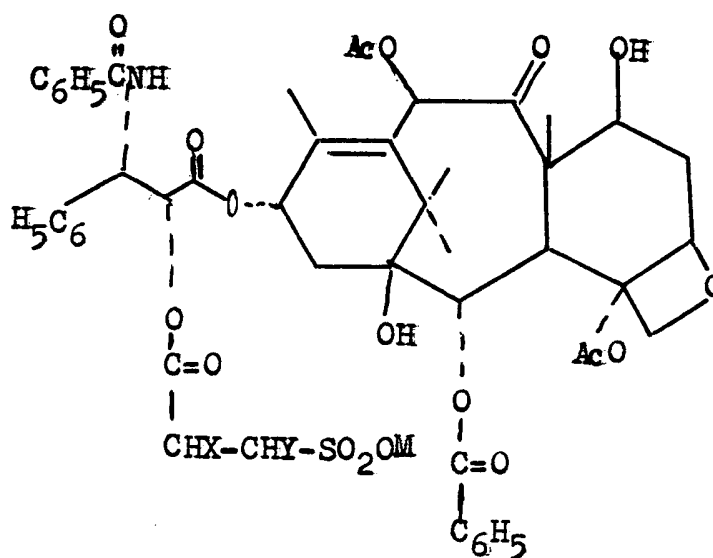
4. Deriváty taxolu obecného vzorce



kde

X je vybráno ze skupiny, zahrnující H, alkyly a aryly a
Y je vybráno ze skupiny, zahrnující H, alkyly a aryly.

3. Sloučenina podle nároku 4, kde X a Y jsou H.
4. Ve vodě rozpustné deriváty taxolu, mající obecný vzorec



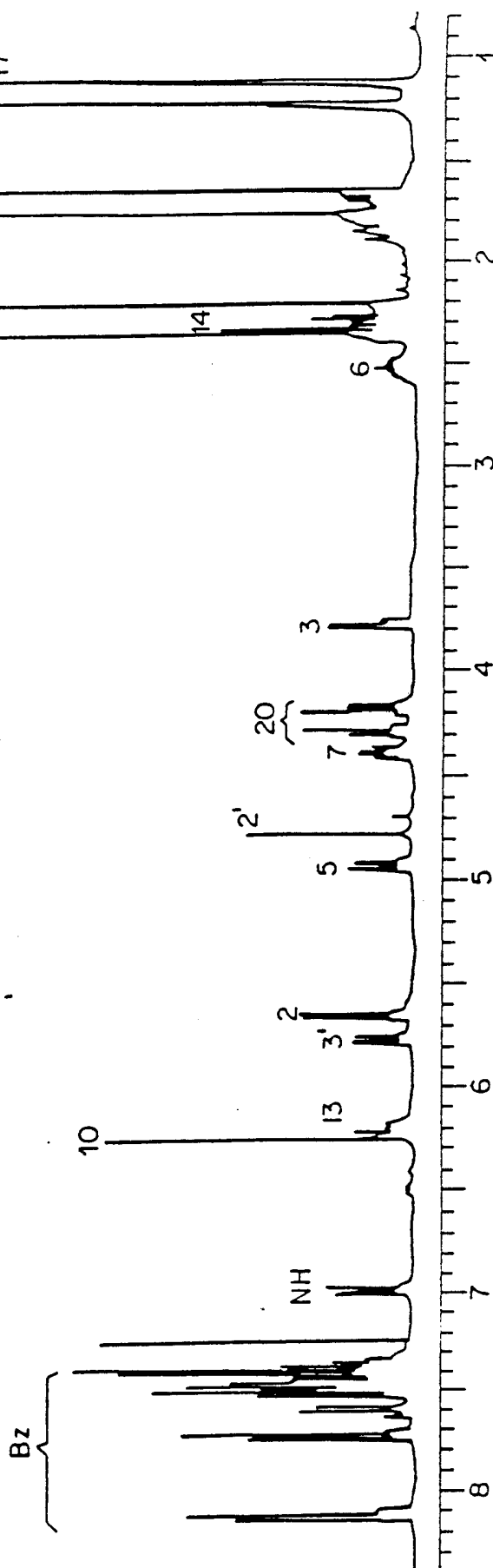
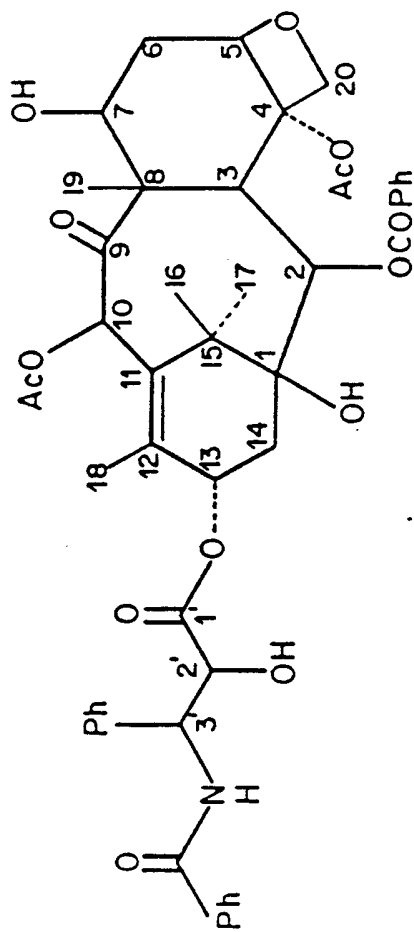
kde X je vybráno ze skupiny, zahrnující H, alkyly a aryly,
Y je vybráno ze skupiny, zahrnující H, alkyly a aryly a
M je vybráno ze skupiny, zahrnující H, alkalické kovy
a amoniové skupiny.

7. Sloučenina podle nároku 6, kde
X a Y jsou H a
M je Na.

8. Sloučenina podle nároku 6, která je rozpustnější
ve vodě než taxol a udržuje si nejméně stejnou antineoplas-
tickou aktivitu jako taxol.

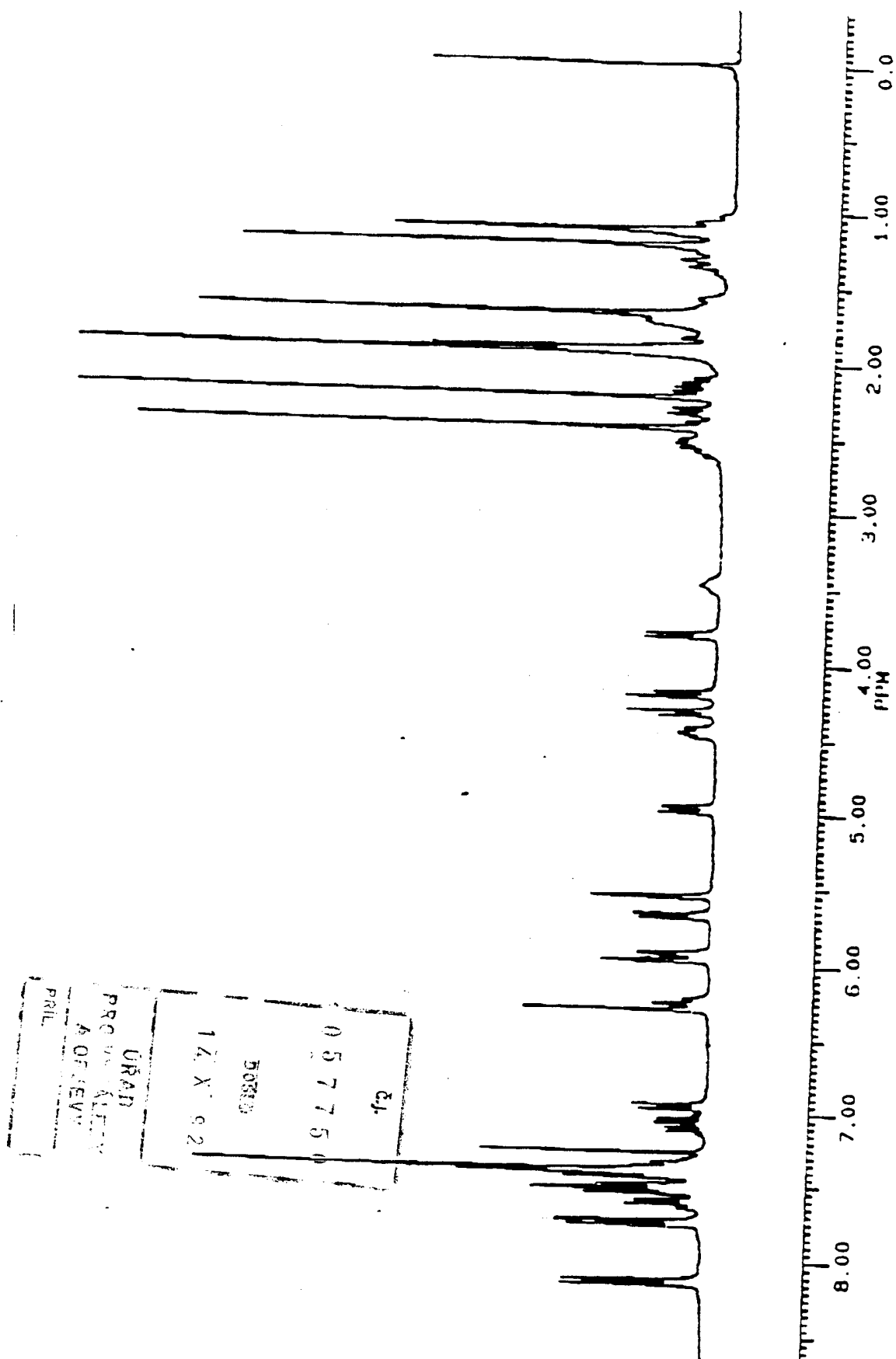
25 X 71
 051100
 17
 051100
 17

OBR. 1

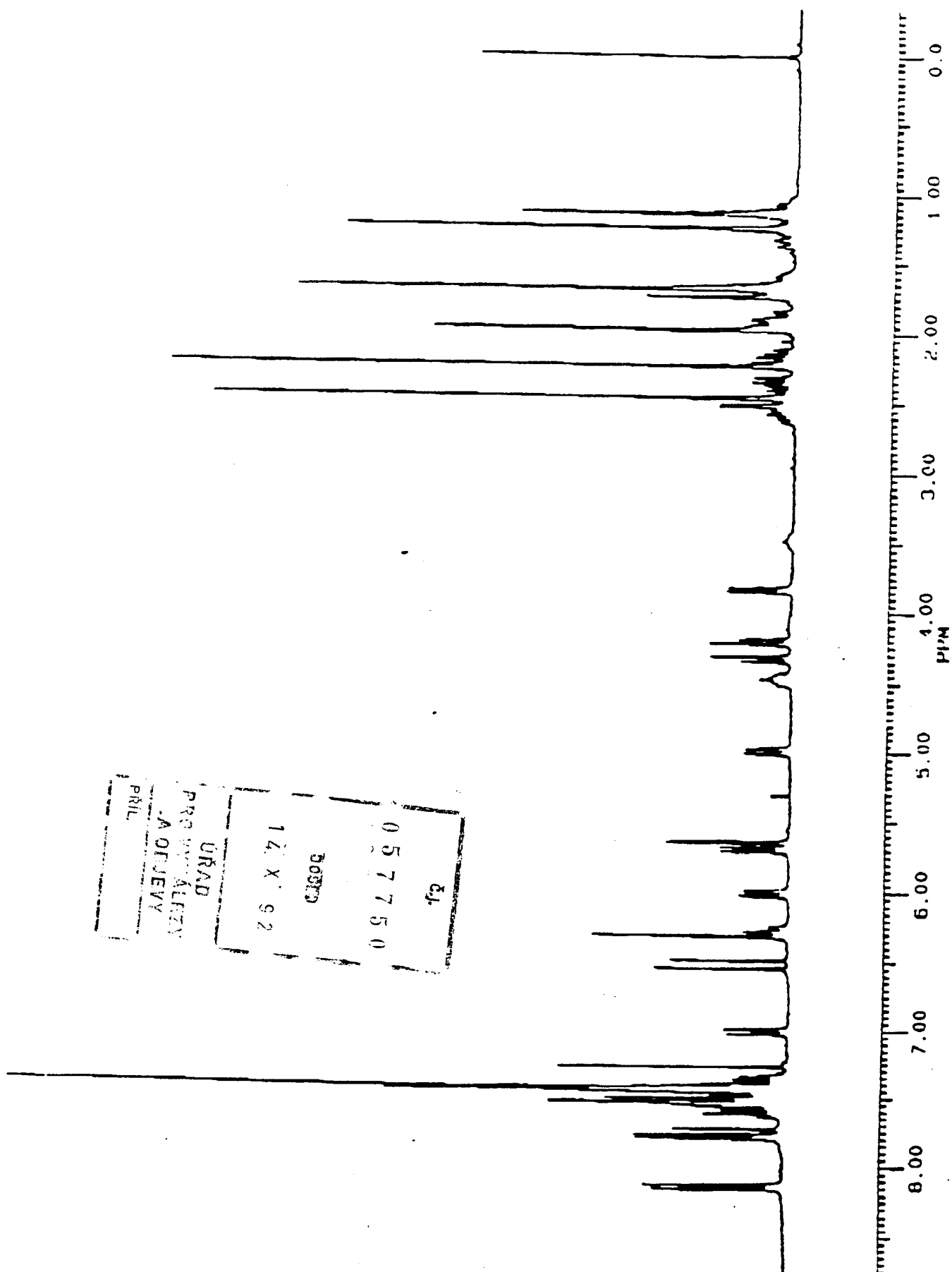


^1H NMR SPECTRUM TAXOLOL

3122-92



8122-92



OBR. 3