

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2000-3178
(22) Přihlášeno: 03.03.1999
(30) Právo přednosti: 03.03.1998 US 09/033,659
(40) Zveřejněno: 14.02.2001
(Věstník č. 2/2001)
(47) Uděleno: 10.02.2010
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 24.03.2010
(Věstník č. 12/2010)
(86) PCT číslo: PCT/US1999/004704
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1999/045015

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.:

C07H 15/252 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 4 585 859; US 4 353 894; GB 2 238 540; JP 5 247 080; CZ 2000-471.

(73) Majitel patentu:

GEM PHARMACEUTICALS, INC., Pelham, AL, US

(72) Původce:

Zhang Xini, Hoover, AL, US

Olson Richard D., Nampa, ID, US

(74) Zástupce:

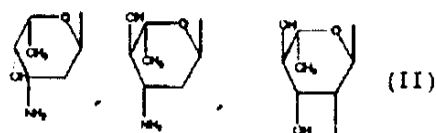
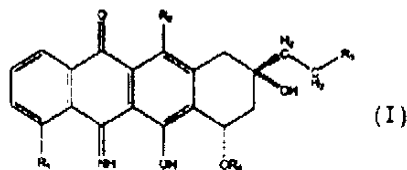
Ing. Ivana Jirotková, Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

Deriváty 5-imino-13-deoxyanthracyklinu, jejich použití a způsob přípravy

(57) Anotace:

Deriváty 5-imino-13-deoxyanthracyklinu vzorce I, kde: R_1 , R_2 a R_3 každé nezávisle znamená substituent vybraný ze skupiny sestávající z H, OH a OCH_3 a R_4 je cukerná část vybraná ze skupiny sestávající z cukerných zbytků vzorce II, způsob jejich přípravy a jejich léčebné využití k léčení rakoviny, autoimunitních chorob nebo poruch deficitu imunity.



Deriváty 5-imino-13-deoxyanthracyklinu, jejich použití a způsob přípravy

Vynález se týká derivátů 5-imino-13-deoxyanthracyklinu, léčebného využití 5-imino-13-deoxyanthracyklinu a způsobů přípravy derivátů 5-imino-13-deoxyanthracyklinu.

Dosavadní stav techniky

Nejznámější anthracyklinová léčiva proti rakovině jsou doxorubicin a daunorubicin, které obsahují 13-keto a 5-keto skupinu. Doxorubicin, publikovaný v patentu US 3 590 028 má široké spektrum použitelnosti jako protirakovinný prostředek a je používán při léčbě leukémií, lymfomů a solidních nádorů. Daunorubicin, publikovaný v patentu US 3 616 242 je účinný při léčbě akutních leukémií. Nicméně použitelnost těchto léčiv je omezena závažnými vedlejšími účinky, tj. kardiotoxicitou, tak, že celkové množství léčiva, které může být podáno pacientovi, nesmí přesáhnout 550 mg/m² (E. A. Lefrak *et al.*, Cancer, 32:302, 1973). I při doporučené maximální celkové kumulativní dávce nebo v její blízkosti (430 až 650 mg/m²) se u 60 % pacientů vyskytují závažné a přetrvávající srdeční dysfunkce a u 14 % pacientů se vyskytuje městnavé srdeční selhání (A. Dresdale *et al.*, Cancer, 52:51, 1983). I když jsou tedy tato léčiva účinná k inhibování růstu rakovinných nádorů, mohou pacienti v důsledku vedlejších kardiotoxických účinků léčiv zemřít na městnavé srdeční selhání.

Někteří výzkumní pracovníci se domnívají, že kardiotoxicita je výsledkem tvoření volných radikálů chinonovou částí molekuly anthracyklinu (J. Dorowshow *et al.*, J. Clin. Invest., 68:1053, 1981; D. V. Uverferth *et al.*, Cancer Treat. Rev., 9:149, 1982; J. Goodman *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 77:797, 1977; J. L. Tweier, J. Biol. Chem., 259:6056, 1984). Naproti tomu existuje dobrý důkaz o tom, že tvoření volných radikálů nemůže být jediným mechanismem způsobujícím kardiotoxicitu, protože léčiva i za přítomnosti akceptoru volných radikálů stále poškozují srdce (J. F. Van Vleet *et al.*, Am. J. Pathol., 99:13, 1980; D. V. Unverferth *et al.*, Am. J. Cardiol., 56:157, 1985; C. Myers *et al.*, Seminars in Oncology, 10:53, 1983; R. H. M. Julicher *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 38:277, 1986; E. A. Porta *et al.*, Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., 41:125, 1983).

Bylo také zjištěno, že inhibice tvoření volných radikálů neodstraní kardiotoxicitu těchto anthracyklinů (P. S. Mushlin *et al.*, Fed. Proc., 45:809, 1986). Místo toho tento výzkum ukazuje, že kardiotoxicita doxorubicinu a daunorubicinu, projevující se redukcí kontraktility myokardu, je také závislá na metabolické redukci 13-keto části na 13-dihydro metabolit. V testovacích systémech, kde doxorubicin není výrazně metabolizován na 13-dihydro metabolit, byly zjištěny kardiotoxické účinky pouze při vysokých koncentracích (200 – 400 mikrogramů/ml) (P. S. Mushlin *et al.*, Fed. Proc., 44:1274, 1985; R. D. Olson *et al.*, Fed. Proc., 45:809, 1986). Na rozdíl od 13-dihydro metabolitů mají doxorubicinol a daunorubicinol kardiotoxické účinky ve stejných testovacích systémech při relativně nízkých koncentracích (1 – 2 mikrogramů/ml, R. D. Olson *et al.*, Proceed. Am. Assoc. Cancer Res., 26:227, 1985; R. D. Olson *et al.*, Proceed. Am. Assoc. Cancer Res., 28:441, 1987).

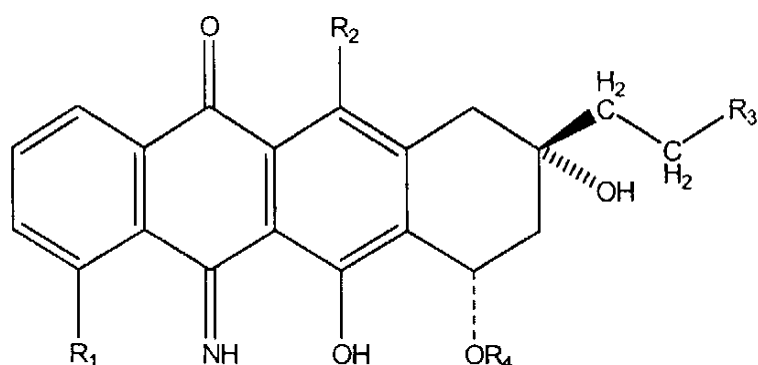
Je-li doxorubicinu umožněno setrvávat v testovacích systémech i jen po krátkou dobu, dojde k určité metabolické konverzi a 13-dihydro metabolit vzniká v dostatečném množství k tomu, aby se projevila kardiotoxicita (L. Rossini *et al.*, Arch. Toxicol. suppl., 9:474, 1986; M. Del Tocca *et al.*, Pharmacol. Res. Commun., 17:1073, 1985). Tak byly nahromaděny podstatné důkazy o tom, že kardiotoxicita léčiv jako např. doxorubicinu a daunorubicinu vzniká za silných kardiotoxických účinků vyvolávaných jejich 13-dihydro metabolity (P. Mushlin *et al.*, Rational Drug Therapy, 22:1, 1988; S. Kuyper *et al.*, FASEP Journal, 2:A1133, 1988; R. Boucek *et al.*, J. Biol. Chem., 261:15851, 1987; a R. Olson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:3585, 1988).

Předložený vynález využívá skutečnost, že 13-deoxy formy doxorubicinu, daunorubicinu nebo jiných podobných anthracyklinů nebudou metabolicky přeměněny na kardiotoxické 13-dihydro formy, a že 5-keto skupina je modifikována na formu, která bude méně ochotně vytvářet radikály, čímž poskytuje možnost aplikování sloučenin předloženého vynálezu v nekardiotoxických množstvích bez omezení celkové kumulativní dávky.

Podstata vynálezu

Předložený vynález je zaměřen na poskytnutí nových derivátů 5-imino-13-deoxyanthracyklinu, které mají méně vedlejších účinků.

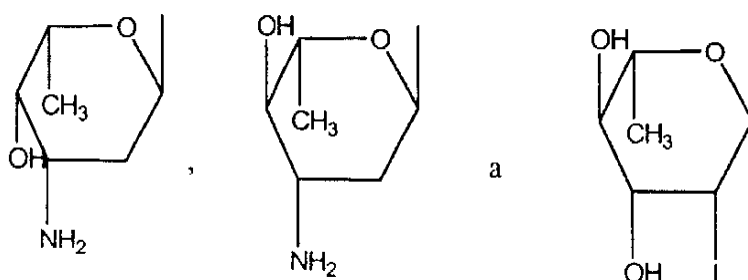
Předmětem vynálezu jsou deriváty 5-imino-13-deoxyanthracyklinu vzorce



kde:

R_1 , R_2 a R_3 každé nezávisle znamená substituent vybraný ze skupiny sestávající z H, OH a OCH_3

R_4 je cukerná část vybraná ze skupiny sestávající z



Obecně jsou tyto anthracykliny snadno konvertovány známými způsoby na 13-tosylhydrazony.

13-Tosylhydrazony anthracyklinu se redukuje na deriváty 13-deoxyanthracyklinu kyanohydroboritanem sodným za kyselých podmínek. Produkty se pak čistí preparativní chromatografií bez extrakce. Purifikované deriváty 13-deoxyanthracyklinu se konvertují na N-Boc deriváty, a pak nechají reagovat s NH_3 k vytvoření N-Boc-5-imino-13-deoxyanthracyklinů. Odstraněním N-Boc za kyselých podmínek vzniknou deriváty 5-imino-13-deoxyanthracyklinu. Bylo zjištěno, že postupy mají výtěžky od asi 50 do asi 60 %.

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy derivátů 5-imino-13-deoxyanthracyklinu podle kteréhokoli z nároků 1 až 7, který zahrnuje kroky:

(a) vytvoření kyselého roztoku 13-tosylhydrazonu anthracyklinu kyanohydroboritanem,

- (b) mírné refluxování roztoku,
 - (c) ochlazení reakční směsi,
 - (d) přidání vody a halogenuhlovodíku do reakční směsi,
 - (e) přidání bezvodého síranu sodného,
 - 5 (f) filtrování precipitátu,
 - (g) okyselení filtrátu,
 - (h) podrobení filtrátu preparativní chromatografii k izolaci 13-deoxyanthracyklinového derivátu,
 - 10 (i) podrobení HPLC-přečištěné frakce metodě HPLC s reverzními fázemi k odstranění anorganických solí,
 - (j) vytvoření bazického roztoku přečištěného 13-deoxyanthracyklinu s di-*terc*-butylkarbonátem,
 - (k) zreagování roztoku při teplotě místnosti,
 - (l) extrahování derivátů chráněných skupinou Boc,
 - 15 (m) vytvoření roztoku Boc-chráněných derivátů,
 - (n) zpracování roztoku amoniakem za teploty místnosti,
 - (o) odpaření rozpouštědla a amoniaku,
 - (p) zpracování zbytku kyselým roztokem,
 - (q) odpaření roztoku;
 - 20 (r) podrobení roztoku preparativní HPLC k izolaci 5-imino-13-deoxyanthracyklinů,
 - (s) podrobení HPLC-přečištěné frakce metodě HPLC s reverzními fázemi k odstranění anorganických solí a
 - (t) eluování a izolování 5-imino-13-deoxyanthracyklinových derivátů.
- 25 Výhodně postup zahrnuje formování kyselého roztoku 13-tosylhydrazonu anthracyklinu pomocí kyanohydroboritanu. Roztok se jemně refluxuje. Reakční směs se zchladí. Do roztoku se přidá malé množství vody, a poté halogenované uhlovodíkové rozpouštědlo. Směs se filtruje. Filtrát se podrobí preparativní chromatografii k izolování derivátů 13-deoxyanthracyklinu. Na purifikované deriváty se zavede chránicí skupina *terc*-butoxykarbonylu k vytvoření 3'-N-Boc derivátů,
- 30 které se pak nechají reagovat s amoniakem k vytvoření 3'-N-Boc-5-imino-13-deoxyanthracyklinů. Sejmutím skupiny chránicí amino skupinu za kyselých podmínek vzniknou 5-imino-13-deoxyanthracykliny, které se pak čistí chromatografií.
- Další výhodné aspekty předloženého vynálezu poskytují způsob přípravy derivátů 5-imino-13-deoxyanthracyklinu. Postup zahrnuje formování roztoku rozpuštění asi 1 g 13-tosylhydrazonhydrochloridu doxorubicinu a asi 2,4 g kyseliny *p*-toluensulfonové kyseliny v asi 50 ml bezvodého methanolu. Do roztoku se přidá asi 0,8 g kyanohydroboritanu sodného.
- 40 Roztok se zahřívá při teplotě od asi 68 do asi 72 °C, pak se jemně refluxuje po dobu asi jedné hodiny pod atmosférou dusíku.
- Reakční směs se koncentruje na asi 20 ml, pak ochladí v mrazicím boxu na teplotu od asi do asi 4 °C.
- 45 Do reakční směsi se přidá asi 0,5 ml vody, asi 200 ml chloroformu a bezvodý síran sodný. Vzniklé soli se odfiltrují.
- Filtrát se nechá projet sloupcem silikagelu. Sloupec se dále promývá chloroform/methanolem dokud není eluát bezbarvý.
- 50

Frakce obsahující produkt se eluuje methanolem. Methanolový eluát se odpařuje a výsledný zbytek se rozpustí ve 30% acetonitrilu v pufru mravenčanu amonného.

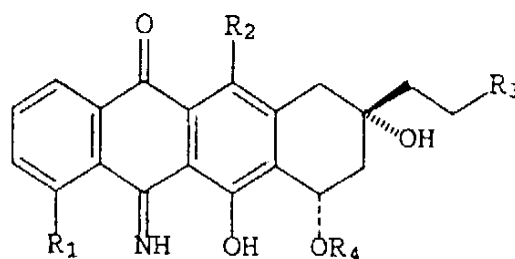
Produkt se izoluje preparativní HPLC s použitím fenylového sloupce a separuje od dalších nečistot pomocí gradientu acetonitril/mravenčanu amonného. Frakce purifikované HPLC se pak zředí přibližně stejným objemem vody jako nashromážděné frakce a tento roztok se nechá projít preparativní HPLC s použitím fenylového sloupce. Produkt se eluuje methanolem. Methanolový eluát se koncentruje a stejný produkt se precipituje přidáním ethyletheru. Tuhý produkt se izoluje filtrací k získání asi 600 mg 13-deoxydoxorubicinu.

Asi 600 mg purifikovaného 13-deoxydoxorubicinu se rozpustí v asi 60 ml methylenchloridu a asi 10 ml vody a nechá reagovat s asi 180 mg hydrouhličitanu draselného a asi 180 mg di-*tert*-butyldikarbonátu při pokojové teplotě po dobu asi 2 hodin. Organický roztok se separuje, promyje vodou a suší bezvodým síranem sodným. Roztok se odpařuje do sucha. Zbytek se rozpustí v asi 100 ml bezvodého methanolu. Roztok se udržuje nasyceným pomocí amoniaku při teplotě od 0 do asi 4 °C po dobu 48 hodin. Rozpouštědlo a amoniak se odstraní ve vakuu k získání 3'-N-Boc-5-imino-13-deoxydoxorubicinu. Výše obdržený 3'-N-Boc-5-imino-13-deoxydoxorubicin se nechá reagovat s asi 60 ml bezvodého methanolu obsahujícího asi 0,1 M chlorovodíku při pokojové teplotě po dobu asi 2 hodin k odstranění 3'-N-Boc skupiny. Výsledný roztok se koncentruje na asi 5 ml.

Koncentrovaný roztok se izoluje preparativní HPLC s použitím fenylového sloupce. Produkt se separuje od dalších nečistot použitím gradientu acetonitril/mravenčanu amonného. Frakce purifikované HPLC se zředí přibližně stejným objemem vody, vstříknou na fenylový sloupec preparativní HPLC a proplachují vodou k odstranění solí. Produkt se pak eluuje methanolem.

Methanolový eluát se okyselí asi 0,5 ml chlorovodíku v ethyletheru. Roztok se pak koncentruje na asi 5 ml. K precipitování produktu se přidá 10 ml ethyletheru. Precipitát se filtruje k získání asi 360 mg 5-imino-13-deoxydoxorubicinhydrochloridu.

Předložený vynález také poskytuje sloučeniny mající následující vzorec:



kde substituenty R_1 , R_2 a R_3 jsou H, OH nebo OMe a substituent R_4 je cukerná část jiná než morfolinylem substituovaná cukerná část. Samozřejmě, že morfolinyl zahrnuje i substituované morfolinylové části. Sloučeniny, které obsahují morfolinylem substituované cukerné části vykazují významně zvýšenou toxicitu.

Dále předložený vynález poskytuje farmaceutický přípravek obsahující alespoň jeden derivát 5-imino-13-deoxyanthracyklinu.

Dále ještě předložený vynález poskytuje způsob léčby rakoviny, včetně leukemií, lymfomů a pevných nádorů, zahrnující krok aplikování účinného množství alespoň jednoho derivátu 5-imino-13-deoxyanthracyklinu.

Z následujícího popisu budou odborné veřejnosti patrné ještě další předměty a zvýhodnění předloženého vynálezu. Podrobný popis vynálezu ukazuje a popisuje pouze výhodná provedení

vynálezu tak, aby ilustroval nejlepší zamýšlený způsob pro provedení vynálezu. Odborné veřejnosti je zřejmé, že vynález zahrnuje další a různá provedení. Detaily vynálezu mohou být modifikovány z různých hledisek bez odchýlení se od vynálezu. Obdobně na výkresy a na popis je třeba pohlížet jako na ilustraci podstaty vynálezu a nikoliv jako omezení.

5

Podrobný popis vynálezu

10 Předložený vynález poskytuje deriváty 5-imino-13-deoxyanthracyklinu, jejich použití a způsob přípravy derivátů 5-imino-13-deoxyanthracyklinu. Obr. 3 uvádí příklady derivátů 5-imino-13-deoxyanthracyklinu, které mohou být syntetizovány podle předloženého vynálezu. Jak již bylo uvedeno výše, je známo, že sloučeniny jako např. na obr. 3 mají protinádorové vlastnosti a také méně vedlejších účinků.

15 Postupy podle předloženého vynálezu mohou být prováděny při teplotě od asi 0 do asi 75 °C. Výhodně jsou postupy prováděny při teplotě od asi 65 do asi 75 °C. Výhodněji se mohou postupy provádět při teplotě od asi 68 do asi 72 °C. Teploty přesahující asi 72 °C vedou obvykle k rozložení reaktantů a produktů.

20 Postup podle předloženého vynálezu zahrnuje množství obecných podmínek. Například redukční reakce se výhodně provádí za kyselých podmínek. Jinými slovy hodnota pH by měla být asi 7,0 nebo menší. Bylo zjištěno, že známé postupy přípravy výše uvedených sloučenin, které používají bazické podmínky v rámci reakční směsi, způsobují rozklad reaktantů a produktů.

25 Navíc by měl být z redukční reakce vyloučen jak kyslík, tak i voda. Výhodně se reakce provádí v atmosféře dusíku nebo inertního plynu s použitím bezvodých rozpouštědel.

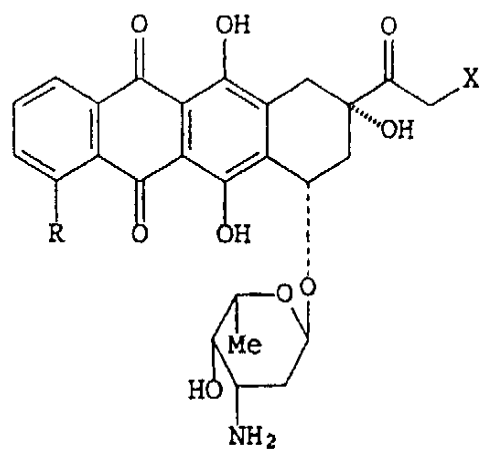
Dále by se aminace měla provádět při teplotě 0 – 4 °C. Vyšší teploty by mohly způsobit rozklad reaktantů a produktů.

30

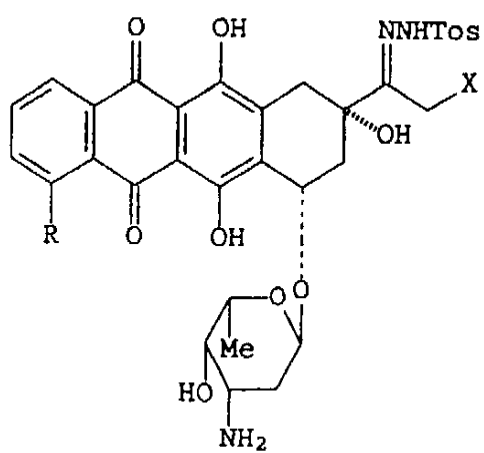
Dále by se z aminace měla vyloučit voda. Výhodně se reakce provádí v bezvodých rozpouštědlech.

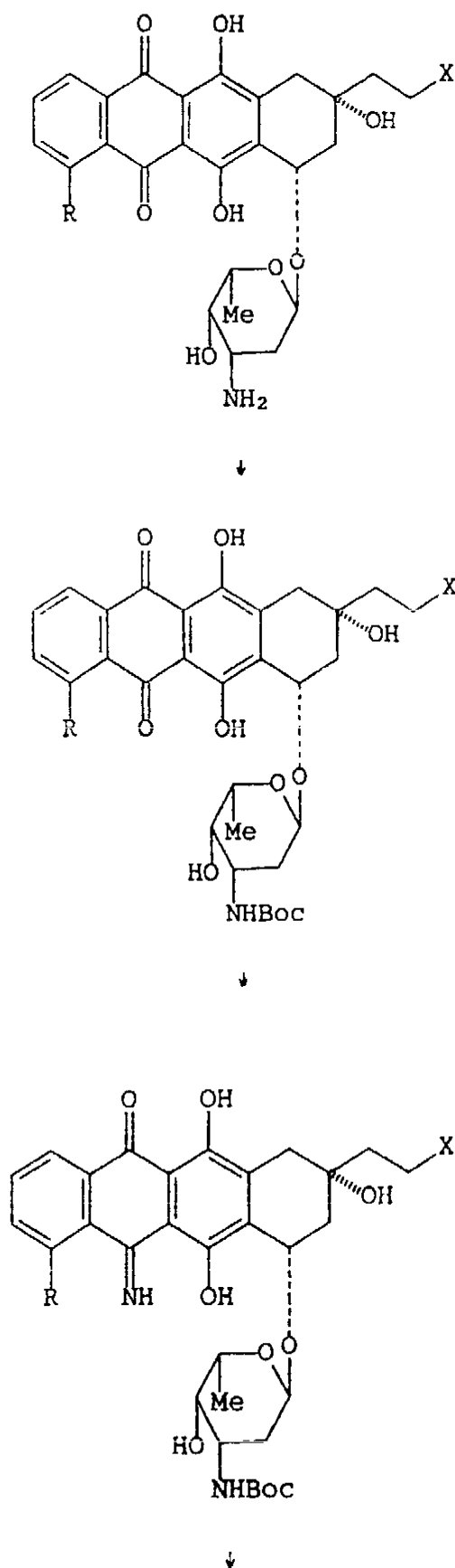
35 Dále by se také z hydrolýzy měla vyloučit voda. Výhodně se reakce provádí v bezvodých rozpouštědlech.

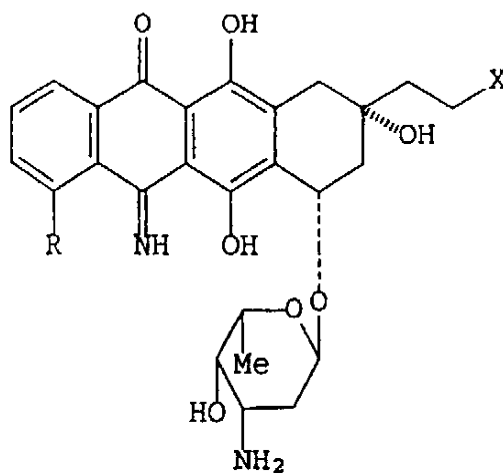
Následující popis poskytuje příklad transformace molekuly a její vývoj během postupu.



I

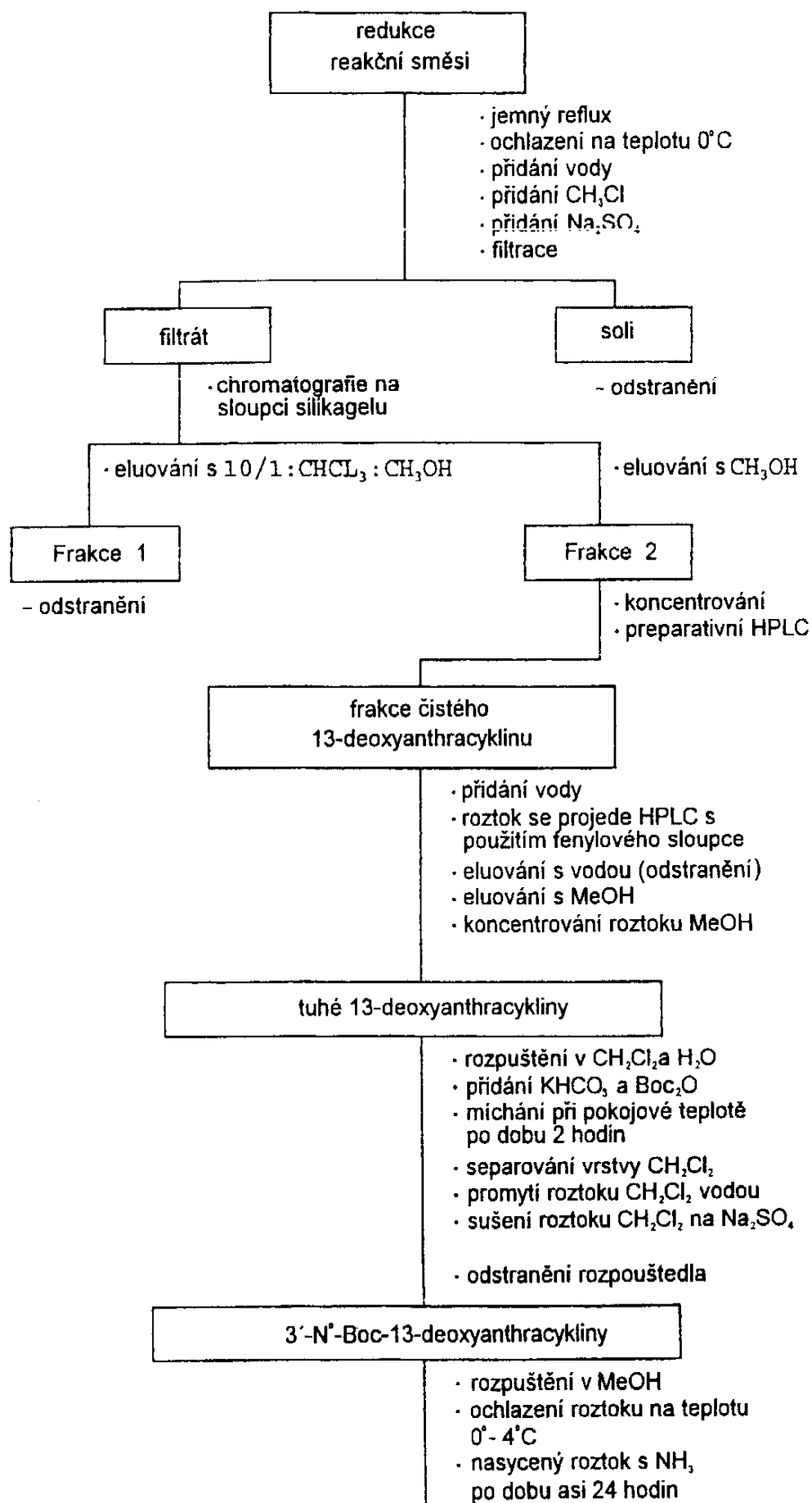


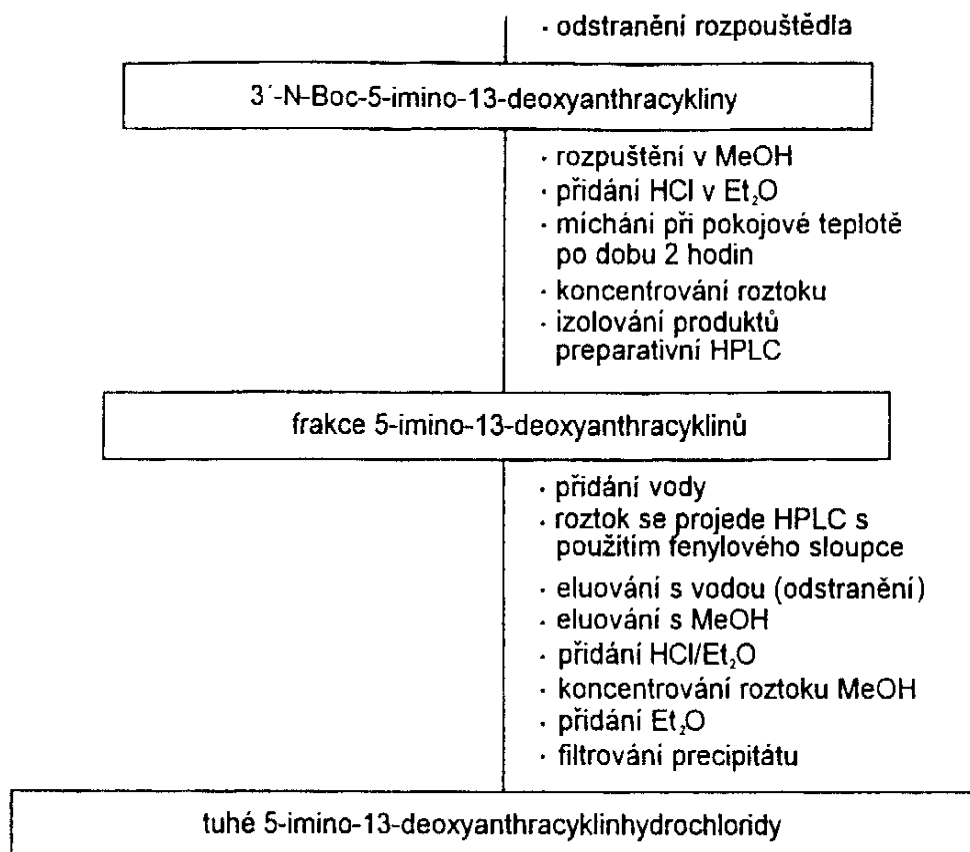




- 5
- | | R | X |
|----|-----|----|
| a. | OMe | OH |
| b. | OMe | H |
| c. | H | H |

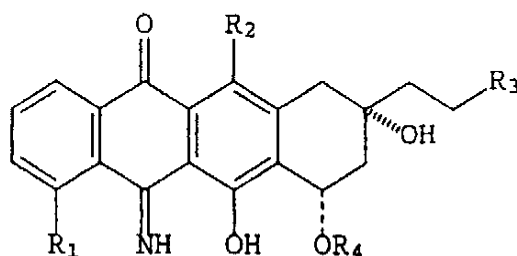
10 Následující blokové schéma ilustruje příklad provedení způsobu podle předloženého vynálezu pro přípravu 5-imino-13-deoxydoxorubicinu, což je derivát 13-deoxyanthracyklinu.



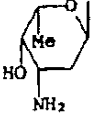
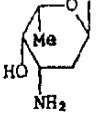
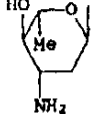
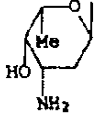
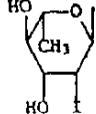


Následující popis znázorňuje příklady derivátů anthracyklinu jejichž syntéza je zde popsána.

5



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Analog
OMe	OH	OH		doxorubicinu

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Analog
OMe	OH	H		daunorubicinu
OH	OH	H		kaminomycinu
OMe	OH	OH		epirubicinu
H	OH	H		idarubicinu
H	OH	OH		annamycinu

5 Ve sloučeninách může být substituent R₄ modifikovanou verzí různých analog anthracyklinu. Také kruh D může být substituován halogenem nebo hydroxylovou skupinou. Například kruh D by mohl být substituován fluorem, jodem nebo jakýmkoliv jiným halogenem.

10 Obecně postup podle předloženého vynálezu zahrnuje formování kyselého roztoku 5-imino-13-deoxyanthracyklinu. Roztok se jemně refluxuje. Pak se může reakční směs ochladit. Podle jednoho příkladu se reakční směs ochladí na teplotu od asi 0 do asi 4 °C. Pak se může přidat malé množství vody k hydrolyzování produktu. Halogenované uhlovodíkové rozpouštědlo může být studené a může se přidat do reakční směsi. Například může být halogenované uhlovodíkové rozpouštědlo při teplotě od asi 0 do asi 4 °C. Příklad halogenovaného uhlovodíkového rozpouštědla, které může být používáno je chloroform. Po přidání bezvodého síranu sodného se pak reakční
15 směs filtruje. Filtrace se může také provádět za snížené teploty. Například filtrace se může provádět za teploty od asi 4 do asi 15 °C.

Výše uvedené přidání vody spíše iniciuje hydrolyzu. Prebytek vody může být odstraněn přidáním bezvodého síranu sodného. Výhodně se pak anorganické soli odfiltrují z reakční směsi. Filtrát se pak podrobí chromatografii na sloupci silikagelu. Hydrofóbní nečistoty se pak izolují eluováním méně polárními rozpouštědly. Produkty 13-deoxyanthracyklinu se pak mohou eluovat a eluát
20 dále čistit.

Purifikované deriváty 13-deoxyanthracyklinu mohou být rozpuštěny v roztoku methylenchloridu a vody obsahujícím bázi a di-terc-butyldikarbonát. Roztok se může míchat při asi pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Organický roztok se může izolovat a promýt vodou, poté se odstraní rozpouštědlo a zbytek se rozpustí v alkoholovém rozpouštědle. Alkoholový roztok se může sytit amoniakem při teplotě asi 0 °C do asi 4 °C po dobu 24 hodin. Rozpouštědlo se odstraní a suchý zbytek se nechá reagovat s kyselým alkoholovým rozpouštědlem při pokojové teplotě po dobu asi 2 hodin. Výsledný roztok se koncentruje a podrobí dalšímu čištění, pak okyseli a precipituje v etheru k získání hydrochloridové soli 5-imino-13-deoxyanthracyklinu.

Výhodně zahrnuje postup podle předloženého vynálezu formování roztoku 13-tosylhydrazonů anthracyklinu v bezvodém methanolu s p-toluensulfonovou kyselinou a kyanoborohydridem sodným. Roztok se jemně refluxuje pod atmosférou dusíku a pak zchladí. Přidá se voda a poté chloroform. Precipitované soli se filtrují a filtrát se izoluje na sloupci silikagelu. Hydrofóbní nečistoty vzniklé z rozkladu se eluují roztokem chloroformu a methanolu. Produkty, 13-deoxyanthracykliny, se eluují methanolem. Methanolvý eluát se dále čistí preparativní HPLC.

Purifikované 13-deoxyanthracykliny se rozpustí ve směsi methylenchloridu a vody a nechají reagovat s hydrouhličitanem draselným a di-terc-butyldikarbonátem. Roztok se míchá při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Organická vrstva se izoluje, promyje vodou a suší na bezvodém síranu sodném. Rozpouštědlo se pak odstraní ve vakuu. Zbytek se rozpustí v bezvodém methanolu a udržuje nasyceným pomocí amoniaku při teplotě od asi 0 do 4 °C po dobu 48 hodin. Methanol a amoniak se odstraní z reakčního produktu, který se pak nechá reagovat se zředěnou kyselinou v alkoholu při asi pokojové teplotě po dobu 2 hodin k získání 5-imino-13-deoxyanthracyklinu. Tato sloučenina, v roztoku, se koncentruje, a poté čistí preparativní HPLC k odstranění nečistot a solí. Produkt se eluuje methanolem, okyseli a precipituje k získání hydrochloridové soli 5-imino-13-deoxyanthracyklinu.

Následující popis poskytuje příklad postupu podle předloženého vynálezu.

30

Příklad provedení vynálezu

Příprava 5-imino-13-deoxydoxorubicinhydrochloridu

35 Asi 1 g 13-tosylhydrazonhydrochloridu doxorubicinu a asi 2,4 g p-toluensulfonové kyseliny se rozpustí v asi 50 ml bezvodého methanolu. Do tohoto roztoku se přidá asi 0,8 g kyanohydroboritanu sodného. Výsledný roztok se zahřívá při teplotě 68 až 72 °C a udržuje při jemném refluxu po dobu 1 hodiny pod atmosférou dusíku.

40 Pak se reakční směs koncentruje na asi 20 ml a ochladí v mrazicím boxu na teplotu asi 0 až 4 °C. Přidá se 0,5 ml vody a 200 ml chloroformu. Poté se přidá bezvodý síran sodný a po protřepání se soli filtrují.

45 Roztok se nechá projet sloupцем silikagelu (2,5 x 5 cm). Sloupec se dále promývá chloroform/methanolem (10/1) dokud není eluát bezbarvý. Vázané frakce obsahující produkt se eluují methanolem. Methanolvý eluát se odpařuje a zbytek se rozpustí v 30% acetonitrilu v pufru mravenčanu amonného (pH = 4,0; 0,5%) a izoluje preparativní HPLC. Použije se fenylový sloupec a použitím gradientu acetonitril/mravenčanu amonného (od 27% do 30% acetonitrilu po dobu 30 minut) se dosáhne separace produktu od dalších nečistot.

50

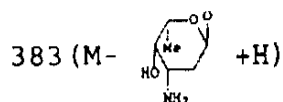
Frakce purifikované HPLC se zředí přibližně stejným objemem vody. Roztok se projede preparativní HPLC s použitím fenylového sloupce. Sloupec se eluuje vodou k odstranění solí. Poté se produkt eluuje methanolem. Produkt se koncentruje a přidáním ethyletheru, který obsahuje chlorovodík, precipituje a po spojení filtrací poskytne 600 mg 13-deoxydoxorubicinhydrochloridu. Výtěžek činí 80%.

55

TLC: $R_f = 0,38$ CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O
 30 10 1

U.V.: $\lambda_{\text{max}} = 233, 252, 293, 485 \text{ nm}$

5 MS: 530 (M+H),



^1H NMR (methanol d_4): (viz níže)

10 δ . 1,30 (d, 3H, 6'- CH_3),
 1,85 (m, 2H, 13- H_2),
 2,05 (m, 2H, 10- H_2),
 2,60 (d, 1H, 12-H),
 3,05 (d, 1H, 12-H),
 15 3,55 (m, 1H, 5'-H),
 3,90 (m, 2H, 14- H_2),
 4,05 (s, 3H, O- CH_3),
 4,25 (m, 1H, 4'-H),
 4,95 (m, 1H, 3'-H),
 20 5,40 (m, 1H, 1'-H),
 7,55 (d, 1H, 3-H),
 7,85 (d, 1H, 2-H), a
 7,95 (d, H, 1-H).

25 Přibližně 600 mg čistěného 13-deoxydoxorubicinu se rozpustí v asi 60 ml methylenchloridu a asi 10 ml vody a nechá reagovat s přibližně 180 mg hydrouhličitanu draselného a přibližně 180 mg di-*tert*-butyldikarbonátu při asi pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Organický roztok se separuje, promyje vodou a suší na bezvodém síranu sodném. Roztok se odpařuje do sucha a zbytek se rozpustí v asi 100 ml bezvodého methanolu. Roztok se udržuje nasyceným pomocí amoniaku při
 30 teplotě od asi 0 do asi 4 °C po dobu 48 hodin. Rozpouštědlo a amoniak se odstraní ve vakuu k získání 3'-N-Boc-5-imino-13-deoxydoxorubicinu, který se nechá reagovat s přibližně 60 ml bezvodého methanolu obsahujícího asi 0,1 M chlorovodíku při asi pokojové teplotě po dobu 2 hodin k odstranění 3'-N-Boc skupiny. Výsledný roztok se koncentruje a produkt izoluje preparativní HPLC. Frakce purifikované HPLC se zředí stejným objemem vody. Roztok se přidá na
 35 fenylový sloupec preparativní HPLC a eluuje vodou k odstranění solí. Produkt se eluuje methanolem. Methanolvý eluát se okyseli chlorovodíkem v ethyletheru a roztok se koncentruje. Přidá se ethylether a výsledný precipitát se filtruje k získání přibližně 360 mg 5-imino-13-deoxydoxorubicinhydrochloridu.

40 TLC: $R_f = 0,35$

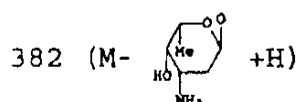
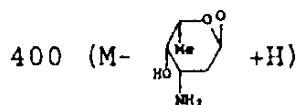
U.V.: $\lambda_{\text{max}} = 222, 251, 310, 544, 585 \text{ nm}$

^1H NMR (MeOH- d_4)

45 δ 1,30 (d, 3H, 6'- CH_3)
 1,85 (m, 2H, 13- H_2)
 2,10 (m, 2H, 10- H_2)
 2,60 (d, 1H, 12-H)
 2,75 (d, 1H, 12-H)

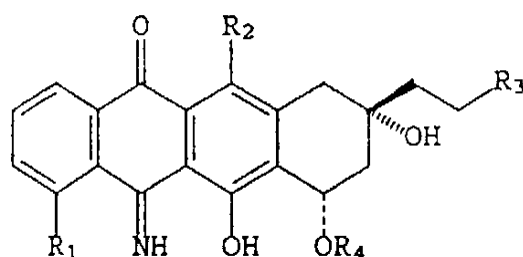
- 2,95 (d, 1H, 12-H)
 3,50 (m, 1H, 5'-H)
 3,90 (m, 2H, 14-H₂)
 4,15 (s, 3H, O-CH₃)
 5 4,25 (m, 1H, 4'-H)
 5,10 (m, 1H, 3'-H)
 5,60 (m, 1H, 1'-H)
 7,50 (d, 1H, 3-H)
 7,80 (d, 1H, 2-H)
 10 8,05 (d, 1H, 1-H)

MS: 529 (M+H)



Předložený vynález také poskytuje sloučeniny mající následující vzorec:

15



Dále předložený vynález poskytuje farmaceutický přípravek obsahující alespoň jeden derivát 5-imino-13-deoxyanthracyklinu.

20

Dále předložený vynález poskytuje způsob ošetření rakoviny, včetně leukemií, lymfomů, a pevných nádorů. Způsob zahrnuje krok, při kterém se aplikuje účinné množství alespoň jednoho derivátu 5-imino-13-deoxyanthracyklinu. Dávky mohou být podobné jako u známých sloučenin. Díky jejich podobnostem se známými sloučeninami bude odborná veřejnost schopna určit reakční podmínky s podobnou účinností bez nepřiměřeného experimentování. Nicméně, jak je uvedeno výše, umožňuje předložený vynález podstatně snížit vedlejší účinky včetně snížení kardiotoxicity.

25

Předložený vynález také poskytuje způsob ošetření autoimunních chorob nebo poruch deficitu imunity jako např. AIDS. Způsob zahrnuje krok, při kterém se aplikuje účinné množství alespoň jednoho derivátu 5-imino-13-deoxyanthracyklinu.

30

Předchozí popis vynálezu ilustruje a popisuje předložený vynález. Navíc údaje ukazují a popisují pouze výhodná provedení vynálezu, ale jak je výše uvedeno, je jasné, že předložený vynález je použitelný v různých dalších kombinacích, modifikacích a prostředích a je ho možné změnit nebo modifikovat v rámci rozsahu vynálezu, jak je zde uvedeno, odpovídající výše uvedeným popisům a/nebo schopnosti nebo znalosti příslušné techniky. Výše popsání provedení jsou dále určena k vysvětlení nejlepších způsobů podle předloženého vynálezu a k umožnění dalším odborně kvalifikovaným pracovníkům využívat vynález v těchto nebo jiných provedení a s různými modifi-

35

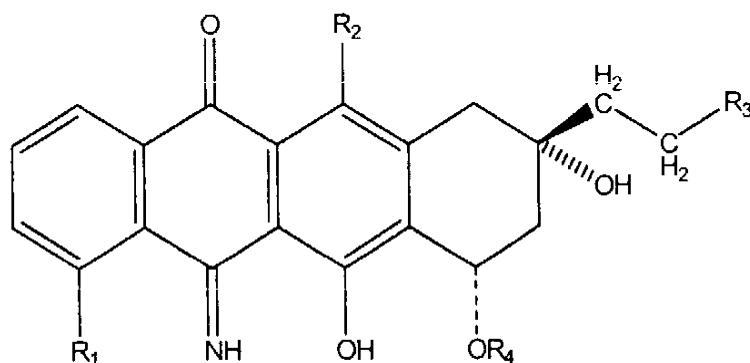
kacemi požadovanými pro jednotlivé aplikace nebo využití vynálezu. Proto popis není zaměřen na omezení vynálezu podle zde popsané formy a přiložené patentové nároky jsou interpretovány tak, aby zahrnovaly alternativní provedení.

5

PATENTOVÉ NÁROKY

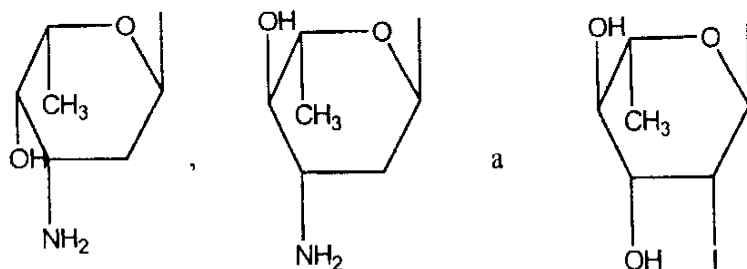
10

1. Deriváty 5-imino-13-deoxyanthracyklinu vzorce



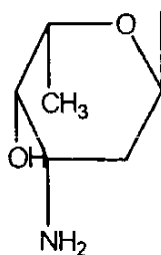
15 kde:

R_1 , R_2 a R_3 každé nezávisle znamená substituent vybraný ze skupiny sestávající z H, OH a OCH_3 ,
a

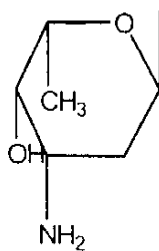
20 R_4 je cukerná část vybraná ze skupiny sestávající z

25

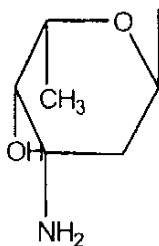
2. Sloučenina podle nároku 1, kde R_1 je OCH_3 , R_2 a R_3 je každé OH a R_4 je



3. Sloučenina podle nároku 1, kde R_1 je OCH_3 , R_2 je OH, R_3 je H a R_4 je

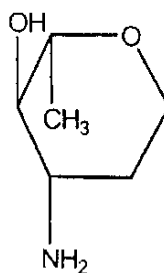


4. Sloučenina podle nároku 1, kde R_1 a R_2 je každé OH, R_3 je H a R_4 je



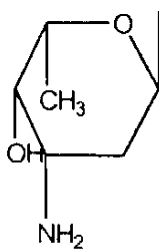
5

5. Sloučenina podle nároku 1, kde R_1 je OCH_3 , R_2 je OH, R_3 je OR a R_4 je



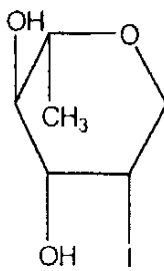
10

6. Sloučenina podle nároku 1, kde R_1 a R_3 je každé H, R_2 je OH a R_4 je



15

7. Sloučenina podle nároku 1, kde R_1 je H, R_2 a R_3 je každé OH a R_4 je



20

8. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň jednu sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 7.

9. Použití alespoň jedné sloučeniny podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 pro výrobu léčiva k léčení rakoviny, autoimunitních chorob nebo poruch deficitu imunity.

10. Způsob přípravy derivátů 5-imino-13-deoxyanthracyklinu podle kteréhokoli z nároků 1 až 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje kroky:

- (a) vytvoření kyselého roztoku 13-tosylhydrazonu anthracyklinu kyanohydroboritanem,
- (b) mírné refluxování roztoku,
- (c) ochlazení reakční směsi,
- (d) přidání vody a halogenuhlovodíku do reakční směsi,
- (e) přidání bezvodého síranu sodného,
- (f) filtrování precipitátu,
- (g) okyselení filtrátu,
- (h) podrobení filtrátu preparativní chromatografií k izolaci 13-deoxyanthracyklinového derivátu,
- (i) podrobení HPLC-přečištěné frakce metodě HPLC s reverzními fázemi k odstranění anorganických solí,
- (j) vytvoření bazického roztoku přečištěného 13-deoxyanthracyklinu s di-*tert*-butylkarbonátem,
- (k) zreagování roztoku při teplotě místnosti,
- (l) extrahování derivátů chráněných skupinou Boc,
- (m) vytvoření roztoku Boc-chráněných derivátů,
- (n) zpracování roztoku amoniakem za teploty místnosti,
- (o) odpaření rozpouštědla a amoniaku,
- (p) zpracování zbytku kyselým roztokem,
- (q) odpaření roztoku,
- (r) podrobení roztoku preparativní HPLC k izolaci 5-imino-13-deoxyanthracyklinů,
- (s) podrobení HPLC-přečištěné frakce metodě HPLC s reverzními fázemi k odstranění anorganických solí a
- (t) eluování a izolování 5-imino-13-deoxyanthracyklinových derivátů.

11. Způsob podle nároku 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že kyselým roztokem je redukční roztok 13-tosylhydrazonu anthracyklinu v bezvodém methanolu s *para*-toluensulfonovou kyselinou a kyanohydroboritanem sodným.

12. Způsob podle nároku 11, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že redukční roztok má pH nižší než 7,0.

13. Způsob podle nároku 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že krok refluxování se provádí při teplotě od 68 do 72 °C.

14. Způsob podle nároku 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že krok refluxování se provádí při teplotě od 65 do 75 °C.

15. Způsob podle nároku 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že krok refluxování se provádí při teplotě až 75 °C.

16. Způsob podle nároku 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že krok refluxování se provádí za nepřítomnosti kyslíku.

17. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že krok refluxování se provádí za nepřítomnosti vody.
18. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že krok refluxování se provádí pod atmosférou dusíku.
19. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že krok refluxování se provádí pod atmosférou inertního plynu.
20. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že krok animace se provádí při teplotě 0 až 4 °C.
21. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že krok animace se provádí za nepřítomnosti vody.
22. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že postup vede k výtěžku derivátu 5-imino-13-deoxyanthracyklinu mezi 40 a 50 %.
23. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje kroky:
- (a) vytvoření roztoku rozpuštěním 1 g 13-tosylhydrazonhydrochloridu doxorubicinu a 2,4 g *para*-toluensulfonové kyseliny v 50 ml bezvodého methanolu,
 - (b) přidání 0,8 g kyanohydroboritanu sodného do roztoku,
 - (c) zahřívání roztoku na teplotu od 68 do 72 °C,
 - (d) mírné refluxování roztoku po dobu jedné hodiny pod atmosférou dusíku,
 - (e) koncentrování reakční směsi na 20 ml,
 - (f) ochlazení reakční směsi v mrazicím boxu na teplotu od 0 do 4 °C,
 - (g) přidání 0,5 ml vody do reakční směsi,
 - (h) přidání 200 ml chloroformu do reakční směsi,
 - (i) přidání bezvodého siranu sodného do reakční směsi,
 - (j) filtrování solí z reakční směsi,
 - (k) projetí roztoku sloupцем silikagelu,
 - (l) další promytí sloupce chloroform/methanolem, dokud eluát není bezbarvý,
 - (m) eluování frakce obsahující produkt methanolem,
 - (n) odpařování methanolvého eluátu,
 - (o) rozpuštění zbytku vzniklého z odpařování v 30% acetonitrilu v pufru mravenčanu amonného,
 - (p) izolování produktu preparativní HPLC s použitím fenylového sloupce;
 - (q) separování produktu od dalších nečistot použitím gradientu acetonitril/mravenčanu amonný,
 - (r) zředění HPLC-přečištěné frakce vodou,
 - (s) projetí roztoku fenylovým sloupcem HPLC,
 - (t) eluování sloupce vodou,
 - (u) eluování produktu methanolem,
 - (v) koncentrování roztoku na 5 ml,
 - (w) precipitování produktu s 10 ml diethyletheru,
 - (x) filtrování precipitátu k získání 600 mg tuhých 13-deoxyanthracyklinů,
 - (y) vytvoření roztoku 600 mg 13-deoxyanthracyklinů v 60 ml methylenchloridu a 10 ml vody se 180 mg hydrogenuhličitanu draselného a 180 mg di-*terc*-butyldikarbonátu,
 - (z) reakce roztoku při teplotě místnosti po dobu 2 hodin,

- (aa) separování organického roztoku,
- (bb) promývání organického roztoku vodou,
- (cc) sušení roztoku bezvodým síranem sodným,
- (dd) odpařování rozpouštědla,
- 5 (ee) rozpuštění zbytku ve 100 ml bezvodého methanolu,
- (ff) udržování roztoku pod nasyceným amoniakem při teplotě 4 °C po dobu 48 hodin,
- (gg) odpařování roztoku,
- (hh) rozpuštění zbytku v 60 ml bezvodého methanolu obsahujícího 0,1 M chlorovodíku,
- (ii) reakce roztoku při teplotě místnosti po dobu 2 hodin,
- 10 (jj) koncentrování roztoku na 5 ml,
- (kk) izolování produktu preparativní HPLC s použitím fenylového sloupce,
- (ll) separování produktu od dalších nečistot použitím gradientu acetonitril/mravenčan amonný,
- (mm) zředění HPLC–přečištěné frakce vodou,
- (nn) projeti roztoku fenylovým sloupcem HPLC,
- 15 (oo) eluování mravenčanu amonného vodou,
- (pp) eluování produktu methanolem,
- (qq) koncentrování roztoku na 5 ml,
- (rr) konvertování produktu na hydrochloridovou sůl,
- (ss) precipitování produktu 10 ml diethyletheru a
- 20 (tt) filtrování precipitátu k získání 360 mg tuhého 5-imino-13-deoxyanthracyklinhydrochloridu.

25

Konec dokumentu
