



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

268 514

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.4

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

(21) PV 9740-84.V
(22) Přihlášeno 19 07 83

(40) Zveřejněno 12 07 89
(45) Vydáno 30 11 90

(72) Autor vynálezu

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

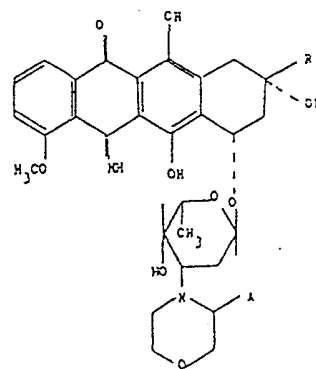
(73) Majitel patentu

SRI INTERNATIONAL, MENLO PARK,
CALIFORNIA (US)

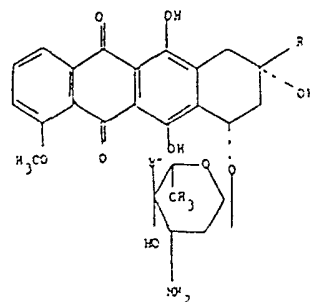
(54)

Způsob výroby nových morfolinových deri-
vátů daunorubicinu a doxorubicinu

(57) Řešení se týká způsobu výroby nových morfolinových derivátů daunorubicinu a doxorubicinu obecného vzorce I, kde R znamená skupinu $\text{CO}-\text{CH}_3$, $\text{COOH}-\text{CH}_3$, $\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ a $\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$, a A znamená skupinu CN nebo atom vodíku, přičemž se ve sloučenině obecného vzorce II, kde R má shora uvedený význam, nejprve v případě, že sloučenina obsahuje hydroxyskupinu v poloze 14 opatří se tato skupina ochrannou skupinou, odstranitelnou v mírně kyselém prostředí, například p-methoxytritylovou skupinou, načež se sloučenina uvede v reakci s přebytkem alkoholového roztoku amoniaku při teplotě -25 až $+25^\circ\text{C}$, načež se popřípadě odstraní uvedená ochranná skupina kyselinou octovou nebo kyselinou trifluoroctovou při teplotě místnosti a výsledná látka se izoluje a čistí.



(1)



(11)

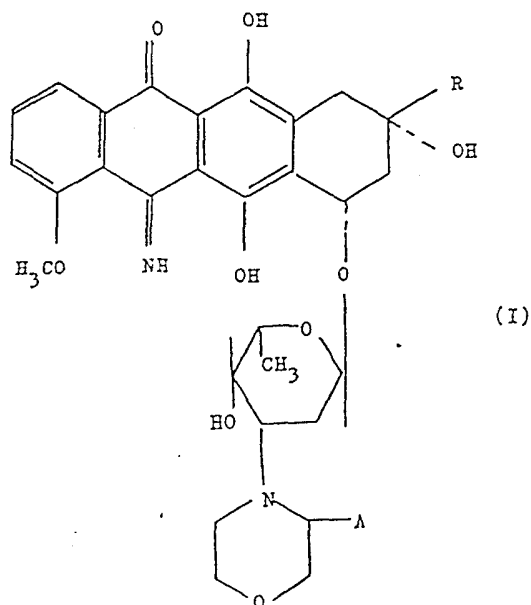
Vynález se týká způsobu výroby nových derivátů daunorubicinu a doxorubicinu. Tyto deriváty je možno použít jako protinádorové látky.

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

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

5-iminodaunorubicin byl popsán v US patentovém spisu č. 4 109 076 z 22. srpna 1978 (David W. Henry a George L. Tong). 5-iminodaunorubicin má stejnou účinnost při nižších vedlejších účincích, 5-iminodoxorubicin má dobrou účinnost, je však zapotřebí vyšších dávek.

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



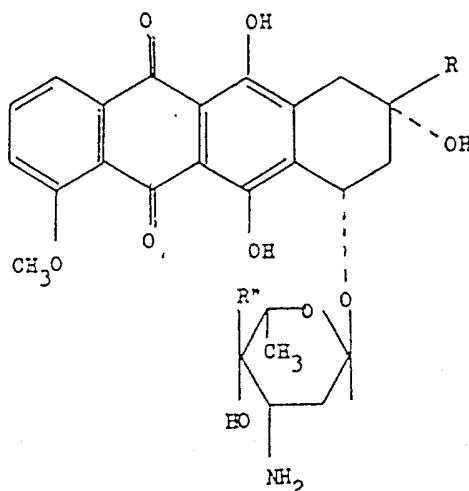
kde

R znamená skupinu CO-CH_3 nebo CHOH-CH_3 v případě derivátů daunorubicinu a $\text{CO-CH}_2\text{OH}$ nebo $\text{CHOH-CH}_2\text{OH}$ v případě derivátů doxorubicinu,

A znamená kyanoskupinu nebo atom vodíku.

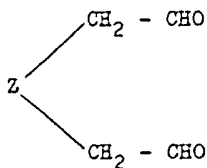
V případě, že A znamená atom vodíku, mohou tyto sloučeniny existovat také ve formě adičních solí s kyselinami. Tyto soli rovněž patří do oboru vynálezu.

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



kde

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



nebo s vhodným prekursorem této látky,

kde

Z znamená atom kyslíku,

reakce se provádí v přítomnosti kyanborohydridu, například kyanborohydridu alkalického kovu, výsledné látky se izolují a čistí známým způsobem. Na získané látky se pak působí přebytkem alkoholového roztoku amoniaku za vzniku sloučenin obecného vzorce I, které jsou účinné proti nádorům. Tyto látky zřejmě spojují obě výhody, a to vysokou protizánětlivou účinnost a možnost použití nízkých dávek. Z tohoto důvodu jsou také nižší vedlejší účinky, například kardiotoxicita ve srovnání se známými sloučeninami.

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu je možno zpracovat na farmaceutické

prostředky pro léčbu nádorů běžným způsobem:

Morfolinylové deriváty iminodaunorubicinu a iminodoxorubicinu a kyanmorfolinylové deriváty, iminodaunorubicinu a iminodoxorubicinu jsou uvedeny v následující tabulce I.

T a b u l k a I

A	R	název sloučeniny
H	CO-CH	3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-iminodaunorubicin a jeho soli, přijatelné z farmaceutického hlediska
H	CHOH-CH ₃	3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydro-5-iminodaunorubicin a jeho soli, přijatelné z farmaceutického hlediska
H	CO-CH ₂ OH	3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicin a jeho soli, přijatelné z farmaceutického hlediska
H	CHOH-CH ₂ OH	3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydro-5-iminodoxorubicin a jeho soli, přijatelné z farmaceutického hlediska
CN	CO-CH ₃	3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-5-iminodaunorubicin
CN	CHOH-CH ₃	3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-13-dihydro-5-iminodaunorubicin
CN	CO-CH ₂ OH	3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicin
CN	CHOH-CH ₂ OH	3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-13-dihydro-5-iminodoxorubicin

Jedna z těchto sloučenin je nejvýhodnější pro svou velmi dobrou účinnost proti nádorům. Jde o následující látku:

3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicin

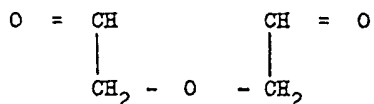
První čtyři sloučeniny, uvedené v tabulce I je možno použít ve formě volných látek nebo ve formě solí se zásadami, přijatelnými z farmaceutického hlediska. Adiční soli mají tu výhodu, že jsou rozpustné ve vodě a v rozpouštědlech s obsahem vody, například ve směsi vody a alkanolu, nebo ve směsi vody a alkandiolu. Příkladem těchto smíšených rozpouštědel může být směs vody a propylenglykolu, vody a ethanolu, vody a ethylenglykolu, vodného roztoku chloridu sodného a různých injekčních prostředí s obsahem vody a podobně. Volné látky jsou rozpustné v méně polárních organických rozpouštědlech, například chloroformu, methylenchloridu, směsi chloroformu a methanolu a podobně. Je také možno je užít ve formě suspenze.

Soli mohou být také adiční produkty volných látek s kyselinou, přijatelnou z farmaceutického hlediska. Pod tímto pojmem se rozumí kyselina, která není toxická a je možno ji běžně užít ve farmaceutických prostředcích. Příkladem těchto kyselin mohou být anorganické kyseliny, například kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová a fosforečná a organické kyseliny, například karboxylové kyseliny jako kyselina octová, glykolová, maleinová, jablečná, hydroxymaleinová, vinná, citronová a salicylová a také organosulfonové kyseliny, například kyselina methansulfonová a p-toluensulfonová. Je možno také užít směsi dvou nebo většího počtu kyselin a směsi jednoho nebo většího počtu volných látek nebo adičních solí. Většinou jsou nejvýhodnější hydrochloridy a hydrobromidy.

Způsob výroby některých výhodných sloučenin

Uvedené látky je možno získat následujícím obecným způsobem:

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



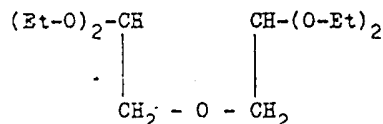
Touto alkyací se získá směsný produkt, který obsahuje čtyři hlavní složky. V případě použití daunorubicinu jsou těmito složkami následující čtyři sloučeniny:

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

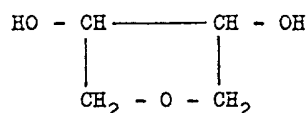
V případě doxorubicinu jsou těmito složkami následující čtyři sloučeniny:

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

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



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



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

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

Reakční směs je možno zpracovávat jakýmkoliv způsobem, který zajistí požadovanou izolaci a dobré oddělení reakčního produktu. Extrakce reakčního produktu kyselinou je účinná při extrakci materiálů, které neobsahují kyanoskupinu z materiálů, které nejsou v kyselině rozpustné a kyanoskupinu obsahující. Výsledné páry materiálů je možno

rozdělit na jednotlivé látky chromatograficky, například chromatografií na sloupci, chromatografií na tenké vrstvě nebo vysokotlakou kapalinovou chromatografií.

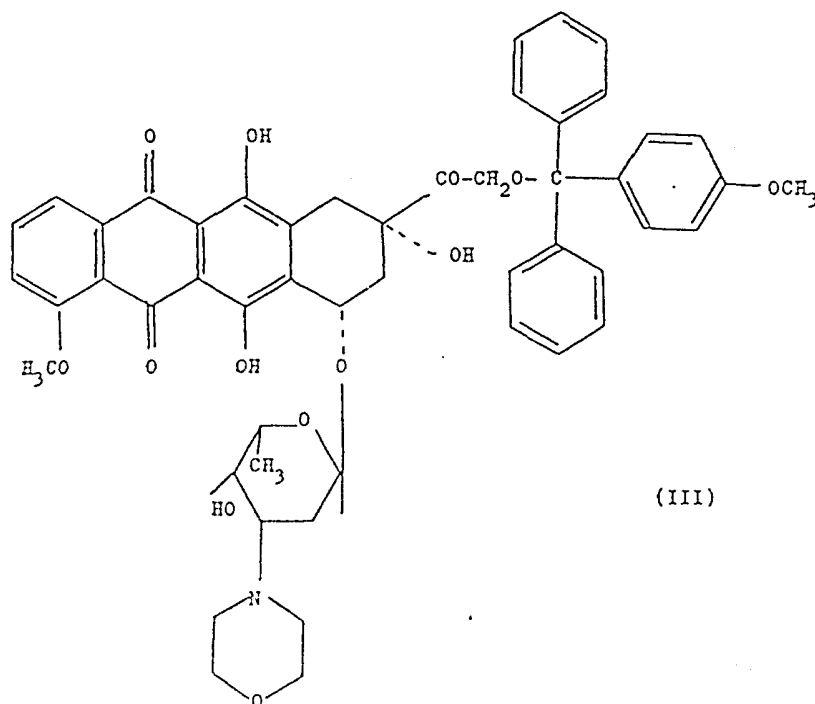
5-imosloučeniny je možno připravit snadno a přímo z izolovaných 5-oxosloučenin při použití způsobu podle publikace J. Medicinal Chem., 24, str. 669 (1981). Při provádění tohoto postupu se 5-oxomateriály uvedou do styku s přebytkem alkoholového roztoku amoniaku při nízké až mírně zvýšené teplotě, například při teplotě -25 až $+25^{\circ}\text{C}$ v době 0,5 až 100 hodin. V případě 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-doxorubicinu a 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-doxorubicinu je zapotřebí chránit hydroxylovou skupinu na uhlíkovém atomu v poloze 14 před působením amoniaku. K tomuto účelu je možno užít jakoukoli ochrannou skupinu, která je labilní v mírně kyselém prostředí. Vzhledem k široké možnosti použití ve farmaceutické chemii je výhodnou ochrannou skupinou methoxytritylová skupina. Tritylovou funkci je možno zavést tak, že se působí na 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-doxorubicin nebo 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-doxorubicin přebytkem p-anisylchlordifenylnmethanu při teplotě místnosti. Po skončené reakci s amoniakem je možno regenerovat hydroxylovou skupinu v poloze 14 působením kyseliny, například kyseliny octové nebo chladného vodného roztoku kyseliny tri-fluorocetové.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

P ř í k l a d 1

Příprava 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicin

A. K roztoku 0,396 g 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)doxorubicinu, v 5 ml bezvodého pyridinu se přidá 0,990 g p-anisylchlordifenylnmethanu. Směs se nechá reagovat při teplotě místnosti ve tmě přibližně 2 dny. Pak se roztok zchladí směsí vody a ledové drti a přidá se 0,5 ml methanolu. Směs se míchá další 2 hodiny, načež se přidá 50 ml ředěného hydrogenuhličitanu sodného a směs se extrahuje methylenchloridem. Extrakty se zahustí na pryžovitý odparek, který se rozpustí v toluenu, odpaří, rozpustí v methylenchloridu a vysráží pomalým přidáváním petroletheru o teplotě varu 35 až 60°C . Sraženina se oddělí, znovu rozpustí v methylenchloridu a vysráží směsí petroletheru a diethyletheru, čímž se ve výtěžku 94% získá jako amorfni pevná látka 14-O-p-anisylldifenylnmethyl-3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)doxorubicin vzorce III



Tento materiál byl identifikován NMR analýzou při 90 MHz v CHCl_3 .

B. Roztok 0,532 g 14-O-p-anisyl-difenylmethyl-3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)doxorubicinu v 10 ml methylenchloridu se přidá ke 30 ml methanolu, nasyceného amoniakem při teplotě 0 °C. Směs se míchá 1 hodinu při teplotě 0 °C a pak se nechá stát 27 hodin při teplotě 3 °C. Rozpouštědlo se odpaří a odparek se rozpustí v methylenchloridu a methanolu v poměru 4 : 1 a tento roztok se opět odpaří. Postup se dvakrát opakuje, načež se získá pevná látka rozpustí v methylenchloridu, zfiltruje se přes vrstvu Celitu, odpaří, odparek se rozpustí ve směsi methylenchloridu a methanolu v poměru 1 : 2 a roztok se znovu odpaří do sucha a vysuší, čímž se ve výtěžku 97% získá 0,52 g fialového odparu.

C. Odparek ze stupně B se rozpustí ve 2 ml methylenchloridu a roztok se nanese na sloupec silikagelu o rozměrech 1,5 x 40 cm, sloupec se vymývá 50 ml methylenchloridu a pak směsí methylenchloridu a methanolu, nejprve 150 ml směsi v poměru 98 : 2, 500 ml směsi v poměru 87 : 3, 100 ml směsi v poměru 95 : 5, směsí 100 ml v poměru 93 : 7 a 200 ml směsi v poměru 90 : 10. Nejprve se odebere eluát v množství 565 ml, pak se oddělí frakce o objemu 335 ml, tato frakce se zfiltruje a odpaří a obsahuje 59,9% naneseného vzorku jako jednotného materiálu. Tento materiál byl identifikován jako 14-O-p-anisyl-difenylmethyl-3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicin NMR analýzou při 90 MHz.

D. 0,341 g produktu ze stupně C se rozpustí ve 20 ml 80% kyseliny octové a roztok se míchá ve tmě 7 hodin. Pak se roztok zředí 50 ml vody a třikrát extrahuje chloroformem. Vodná fáze, která obsahuje požadovaný produkt se ve tmě lyofilizuje, čímž se získá 0,294 g pevné látky. Tato pevná látka se rozpustí v 0,1 N kyselině octové. Roztok se promyje chloroformem, alkalizuje hydrogenuhlíčitanem sodným a extrahuje chloroformem. Požadovaný produkt přejde do organické fáze, která se promyje, usuší, zfiltruje a odpaří na odparek. Tento odparek se rozpustí ve směsi chloroformu a methanolu v poměru 1 : 10, roztok se odpaří a odparek se usuší, čímž se získá 0,228 g 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicinu. Totožnost této látky byla ověřena NMR analýzou při 300 MHz a elementární analýzou.

P ř í k l a d 2

Způsob výroby adičních solí s kyselinami

Volná báze produktu z příkladu 1 se uvede v suspenzi ve 20 ml vody. Směs se míchá a současně se pomalu přidává 3,2 ml 0,1 N kyseliny chlorovodíkové do pH 4,5. Suspendovaná pevná látka se postupně rozpouští. Roztok se lyofilizuje ve tmě, čímž se získá 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicinhydrochloridu o čistotě 97% při analýze vysokotlakou kapalinovou chromatografií.

Analýza pro $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{11} \cdot \text{HCl} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

vypočteno: C: 54,35, H: 6,03, Cl^- : 5,17, N: 4,09%

nalezeno: C: 54,20, H: 5,96, Cl^- : 4,33, N: 4,03%

P ř í k l a d 3

Příprava a izolace 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-imino-13-dihydrodoxorubicinu

A. Roztok 0,186 g 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicinu, v 6 ml směsi methylenchloridu a methanolu v poměru 1 : 1 se přidá k 20 ml methanolu, nasyceného amoniakem, při teplotě 0°C. Směs se hodinu míchá a pak se nechá stát 27 hodin při teplotě 3°C, odpaří se a odparek se rozpustí ve směsi methylenchloridu a methanolu v poměru 4 : 1 a postup se třikrát opakuje do úplného odstranění amoniaku. Výsledný odparek se čistí chromatografií na tenké vrstvě silikagelu při rozměru ploten 2 mm x 20 x 20 cm, jako rozpouštědla se užije směs chloroformu a methanolu v poměru 9 : 1. Pásky, obsahující v podstatě čistý 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-imino-13-dihydrodoxorubicin se oddělí, vymyjí a eluát se odpaří, čímž se získá 0,139 g volné látky, jak je možno prokázat NMR analýzou při 300 MHz.

B. Volná látka ze stupně A se převede na hydrochlorid způsobem podle příkladu 2. Vysokotlakou kapalinovou chromatografií je možno prokázat, že čistota hydrochloridu je 97 až 98%.

Analýza pro $C_{31}H_{38}N_2O_{11} \cdot HCl \cdot 2H_2O$

Vypočteno: C: 54,19, H: 6,31, Cl⁻: 5,16, N: 4,08%

nalezeno: C: 54,17, H: 5,95, Cl⁻: 4,88, N: 3,87%

P ř í k l a d 4

Příprava 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-5-iminodaunorubicin

Roztok 0,031 g 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)daunorubicinu v 1,0 ml methylenchloridu se přidá k 5 ml methanolu, nasyceného amoniakem při teplotě 0°C. Směs se 30 minut míchá a pak se skladuje 45 hodin při teplotě 3°C. Reakční produkt se odpaří do sucha a odparek se rozpustí v 5 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 19 : 1, načež se roztok odpaří. Tento stupeň se ještě jednou opakuje. Odparek se rozpustí ve směsi methanolu a chloroformu a nanese se na tenkou vrstvu silikagelu, plotna má rozměr 2 mm x 20 x 20 cm, jako rozpouštědlo se užije směs chloroformu v poměru 9 : 1. Hlavní pás se vymyje a analyzuje. Hmotovou spektroskopií je možno ověřit, že výslednou látkou je 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-5-iminodaunorubicin.

Hmotové spektrum ve formě trimethylsilylového derivátu (TMS): m/e 882 /m(TMS)₄-HCN/, 810 /m(TMS)₃-HCN/. Hmotové spektrum mělo základní vrchol (HCM) při m/e 27. Chromatografie na tenké vrstvě silikagelu při použití směsi chloroformu a ethylalkoholu v poměru 19 : 1 R_f 0,32.

P ř í k l a d 5

Postup z příkladu 1 se ještě jednou opakuje při použití 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)doxorubicinu, místo 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)doxorubicinu. Sled zavedení ochranné skupiny, aminace a odstranění ochranné skupiny z příkladu 1 vede k získání 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicinu jako výsledného produktu.

Reakci je možno podrobněji popsat následujícím způsobem:

A. K roztoku 0,241 g 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)doxorubicinu ve 4 ml bezvodého pyridinu se přidá 0,587 g p-anisylchloridifenylnmethanu. Roztok se míchá při teplotě místnosti ve tmě 44 hodin, pak se reakční směs zchladí, zředí se 0,5 ml methanolu, roztok se míchá při teplotě místnosti 3 hodiny, pak se přidá k 50 ml zředěného

hydrogenuhlíčitanu sodného a směs se extrahuje methylenchloridem. Extrakty se odpaří, odparek se rozpustí ve 3 ml methylenchloridu a roztok se vysráží pomalým přidáváním 40 ml diethylesteru, čímž se ve výtěžku 97% získá 0,333 g 14-O-p-anisyl-difenylmethyl-3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)doxorubicinu.

NMR spektrum při 90 MHz v CDCl_3 δ :

13,84	(s, 6-OH),
12,99	(s, 11-OH),
7,82	(d, 1-H),
6,70 až 7,75	(m, 2-H, 3-H, tritylaryl),
5,42	(bs, 1'-H),
5,08	(bs, 7-H),
4,45	(bs, 2, 14-H ₂),
4,19	(s, 9-OH),
4,00	(s, OCH_3),
3,79	(s, OCH_3),
3,30 až 4,15	(m, 4'-H, 5'-H, 2"-H ₂ , 3"-H, 6"-H ₂),
1,60 až 3,10	(m, 2'-H ₂ , 8-H ₂ , 5"-H ₂ , 10-H ₂ , 3'-H),
1,13	(d, 6'-H ₃).

B. Roztok 0,369 g 14-O-p-anisyl-difenylmethyl-3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-doxorubicin v 8 ml methylenchloridu se přidá ke 25 ml methanolu, nasyceného amoniakem při teplotě 0°C. Směs se míchá hodinu při téže teplotě a pak se nechá stát 26 hodin při teplotě 3°C. Pak se směs odpaří k odstranění amoniaku, čímž se získá 0,376 g fialového odparu.

C. Odparek ze stupně B v 1,5 ml methylenchloridu se nanese na vrchol sloupce silikagelu o rozměrech 1,5 x 20 cm při průměru částic 200 až 400 mesh a sloupec se vymyje 50 ml methylenchloridu a pak směsí methylenchloridu a methanolu, nejprve 200 ml směsí v poměru 99 : 1, 300 ml směsí v poměru 98 : 2, 100 ml směsí v poměru 97 : 3, 100 ml směsí v poměru 95 : 5 a 200 ml směsí v poměru 90 : 10. Odebere se 360 ml počátečního eluátu, načež se odpaří frakce o objemu 125 ml, čímž se získá 0,203 g 14-O-p-anisyl-difenylmethyl-3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicinu.

D. 0,158 g odparu ze stupně C se zchladí na 0°C a rozpustí v 8 ml 50% kyseliny trifluoroctové chlazené ledem. Roztok se míchá při teplotě 0°C dvě minuty a pak se vlije do 100 ml směsi vody a ledové drti. Vodná směs se extrahuje chloroformem v množství 4 x 10 ml, extrakty se slíjí, promyjí se zředěným hydrogenuhlíčitanem sodným a vodou, vysuší se síranem sodným, zfiltruje přes vrstvu Celitu a odpaří. Odparek se rozpustí ve 3 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 4 : 1. Za stálého míchání se k roztoku přidá 25 ml etheru a výsledná sraženina se oddělí, čímž se získá 0,093 g 3'-deamino-3'-(3"-kyan-4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicinu.

Vysokotlakou kapalinovou chromatografií a NMR analýzou při 300 MHz je možno prokázat, že uvedený materiál je směs diastereoisomeru. Při vysokotlaké kapalinové chromatografii na sloupci Waters Radial-Pak C-18 ve směsi 0,05 M citrátového pufru o pH 4 a methanolu v poměru 40 : 60 je možno prokázat vrcholy po 18,4 minutách a 25,0 minutách v poměru 69 : 31. NMR spektrum tohoto produktu při 300 MHz má dvě resonance pro protony 1-H, 2-H, 3-H, 1'-H, 7-H, 14-H₂, 9-OH, OCH_3 , 10A-H a 6'-H₃.

NMR spektrum při 300 MHz v CDCl_3 :

15,61	(s, 11-OH),
13,74	(d, 6-OH),
9,27	(d, NH),

CS 268 514 B2

8,21, 8,19	(2d, 1-H),
7,73, 7,72	(2t, 2-H),
7,33, 7,32	(2d, 3-H),
5,77, 5,72	(2d, 1'-H),
5,41, 5,38	(2m, 7-H),
4,79, 4,77	(2s, 14-H ₂),
4,72, 4,66	(2s, 9-OH),
4,15, 4,14	(2s, OCH ₃),
4,04	(m, 5'-H),
3,97	(m, 3"-H, 2"-B-H),
3,75	(m, 6"-H ₂ , 4'-H),
3,59	(m, 2"A-H),
3,23	(d, 10B-H),
3,03	(m, 10A-H, 3'-H),
2,72	(m, 5"-H ₂),
2,33	(m, 8B-H),
2,14	(m, 8A-H),
1,85	(m, 2'-H ₂),
1,38, 1,37	(2d, 6'-H ₃).

Spektrum v ultrafialovém světle (Vis) v methanolu má maxima při
221 nm (ε 31 000), 252 (32 900), 307 (7 110),
520 mμ (9 110), 551 (17 400), 592 (20 700).

DCI-MS m/e 638 (M + H) 611 (M + H-NCH).

Analýza pro C₃₂H₃₅N₃O₁₁·H₂O

vypočteno: C: 58,62, H: 5,69, N: 6,41%,

nalezeno: C: 58,79, H: 5,47, N: 6,30%.

P ř í k l a d 6

Opakuje se postup podle příkladu 3 celkem čtyřikrát, přičemž pokaždé se užije ekvivalentní molární množství jiné výchozí látky místo 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicinu. V prvním případě se užije 3'-deamino-3'-(3"-kvan-4"-morfolinyl)-13-dihydrodoxorubicin a jako výsledný produkt se získá 3'-deamino-3'-(3"-kvan-4"-morfolinyl)-5-imino-13-dihydrodoxorubicin.

Hmotové spektrum (ve formě trimethylsilylového derivátu (TMS): m/e 900 /M(TMS)₄-HCN/. Při chromatografii na silikagelu s použitím směsi chloroformu a methanolu v poměru 9 : 1 je R_F 0,24.

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

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

T a b u l k a A

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

sloučenina	NSC č. ^x	Doba přežití % T/C	Optimální dávka (q4d 5, 9, 13) mg/kg	inhibice syntézy	
				ED ₅₀ DNA	/μM RNA
3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-13-dihydro- -5-imidodoxorubicin	355, 465	161	50	> 100	24
Pro srovnání:					
daunorubicin	82, 151	130	8	0,66	0,33
doxorubicin	123, 127	130	8	1,5	0,58

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

Tabulka A - pokračování

sloučenina	NSC č. ^x	Doba přežití % T/C	Optimální dávka (q4d 5, 9, 13) mg/kg	inhibice syntézy	
				ED ₅₀ DNA	/μM RNA
3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)- daunorubicin	327, 451	166	0,2	0,76	0,10
3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)- -13-dihydrodaunorubicin	327, 450	132	0,2	2,2	0,67

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

T a b u l k a B

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

sloučenina	doxorubicin	355277(1)
NSC č.	123127 ^x	
<u>ip 388</u>		
d, 1, ip	252(7,5)	> 193(2)
d, 1, iv	185(10)	166(2,5)

Vysvětlivky k tabulce B:

^x známé látky pro srovnání

(1) 3'-deamino-3'-(4"-morfolinyl)-5-iminodoxorubicin

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

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

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

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

Prostředek A

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

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

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

Prostředek B

Sterilní roztok ve vodném nosiči pro injekční podání je možno získat z následující směsi:

složka	mg
sloučenina z příkladu 2	4
citronan sodný	5,7
sodná sůl karboxymethylcelulózy (s nízkou viskositou)	2,0
methylparahydrobenzoát	1,5
propylparahydroxybenzoát	0,2

Výsledná směs se doplní vodou pro injekční podání na objem 1,0 ml.

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu je možno podávat například ve formě tablet nebo kapslí.

Prostředek C

Tablety je možno vyrobit z následující směsi:

složka	mg
sloučenina z příkladu 2	5,0
laktóza	91
sušený kukuřičný škrob	51,5
želatina	2,5
stearan hořečnatý	1,0

Sloučenina z příkladu 2 se rozdrtí na prášek, který se protlačí sítem a smísí s laktózou a 30 mg kukuřičného škrobu, tyto látky se rovněž protlačí sítem.

Výsledný prášek se smísí s teplým roztokem želatiny, který se připraví mícháním želatiny s vodou a zahřátím za vzniku roztoku o koncentraci 10 hmotnostních %. Výsledná hmota se protlačí sítem a vlhká granule se suší při 40°C.

Sušená granule se znovu protlačí sítem, přidá se zbytek škrobu a stearan hořečnatý, směs se důkladně promísí.

Pak se výsledná směs lisuje na tablety o hmotnosti 150 mg.

Prostředek D

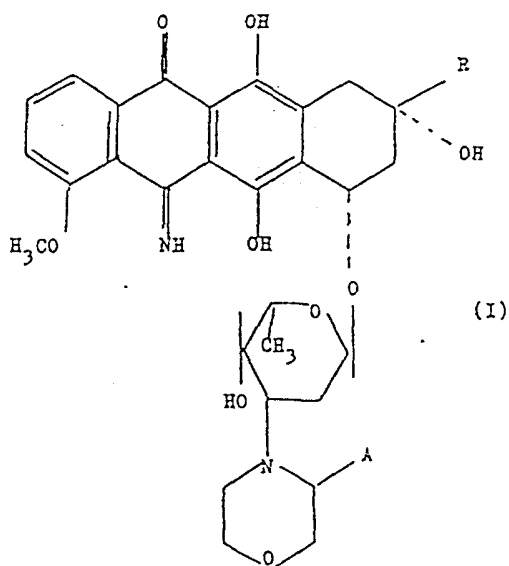
Kapsle je možno vyrobit z následující směsi:

složka	mg
sloučenina z příkladu 3	10
laktóza	190

Sloučenina z příkladu 3 a laktóza se protlačí sítem a prášková směs se dobře promísí, načež se plní do kapslí z tvrdé želatiny vhodného rozměru tak, že se do každé kapsle vloží 200 g získaného práškového materiálu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

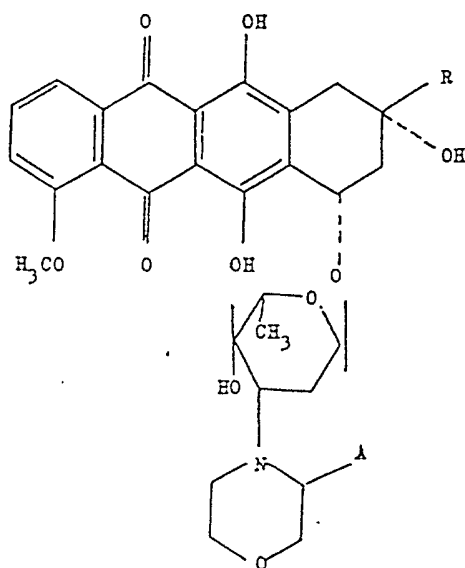
1. Způsob výroby nových morfolinových derivátů daunorubicinu a doxorubicinu obecného vzorce I



kde

R znamená skupinu CO-CH_3 , CHOH-CH_3 , $\text{CO-CH}_2\text{OH}$ a $\text{CHOH-CH}_2\text{OH}$ a

A znamená skupinu CN nebo atom vodíku, vyznačující se tím, že se ve sloučenině obecného vzorce



kde

R a A mají svrchu uvedený význam, nejprve v případě, že sloučenina obsahuje hydroxy-skupinu v poloze 14 opatří tato skupina ochrannou skupinou, odstranitelnou v mírně kyselém prostředí, například p-methoxytritylovou skupinou, načež se sloučenina uvede v reakci s přebytkem alkoholového roztoku amoniaku při teplotě -25 až $+25^{\circ}\text{C}$, načež se popřípadě odstraní uvedená ochranná skupina kyselinou octovou nebo kyselinou trifluoroctovou při teplotě místnosti a výsledná látka se izoluje a čistí.