



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

241086
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 9/00/

(22) Přihlášeno 10 05 84
(21) (PV 3468-84)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 14 05 83
(84605/83) Japonsko
(40) Zveřejněno 13 06 85
(45) Vydáno 15 08 87

(72)
Autor vynálezu FUJII AKIO, KAMAKURA; MURAOKA YASUHIKO, KITAMOTO;
NAKATANI TOKUJI, SAITAMA; FUKUOKA TAKEO, YONO;
TAKAHASHI KATSUTOSHI; UMEZAWA HAMAO, TOKYO (Japonsko)
(73)
Majitel patentu NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA, TOKYO (Japonsko)

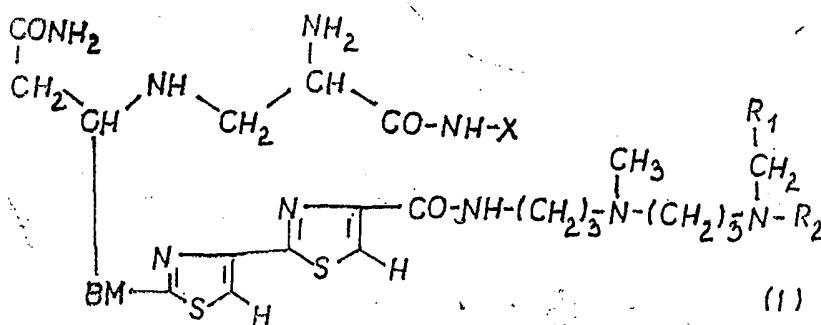
(54) Způsob výroby nových (amido)N-substituovaných bleomycinů

1

Vynález se týká způsobu výroby nových
(amido)N-substituovaných bleomycinů.
Zvláště se vynález týká nového způsobu

2

výroby málo toxických nových (amido)N-
substituovaných bleomycinů obecného vzor-
ce I



kde

BM znamená zbytek bleomycinového ske-
letu,

X znamená alkylovou skupinu se 6 až 10
atomy uhlíku nebo alkylovou skupinu se 2
až 6 atomy uhlíku substituovanou mono- ne-
bo di(C1-C5)alkylaminovou skupinou, fenyl-
ethylaminovou skupinou nebo N-methyl-N-
-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethyl)aminopropyl]ami-
novou skupinou,

R₁ znamená cykloalkylovou skupinu s až
13 atomy uhlíku, alkylovou skupinu s 1 až
5 atomy uhlíku mající fenylový substituent,
který může být substituován atomy haloge-
nu, nebo fenylovou skupinu, která může být
substituována alespoň jedním substituentem
vybraným ze skupiny zahrnující atomy ha-
logenu, kyanoskupinu a benzyloxyskupinu,
a

R₂ znamená atom vodíku, benzylovou sku-
pinu nebo dibenzyloxybenzylovou skupinu.

Bleomyciny jsou karcinostatické látky, které byly objeveny v roce 1966 Umezawou, jedním z autorů předloženého vynálezu, a spolupracovníky (Umezawa a kol., *Journal of Antibiotics*, **19A**, str. 200 /1966/). Jsou produkovány mikroorganismem *Streptomyces verticillus* (Actinomycet) a jsou to bazické, ve vodě rozpustné glykopeptidy, které jsou schopny snadné komplexace s jedním atomem dvojmocné mědi.

Obvyklou kulturou je produkováno 16 bleomycinů, které byly izolovány (například Umezawa a spol., *Journal of Antibiotics* **19A**, 210 /1966/).

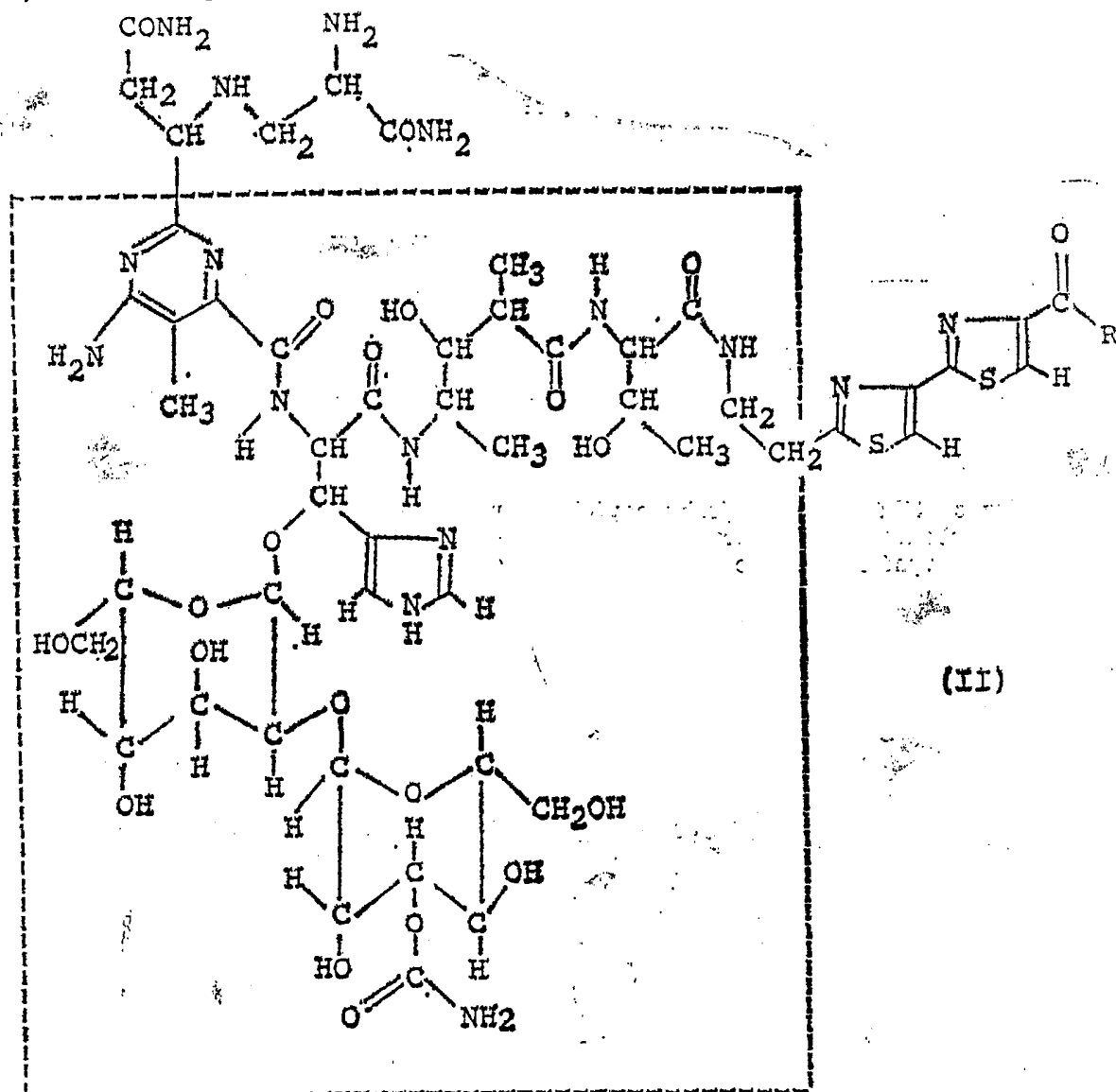
Z těchto bleomycinů bleomyciny A₁, A₂, A₅, B₂ a demethyl-A₂ ve formě, která neobsahuje atom mědi, jsou jako směs (odtud název bleomycinový komplex) široce používaný v oblasti terapie rakoviny.

Podrobněji — bleomyciny jsou s úspěchem používány především při léčení squamosního buněčného karcinomu, dále pak rakoviny kůže, hlavy a krku, rakoviny plic a maligního lymphonu.

Různé bleomyciny jsou popsány také v USA patentu č. 3 922 262 a v obnoveném USA patentu č. 30 451.

Bleomyciny, které obsahují atom mědi, se obvykle vyrábějí fermentací. Bleomyciny, které neobsahují atom mědi, se vyrábějí odstraněním atomu mědi z bleomycinů tento atom obsahujících. Termín „bleomycin“, jak je zde používán, znamená obě formy, jak s atomem mědi, tak i bez tohoto atomu, bez další specifikace.

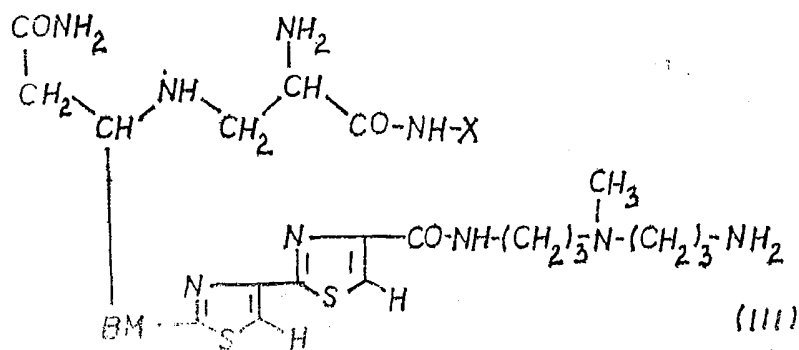
Bleomyciny jsou sloučeniny obecného vzorce II



kde R znamená koncový aminový zbytek bleomycinu, v případě formy obsahující měď je atom mědi vynechán.

Tyto výše uvedené bleomyciny vykazují výborné účinky, nicméně však způsobují i vedlejší účinky, jako je pulmonární toxicita, které závisí na způsobu jejich aplikace. Z tohoto důvodu je nyní jejich aplikace omezena. Je proto žádoucí vývoj bleomycinů, které by měly menší vedlejší účinky.

S cílem připravit tyto látky na základě



kde

BM a X mají výše uvedený význam, s aldehydem obecného vzorce IV



kde

R₁ má výše uvedený význam a popřípadě se získaná sloučenina převede na jinou sloučeninu obecného vzorce I, kde substituenty R₁ a R₂ mají jiný výše uvedený význam.

Zbytek bleomycinového skeletu označený BM v obecném vzorci I předloženého vynálezu je část označená přerušovanými čarami v obecném vzorci II bleomycinů a zahrnuje jak formu obsahující měď, tak formu prostou mědi.

Aldehydy obecného vzorce IV použité v tomto vynálezu zahrnují cykloalkylaldehydy s až 13 atomy uhlíku a zejména cyklopentylaldehyd, cyklooktylaldehyd, cyklododekanaldehyd, cykloundekanaldehyd atd.

Fenylsubstituované nasycené alifatické

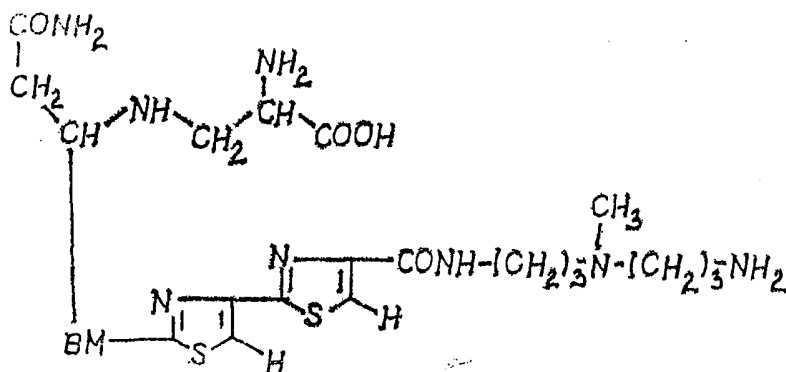
rozsáhlé studie, autoři vynálezu již dříve vynalezli amido(N)-substituované bleomyciny uvedeného obecného vzorce I.

Výsledkem dalších studií autorů je zjištění, že amido(N)-substituované bleomyciny obecného vzorce I lze vyrobit ve velkém množství reduktivní kondenzací amido(N)-substituovaných derivátů 3-[N-methyl-N-/3-aminopropyl/amino]propylaminobleomycinů obecného vzorce III

aldehydy, jejichž samotný fenylový substituent může nést substituenty, zahrnují nasycené alifatické aldehydy s 1 až 5 atomy uhlíku, mající fenylový substituent, jako je fenylacetaldehyd, fenylethylaldehyd a halogensubstituované fenylacetaldehydy (například chlorfenylacetaldehyd).

Benzaldehydy zahrnují například benzaldehyd, halogenbenzaldehydy (například p-chlorbenzaldehyd, m-brombenzaldehyd), kyanobenzaldehyd a benzyloxybenzaldehydy (například m,p-dibenzyloxybenzaldehyd).

Sloučeniny obecného vzorce III použité v předloženém vynálezu jako výchozí materiál, mohou být připraveny hydrolýzou 3-[N-methyl-N-/3-aminopropyl/amino]propylaminobleomycinu (dále označován jako bleomycin APMP) použitím bleomycin inaktivního enzymu (dále uváděn jako inaktivní enzym; Umezawa a kol. Journal of Antibiotics, 27, 419, /1974/) za vzniku 3-[N-methyl-N-/3-aminopropyl/amino]propylaminodeamidobleomycinu (dále označován jako deamidobleomycin APMP) obecného vzorce



a pak kondenzací deamidobleomycinu APMP s aminem obecného vzorce V



kde

X má význam uvedený pod obecným vzorcem I.

Ve významu X mohou být uvedeny například alkylové skupiny se 6 až 10 atomy uhlíku a alkylové skupiny se 2 až 6 atomy uhlíku mající primární aminosubstituent.

Zvláště jsou výhodné n-oktylová, fenylethylaminopropyllová, 3-[N-methyl-N-(3-(2-/p-chlorfenyl)ethyl)aminopropyl]amino]propyllová a di-n-butylaminopropyllová skupina.

Sloučeniny obecného vzorce III mohou být připraveny například následujícím způsobem.

Hovězí játra se zhomogenizují s roztokem fosfátového pufru. Vzniklý homogenizát se odstředí při 8 000 ot/min. Supernatant se dialyzuje proti roztoku fosfátového pufru za účelem získání surového roztoku enzymu.

K surovému roztoku enzymu se přidá měďdi prostá forma bleomycinu APMP rozpustitelná v roztoku fosfátového pufru. Tato směs se nechá reagovat při teplotě 35 °C. Reakční směs se zbaví proteinů vhodnou metodou (například se přidává kyselina trichloroctová) dále označována jako TCA (v množství asi 5 %, aby se vysrážely proteiny. Sraženina se odstraní odstředěním, promyje se pak 3 × 5% TCA, supernatant a promývací tekutiny se spojí).

Po neutralizaci se přidá octan měďnatý k reakční směsi prosté proteinů tak, že octan měďnatý je v přebytku vzhledem k bleomycinu, aby požadovaný produkt byl převeden do formy chelátu s měďí.

Roztok měďnatého chelátu se pak odsolí tak, že se vlije na kolonu plněnou adsorpční pryskyřicí Dialon[®] HP-40 s destilovanou vodou, kde se požadovaný produkt adsorbuje.

Po vymytí solí destilovanou vodou se provede eluce směsí 1/50N vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové a methanolu (1:4 obj./obj.).

Frakce mající absorpční maximum při vlnové délce asi 290 nm se shromáždí. Po neutralizaci anexem Dowex[®] 44 (OH typ, vyrobeno Dow Chemical Co.) se spojené frakce zkoncentrují za sníženého tlaku a lyofilizují.

Získaný prášek se rozpustí v destilované vodě. Vzniklý roztok se vlije za účelem adsorpce na kolonu plněnou CM-Sephadexem[®] C-25 (Na⁺ typ, vyrobeného Pharmacia Fine Chemicals Co.) předtím uvedeného do rovnovážného stavu 1/20 M roztokem pufru kyseliny octové s octanem sodným o pH 4,5.

Eluce se provede metodou lineárního koncentračního gradientu, při které se kontinuálně přidává chlorid sodný k výše uvedenému roztoku pufru k postupnému zvýšení koncentrace sodných iontů na 1,0 M. Modra-

vě fialové frakce požadovaného produktu se shromáždí.

Spojené frakce se zbaví soli stejným odsolením pomocí Dialonu[®] HP-40 použitým dříve a pak se lyofilizují, čímž se získá modrý amorfni prášek formy deamidobleomycinu APMP obsahující měď.

Takto získaný deamidobleomycin APMP se pak kondenzuje s aminem obecného vzorce V použitím známých metod pro tvorbu amidového řetězce kyselin, jako je metoda popsaná v USA patentu č. 4 195 018 a pak, je-li to nutné, odstraní se měď k získání reakční směsi obsahující sloučeninu obecného vzorce III.

Ve výše uvedené kondenzační reakci se užívá kondenzačních činidel jako je cyklohexylkarbodiimid, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid, 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoethyl)karbodiimid, diisopropylkarbodiimid, difenylfosforazidát (DPPA), diethylfosforokyanidát (DEPC), 6-chlor-1-p-chlorbenzensulfonyloxybenzotriazol (CCBT) a podobně.

Spolu s výše uvedenými kondenzačními činidly mohou být použity přídavné kondenzační látky jako je p-nitrofenol, o,p-dinitrofenol, pentachlorfenol, 2,4,5-trichlorfenol, pentafluorfenol, N-hydroxysukcinimid, N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximid, 1-hydroxybenzotriazol a podobně.

Kondenzace se provádí v rozpouštědle jako je voda, dimethylformaldehyd, acetonitril nebo jejich směs. Pracuje se při reakční teplotě od -20 do 50 °C, výhodně -10 až 30 °C. Doba reakce není omezena, postačuje doba 1 až 70 hodin.

Sloučenina obecného vzorce III se izoluje z reakční směsi následujícím způsobem. K výše získané reakční směsi se přidá organické rozpouštědlo, jako je aceton, ether a podobně k vysrážení požadovaného produktu. Pak se sraženina rozpustí v destilované vodě. pH roztoku se upraví na hodnotu 6 a zbaví se solí vlitím na kolonu naplněnou adsorptivní pryskyřicí, jako je Amberlite[®] XAD-2 (výrobce Rohm and Haas Co.) s destilovanou vodou, kde se požadovaný produkt adsorbuje.

Po vymytí solí destilovanou vodou se provede eluce okyseleným vodným methanolem, například směsí 1/50 N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a methanolu (1:4 obj./obj.). Frakce s absorpčním maximum okolo 290 nm se shromáždí. Po neutralizaci anexem, Dowex[®] 44 (OH typ, vyrobený Dow Chemical Co.) se spojené frakce zahustí a lyofilizují. Získá se surový prášek sloučeniny obecného vzorce III.

Dále je popsán postup, při kterém je vypuštěn stupeň odsolení. V tomto případě se uvedená sraženina rozpustí v destilované vodě a dále zpracovává v následujícím stupni.

Výše získaný prášek se rozpustí v destilované vodě. Roztok se vlije na kolonu naplněnou CM-Sephadexem[®] C-25 (Na⁺ typ,

výrobce Pharmacia Fine Chemicals Co.), který byl dříve uveden do rovnovážného stavu roztokem 1/20 M kyseliny octové — octanu sodného (pufr) o pH 4,5 za účelem adsorpce.

Eluce se provede metodou lineárního koncentračního gradientu, při které se konstantně přidává k výše uvedenému roztoku pufru chlorid sodný až k postupnému zvýšení koncentrace sodných iontů na 1,0 M.

Protože nezreagované látky a vedlejší produkty se eluují dříve, lze je separovat a odstranit použitím ultrafialového absorpčního monitoru. Jestliže frakce požadovaného produktu obsahují nečistoty, opakuje se výše uvedená chromatografie, aby se úplně odstranily nečistoty.

Výše uvedená chromatografie může být nahrazena chromatografií za použití adsorptivní pryskyřice jako je Amberlite[®] XAD-2. Při této chromatografii se vodný roztok surového produktu vlije na kolonu plněnou pryskyřicí, například s 1% vodným roztokem octanu amonného, za účelem adsorpce požadovaného produktu.

Eluce se provede pomocí metody lineárního koncentračního gradientu, při které se k výše uvedenému roztoku pufru přidává methanol k postupnému zvýšení koncentrace methanolu. Protože se stává, že nezreagované látky se eluují dříve a vedlejší produkty později, lze je odstranit použitím ultrafialového absorpčního monitoru.

Jestliže se u frakcí požadovaného produktu zjistí, že obsahují nečistoty, opakuje se uvedená chromatografie za účelem úplného odstranění nečistot.

Výše uvedené dva přečišťovací postupy lze použít samostatně nebo ve vzájemné kombinaci.

Takto získané frakce požadovaného produktu se zbaví soli odsolením za použití adsorptivní pryskyřice, jako je Amberlite[®] XAD-2, jak je popsáno výše a pak se lyofilizují. Získá se forma sloučeniny obecného vzorce III obsahující měď jako mědřý amorfni prášek.

Tuto formu obsahující měď lze převést na formu prostou mědi známým způsobem, jako je způsob používající EDTA popsán v USA patentu č. 3 929 993.

Příklad konverze na formu prostou mědi je popsán níže. Forma obsahující měď se rozpustí v destilované vodě. Tento roztok se vlije za účelem adsorpce na kolonu naplněnou Amberlitem[®] XAD-2 s destilovanou vodou.

Pryskyřice se promyje vodným roztokem obsahujícím chlorid sodný a 5% dvojsodnou sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (dále označována jako EDTA $\times 2$ Na), proto, aby měďnatý ion byl navázán pomocí EDTA a forma prostá mědi zůstala na měniči.

Pryskyřice se promyje chloridem sodným, aby se odstranila EDTA $\times 2$ Na a dále se promyje destilovanou vodou. Následující e-

luce se provede okyseleným vodným methanolem, například směsí 1/50 N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a methanolu (1:4 obj./obj.) a shromáždí se frakce vykazující absorpční maximum při vlnové délce asi 290 nm. pH spojených frakcí se upraví na hodnotu 6 použitím Dowexu[®] 44 (OH typ, výrobce Dow Chemical Co.) a pak se zahustí za sníženého tlaku a lyofilizují za vzniku bílého amorfniho prášku hydrochloridu mědi prosté formy sloučeniny obecného vzorce III.

Jestliže se ve výše uvedeném postupu místo vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové použije vodný roztok kyseliny sírové, získá se sulfát. Z toho je zřejmé, že vhodným výběrem kyseliny ve výše uvedené eluci, lze získat sůl s požadovanou kyselinou.

Podle předloženého vynálezu se dále reduktivně kondenzuje takto získaná sloučenina obecného vzorce III s aldehydem obecného vzorce IV.

Jako reduktivní činidla použitá v této kondenzaci lze uvést borohydrosloučeniny (například kyanoborohydrid sodný, borohydrid sodný, borohydrid lithný, borohydrid draselný, bis(trifenylfosfin)tetrahydroborato-měď atd.).

Katalytickou redukci lze provést za použití katalyzátoru, jako je paládium na uhlí. Použitím dvou nebo méně mol, výhodně 1 až 1,5 mol. aldehydu obecného vzorce IV na 1 mol sloučeniny obecného vzorce III, vzniká sloučenina obecného vzorce I, kde R₂ znamená hlavně vodík. Použitím 3 nebo více mol vzniká sloučenina obecného vzorce I, kde R₂ znamená skupinu obecného vzorce $-\text{CH}_2-\text{R}_1$. Požadovaný přírůstek aldehydu pro přípravu sloučenin obecného vzorce I, kde R₂ je vodík, je 1,2 mol a 5 až 15 mol, výhodně asi 10 mol, pro získání sloučeniny obecného vzorce I, kde R₂ znamená skupinu obecného vzorce $-\text{CH}_2-\text{R}_1$. V případě, že aldehyd obecného vzorce IV, je sloučeninou obtížně rozpustnou v methanolu, jako je m,p-dibenzoyloxybenzaldehyd, může být jeho množství sníženo s tím, že bude prodloužena reakční doba.

Výše uvedené kondenzační reakce nemají nijak omezeno použití rozpouštědel, pokud se tato neúčastní reakce. Jako rozpouštědla se užívají polární rozpouštědla jako voda, methanol, ethanol, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran a acetonitril a jejich směsi. Reakční teplota je -5 až 80°C , běžně 0 až 50°C . Zvláště je žádoucí, aby pro získání sloučeniny, kde R₂ znamená vodík, byla užitá teplota 0 až 25°C a teplota 35 až 50°C pro získání sloučeniny, kde R₂ znamená skupinu obecného vzorce $-\text{CH}_2-\text{R}_1$ při použití aldehydu velké stérické zábrany nebo nízké rozpustnosti. Vhodná reakční doba je 3 až 70 hodin. Při použití aldehydu velké stérické zábrany nebo nízké rozpustnosti je vhodnější reakční doba (například 150 hodin).

Z takto získané reakční směsi se izoluje sloučenina obecného vzorce I následujícím způsobem. V případě použití borohydridové sloučeniny se upraví hodnota pH reakční směsi na 1 kyselinou chlorovodíkovou a míchá při teplotě místnosti po dobu 5 až 10 minut tak, aby se rozložilo reduktivní činidlo přidané v přebytku. Potom se reakční směs zneutralizuje, zbaví methanolu destilací za sníženého tlaku, pomocí extrakce etherem nebo butanolem se zbaví přebytku aldehydu a ketonu a odsolí se následujícím způsobem. Reakční směs se vlije na kolonu naplněnou adsorptivní pryskyřicí jako je Amberlite[®] XAD-2 (výrobce Rohm and Haas Co.) s destilovanou vodou za účelem adsorpce požadovaného produktu. Po vymytí soli destilovanou vodou se provede eluce kyselým vodným methanolem, například směsí 1/50 N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a methanolu (1:4 obj./obj.), shromáždí se frakce obsahující modrý bleomycinový derivát. Spojené frakce se, je-li to nutné, neutralizují anexam Dowex[®] 44 (OH typ, výrobce Dow Chemical Co.), zahustí se za sníženého tlaku a lyofilizují za vzniku modrého prášku požadovaného surového produktu.

Další přečištění se provede následujícím způsobem.

Výše uvedený prášek se rozpustí v destilované vodě. Tento roztok se vlije na kolonu naplněnou CM-Sephadexem[®] C-25 (Na⁺ typ, výrobce Pharmacia Fine Chemicals Co.) předtím uvedeného do rovnovážného stavu 1/20 M roztokem pufru kyselina octová-octan sodný o pH 4,5 za účelem adsorpce. Eluce se provede metodou lineárního koncentračního gradientu, při které se postupně přidává chlorid sodný k výše uvedenému roztoku pufru, až k postupnému zvýšení koncentrace Na⁺ iontů na 1,0 M. Jestliže u frakcí požadovaného produktu se zjistí nečistoty, lze doplnit výše uvedenou chromatografii chromatografií za použití adsorptivní pryskyřice jako je Amberlite[®] XAD-2. Spojené frakce se vlijí na kolonu naplněnou

pryskyřicí, například se 4 % vodným roztokem octanu amoného, za účelem adsorpce požadovaného produktu. Eluce se provede metodou lineárního koncentračního gradientu, při které se průběžně přidává k výše uvedenému roztoku pufru methanol k postupnému zvýšení koncentrace methanolu. V tomto případě se nezreagované látky elují nejprve, sloučenina, ve které R₂ je vodík se eluuje jako další a sloučenina, kde R₁ a R₂ mají stejný význam, se eluuje jako poslední. Oddělení těchto frakcí se spolehlivě provede použitím ultrafialového absorpčního monitoru. Jestliže jsou ve frakcích požadovaného produktu zjištěny nečistoty, opakuje se výše uvedená chromatografie za účelem úplného odstranění nečistot.

V tomto stupni lze kolonu CM Sephadexu[®] C-25 nahradit kolonou CM Sepharose[®] CL-6B (výrobce Pharmacia Fine Chemicals Co.) nebo Toyopearl[®] 650 (výrobce TOYO SODA MFG CO.), nebo podobně naplněnou kolonou a promytou methanolem. V tomto případě lze vynechat odsolení po reakci. Reakční směs se přímo vlije na kolonu za účelem adsorpce požadovaného produktu. Po vymytí činidel atd. methanolem se eluce provede vodným roztokem methanolu obsahujícím 0,1 M chlorid sodný. Spojené frakce se chromatografují na Amberlitu[®] XAD-2.

Spojené frakce požadovaného produktu připravené tímto způsobem se odsolí pomocí Diaionu[®] HP-40 použitého výše a pak se lyofilizují za získání formy (amido)N-substituovaného bleomycinu obecného vzorce I obsahujícího měď ve formě modrého amorfního prášku.

Formu obsahující měď (amido)N-substituovaného bleomycinu takto získanou lze zbavit mědi výše popsaným způsobem za vzniku požadované soli mědi prosté formy ve formě bílého prášku.

Typické příklady sloučenin podle vynálezu jsou uvedeny v tabulce I a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti v tabulce 2.

Tabulka 1

sloučenina č.	název sloučeniny	zkratka
1	3-[N-methyl-N-[3-(p-chlorbenzylamino)-propyl]amino]-propylamino(amido)N-[3-[(S/-1'-fenylethylamino)propyl]-BLM	dMCLBZ-PEP
2	3-[N-methyl-N-[3-(p-chlorbenzylamino)propyl]amino]-propylamino(amido)N-[oktyl]-BLM	dMCLBZ-OCT
3	3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-[(S/-1'-fenylethylamino)propyl]-BLM	dMCLPE-PEP dMCLPE
4	3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[oktyl]-BLM	dMCLPE-OCT
5	3-[N-methyl-N-[3-(p-kyanobenzylmethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-[(S/-1'-fenylethylamino)propyl]-BLM	dMCNBZ-PEP
6	3-[N-methyl-N-[3-(p-kyanobenzylmethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[oktyl]-BLM	dMCNBZ-OCT
7	3-[N-methyl-N-[3-(cyklooktylmethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-[(S/-1'-fenylethyl)aminopropyl]-BLM	dMCO-PEP
8	3-[N-methyl-N-[3-(cyklooktylmethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[oktyl]-BLM	dMCO-OCT
9	3-[N-methyl-N-[3-bis(m,p-dibenzyloxybenzylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-[(S/-1'-fenylethylamino)propyl]-BLM	dDD-PEP
10	3-[N-methyl-N-[3-bis(m,p-dibenzyloxybenzylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[n-oktyl]-BLM	dDD-OCT
11	3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethylamino)propyl]amino]propyl]-BLM	dMCLPE-MCLPE
12	3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dMCLPE-EPA
13	3-[N-methyl-N-[3-(p-kyanobenzylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dMCNBZ-BPA

Tabulka 2

slouč. č.	zkratka	UV absorpce formy prosté mědi maximum při nm (E 1 %/1cm)	chromatografie ^{x1)} formy obsahující měď na tenké vrstvě Rf	elektroforéza ^{x2)} formy obsahující měď, Rm (Rm alaninu = 1)
1	dMCLBZ-PEP	289 (90)	0,53	1,16
2	dMCLBZ-OCT	290 (88)	0,50	1,08
3	dMCLPE-PEP	290 (79)	0,53	1,04
4	dMCLPE-OCT	290 (85)	0,52	0,96
5	dMCNBZ-PEP	291 (93)	0,69	1,10
6	dMCNBZ-OCT	292 (94)	0,59	0,95
7	dMCO-PEP	291 (89)	0,53	1,06
8	dMCO-OCT	291 (83)	0,42	0,96
9	dDD-PEP	285 (74)	0,09	0,93
10	dDD-OCT	285 (76)	0,04	0,64
11	dMCLPE-MCLPE	290 (79)	0,25	1,20
12	dMCLPE-BPA	290 (83)	0,60	1,11
13	dMCNBZ-BPA	290 (81)	0,70	1,10

poznámka:

^{x1)} Silikagel 60F Silanized^R (Merck Co.); methanol- 60% octan amonný (60:40 obj./obj.)

^{x2)} Avicel SF^R (FMC Co.); kyselina mravenčí —kyselina octová—voda (27:75:900 obj./obj.), 800 V, 15 minut

Biologické vlastnosti, které byly testovány na typických sloučeninách podle tohoto vynálezu, jsou uvedeny níže.

1. Antimikrobiální účinnosti na *Mycobacterium Smegmatis* ATCC 607 a *Bacillus subtilis*.

Antimikrobiální účinnosti byly testovány na uvedených mikroorganismech razítkovou technikou na agarových plotnách. Účinnost byla stanovována vzhledem k účinnosti standardního vzorku bleomycinu Az (ve formě, která neobsahuje měď), jehož účinnost je 1000 µg/mg.

2. Účinnost inhibice růstu kultury buněk HeLa S3.

Buňky HeLa S3 se naočkují na médium (MEM s 10 % hovězího séra) v plastických Petriho miskách. Dva dny po naočkování se přidá k médiu testovaný bleomycin. V inkubaci se pokračuje další tři dny, pak se spo-

čítají buňky. Procentuální inhibice růstu se vypočte podle následující rovnice:

$$\text{Procentuální inhibice růstu (v \%)} = 100 \times (B-A) / (B-C),$$

kde

A znamená konečný počet buněk třetí den po přidání testovaného vzorku,

B znamená konečný počet buněk kontrolního vzorku (bez přidání testovaného vzorku) a

C znamená počet buněk v době přidání testovaného vzorku.

ID₅₀ (koncentrace způsobující 50 % inhibici) se vyhodnotí z křivky koncentrace vzorku proti procentuální inhibici.

Výsledky testů 1. a 2. jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

slouč. č.	zkratka	antimikrobiální účinnost sloučeniny		Koncentrace způsobující 50% inhibici růstu (ID ₅₀)
		prosté mědi (μg/mg) na Mycobacterium smegmatis ATCC 607	na Bacillus subtilis	
				Sloučeniny prosté mědi vůči HeLa S ₃ buněkám (ID ₅₀) μg/ml
1	dMCLBZ-PEP	14,880	2,590	0,53
2	dMCLPE-OCT	38,200	1,808	0,43
3	dMCLPE-PEP	15,593	4,267	0,37
4	dMCLPE-OCT	38,750	1,898	0,23
5	dMCNBZ-PEP	21,877	11,056	0,60
6	dMCNBZ-OCT	49,270	381	0,28
7	dMCO-PEP	54,345	7,273	0,33
8	dMCO-OCT	65,733	5,473	0,23
9	dDD-PEP	115	23	0,058
10	dDD-OCT	153	13	0,30
11	dMCLPE-MCLPE	650	270	0,30
12	dMCLPE-BPA	31,690	3,690	0,40
13	dMCNBZ-BPA	14,730	4,755	1,10

3. Pulmonární toxicita (pulmonární fibrosa) u myši

Pro testy byly použity ICR myši (samečci ve stáří 15 týdnů) ve skupinách po 9 myších. Každá myš dostávala denní dávku 5 mg/kg testovaného vzorku intraperitoneální injekcí, jednou denně, po dobu 10 po sobě následujících dnů. Od ukončení podávání testovaného vzorku byly myši po dobu 5 týdnů pozorovány, potom byly utraceny a pítvou byl sledován výskyt a stupeň pulmonární fibrosy. Vyhodnocení bylo děláno na základě porovnání počtu testovaných myši trpících pulmonární fibrosou a na základě stupně onemocnění. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 4.

Stupeň onemocnění je vyjádřen číselně podle následující stupnice:

Počet bodů

- 0 žádná fibrosa
- 1 akumulace exudátu v pulmonární alveoli a fibrose podobná změna v alveolárním septu
- 2 fibrosa v několika oblastech
- 4 roztroušená fibrosa
- 6 fibrosa na více než dvou třetinách celkové plochy.

„Poměr“ byl vypočten ze srovnání s „bleomycinovým komplexem“.

Jak je zřejmé z uvedených výsledků, sloučeniny podle tohoto vynálezu mají vysokou inhibici růstu kultury HeLa S₃ buněk i významnou antimikrobiální účinnost a mají velmi nízkou pulmonární toxicitu, což jsou pozitivní fakta pro jejich použití v klinických oblastech.

Vynález je dále ilustrován podrobněji v příkladech, není však jimi nikterak omezen.

Příklady

Stupeň A

Osmset gramů čerstvých hovězích jater se homogenizuje v 1,6 l 0,05 M fosforečnanového pufru o pH 7,2. Homogenizovaná směs se odstřeďuje 30 minut při 8 000 ot/min. Supernatant se dialyzuje proti 0,05 M roztoku fosforečnanového pufru za použití celulóзовé membrány.

Přípraví se tak roztok surového enzymu. K 32,7 g bleomycinu APMP se přidá 1,5 l roztoku surového enzymu. Směs se nechá reagovat při 37 °C 24 hodin. K reakční směsi se přidá 150 ml 55% kyseliny trichloroctové (dále uváděna jako TCA), vysráží se protein.

Sraženina se odstředí a promyje se třikrát 5% TCA. Supernatant a všechny promývací roztoky se spojí. Po neutralizaci 4 M hydroxidem sodným, se spojené roztoky smísí s 5 g octanu měďnatého (1,2 ekvivalentu bleomycinu), vytvoří se komplex mědi s požadovaným produktem.

Odsolení se provede vlitím měďnatého komplexu na kolonu o objemu 7 litrů plněnou adsorptivní pryskyřicí Diaion® HP 40 (výrobce Mitsubishi Chemical Co.) ve vodě. Požadovaný produkt se na koloně adsorbuje. Sůl se vymyje 14 litry destilované vody.

Eluce se provádí směsí 1/50 N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a methanolu (1:4 obj./obj.). Frakce s absorpčním maximem kolem vlnové délky 290 nm se shromáždí. Spojené frakce se neutralizují

Dowexem^R 44 (OH typ, výrobce Dow Chemical Co.) a pak se zahustí za sníženého tlaku.

Získaný koncentrát se vlije na kolonu o objemu 3 litrů plněnou CM Sephadexem C-25 (Na⁺ typ, výrobce Pharmacia Fine Chemicals Co.), předtím uvedeného do rovnovážného stavu roztokem 1/20 M kyseliny octové a octanu sodného (pufr o pH 4,5), požadovaný produkt se adsorbuje.

Eluce se provádí metodou lineárního koncentračního gradientu, při které se přidává k tlumivému roztoku postupně chlorid sodný až do zvýšení koncentrace sodíku na 1,0 M. Modré frakce, které se eluují při koncentraci sodíku asi 0,6 M se shromáždí a spojí. Spojené frakce se odsolí pomocí Diaionu^R HP 40 výše popsáním způsobem a pak se lyofilizují. Získá se 21,7 g modrého amorfního prášku měď obsahující formy deamidobleomycinu APMP. Výtěžek činí 66 %.

Modrý prášek vykazuje absorpční maxima (E 1%/1 cm) při 241 nm (127) a 292 nm (104), měřeno v destilované vodě.

Prášek vykazuje absorpce v infračerveném světle (cm⁻¹) měřeno metodou KBr-tablety při 3 350, 1 725, 1 650, 1 560, 1 460, 1 380, 1 200, 1 140, 1 100, 1 060, 1 020, 990, 880 a 770.

Další fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 5.

Stupeň B

Ve 100 ml dimethylformamidu se rozpustí 5 g mědi obsahující formy deamidobleomycinu APMP získaného ve stupni A a 8,3 g (10 ekvivalentů vzhledem k bleomycinu) hydrochloridu 3-([S/-1'-fenylethylamino]-propylaminu (dále označován jako PEP-amin-hydrochlorid).

K výslednému roztoku se po ochlazení na 0 °C za míchání přidá 13,4 g (30 ekvivalentů vztaheno na mol bleomycinu) 1-hydroxybenzotriazolu a 3,63 ml N-methylmorpholinu a pak 6,8 g (10 ekvivalentů na mol bleomycinu) dicyklohexylkarbodiimidu. Směs se pak nechá reagovat při teplotě místnosti za míchání 6 hodin.

K reakční směsi se přidá desetinasobný roztok acetonu. Požadovaný produkt se vy-

srazí. Po promytí acetonem se sraženina rozpustí v destilované vodě. Roztok se vlije na kolonu objemu 500 ml naplněnou CM Sephadexem C-25 (Na⁺ typ, výrobce Pharmacia Fine Chemicals Co.), předtím uvedeným do rovnovážného stavu pufrovací roztokem 1/20 M kyseliny octové — octanu sodného o pH 4,5.

Produkt se adsorbuje. Eluce se provádí metodou lineárního koncentračního gradientu, při které se k roztoku pufru přidává chlorid sodný do dosažení koncentrace sodíku na 1,0 M. Modré frakce eluované při koncentraci sodíku asi 0,7 M se shromáždí a spojí.

Spojené frakce se odsolí pomocí Diaionu^R HP-40 (500 ml) výše popsáním způsobem a pak se lyofilizují. Získá se 3,3 g měď obsahující formy 3-(N-methylaminopropyl)-aminopropyl/amido/N-[3-([S/-1'-fenylethylamino]propyl)]bleomycinu (dále označován jako dAPMP-PEP) ve formě modrého amorfního prášku.

Výtěžek činí 66 %. Tento produkt vykazuje UV absorpční maxima (E 1%/1 cm) při měření v destilované vodě při 241 nm (108) a 292 nm (87). Produkt vykazuje IR absorpční maxima (vlnová délka, cm⁻¹) při měření metodou KBr-tablety při 3 350, 1 725, 1 645, 1 560, 1 460, 1 380, 1 250, 1 140, 1 100, 1 060, 1 015, 990, 880, 765 a 700.

Další fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 5.

Ve výše uvedeném stupni B se nahradí PEP-amin-hydrochlorid a N-methylmorpholin n-oktylamínem, čímž se získá 3-(N-methylaminopropyl)aminopropylamino-/amido/N-(n-oktyl)-bleomycin (dále označován jako dAPMP-OCT).

Tento produkt vykazuje UV absorpční maxima (E 1%/1 cm) při měření v destilované vodě při 241 nm (118) a 292 nm (95).

Produkt vykazuje IR absorpční maxima (vlnová délka cm⁻¹) při měření metodou KBr-tablety při 3 350, 2 940, 1 720, 1 640, 1 555, 1 460, 1 370, 1 250, 1 115, 1 100, 1 060, 1 010, 995, 930, 880 a 760.

Další fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5

Připravená sloučenina	Chromatografie na tenké vrstvě ^{x1} formy obsahující měď, Rf	Elektroforéza ^{x2} formy obsahující měď, Rm (Rm alaninu 1,0)
deamidobleomycin APMP	0,28	0,93
dAPMP-PEP	0,23	1,17
dAPMP-OCT	0,37	1,00

^{x1} Silica Gel 60 F 254 Silanized^R (Merck Co.), měřeno ve směsi methanol — 6% octan amonný (60 : 40 obj./obj.);

^{x2} Avicel SF^R (FMC Co.), kyselina mravenčí — kyselina octová — voda (27 : 75 : 900 obj./obj.), 800 V, 15 minut.

Jestliže se ve stupni B nahradí PEP-aminohydrochlorid 3-[di-n-butylamino]propylaminem nebo N-[3-[N-methyl-N-(3/2-*p*-chlorfenyl)ethylamino]propyl]aminem, získá se odpovídající derivát deamidobloomycinu APMP.

Stupeň C

Jeden gram měď obsahující formy dAPMP-PEP získané ve stupni B se rozpustí ve 100 mililitrech methanolu. Přidá se 700 mg (asi 4 ekvivalenty vzhledem k bleomycinu) m,p-dibenzylloxymbenzaldehydu.

Pak se přidá 46 mg (asi 1,3 ekvivalentu bleomycinu) kyanoborohydridu. Směs se nechá reagovat při 40 °C 48 hodin. Reakční směs se pak vlije na kolonu objemu 100 ml plněnou CM-Toyopearl[®] 650 (Na⁺ typ, výrobce TOYO SODA MFG) předem promytou methanolem.

Požadovaný produkt se adsorbuje. Kolona se promyje 200 ml methanolu. Eluce se provede metodou lineárního koncentračního gradientu, při které se přidává postupně 500 ml roztoku methanol-voda (7:3), který obsahuje 0,2 M chloridu sodného k 500 milimetrům roztoku methanol-voda (7:3).

130 ml modrých frakcí, které se eluují při koncentraci soli asi 0,12 M, se vlije na kolonu objemu 160 ml plněnou Amberlitem^R XAD-2 za účelem adsorpce. Eluce se provádí metodou lineárního koncentračního gradientu, při které se přidává postupně 1 litr methanolu k 1 litru 0,05 M tlumivého roztoku kyselina octová—octan sodný o pH 4,5 za lineárního růstu koncentrace methanolu.

Modré frakce, které se eluují při koncentraci methanolu asi 90 %, se vlijí na kolonu objemu 100 ml plněnou Amberlitem[®] XAD-2. Požadovaný produkt se adsorbuje. Po promytí 200 ml vody se eluce provede směsí 1/50 N kyseliny chlorovodíkové a methanolu {1 : 4 obj./obj.}.

Modré frakce se shromáždí, spojí, neutra-

lizují Dowexem[®] 44 (OH typ, výrobce Dow Chemical Co.) a zahustí do sucha. Získá se 670 mg modrého prášku. Tento prášek se rozpustí v 50 ml vody. Roztok se vlije na kolonu objemu 100 ml naplněnou Amberlitem[®] XAD-2.

Požadovaný produkt se adsorbuje. Kolena se promyje 300 ml 5% roztoku (vodného) EDTA.2Na, 100 ml 2% vodného roztoku chloridu sodného a 200 ml vody v uvedeném pořadí. Pak se provede eluce směsí 1/50 N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a methanolu (1 : 4 obj./obj.).

Frakce vykazuje absorpční maximum při vlnové délce kolem 290 nm. Jejich pH se upraví na hodnotu 6,0 použitím Dowexu^R 44 (OH typ) a lyofilizují se. Získá se 640 mg mědi prosté formy hydrochloridu dDD-PEP jako bílého amorfního prášku. Výtěžek činí 64 %.

Tento produkt vykazuje absorpční maxima (UV) ($E 1\%/1\text{ cm}$) při měření v destilované vodě při 285 nm (74,4). Produkt vykazuje IR absorpční maxima (vlnová délka cm^{-1}) při měření metodou KBr-tablety při 3 400, 2 900, 1 710, 1 650, 1 545, 1 505, 1 450, 1 380, 1 260, 1 135, 1 060, 1 010, 800, 730 a 690.

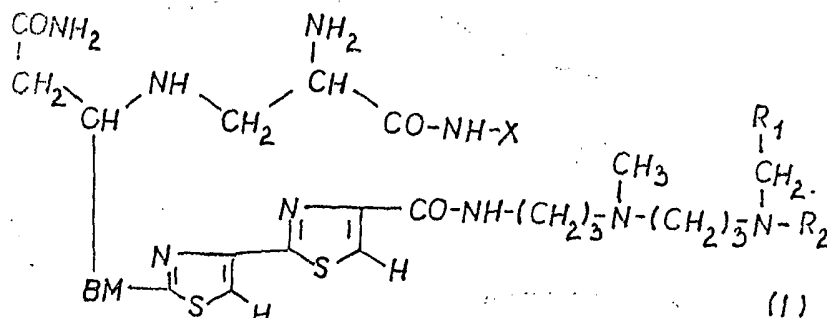
Další fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 1.

Jestliže se ve stupni C použije jako výchozí bleomycin dAPMP-OCT a provede se výše uvedený postup, získá se dDD-OCT.

Jestliže se ve stupni C1/ jako výchozí látka použijí deriváty deamidobleomycinu APMP získané ve stupni B odpovídající požadovaným produktům, 2/ použijí se látky jako jsou aldehyd, cyklooktylaldehyd, p-chlorbenzaldehyd a p-kyanobenzaldehyd odpovídající požadovaným produktům, 3/ tyto aldehydy se použijí v množství 1,2 mol na 1 mol deamidobleomycinového APMP derivátu, 4/ a reakce se provede výše popsáním způsobem, získají se produkty uvedené v tabulce 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby nových (amido)N-substituovaných bleomycinů obecného vzorce I



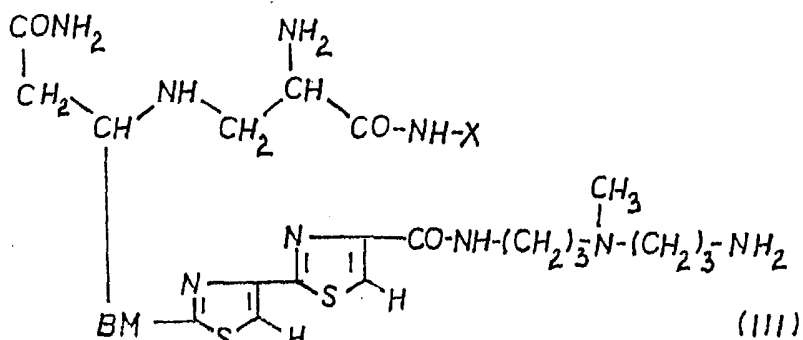
kde

R₁ má výše uvedený význam

kde

BM znamená zbytek bleomycinového skeletu,

X znamená alkylovou skupinu se 6 až 10 atomy uhlíku nebo alkylovou skupinu se 2 až 6 atomy uhlíku substituovanou mono- nebo di(C₁-C₅)alkylaminovou skupinou, fenylethylaminovou skupinou nebo N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethyl)aminopropyl]aminovou skupinou,



kde

BM a X mají výše uvedený význam, nechá reduktivně kondenzovat s aldehydem obecného vzorce IV



kde

R₁ má výše uvedený význam a popřípadě se získaná sloučenina přivede na jinou sloučeninu obecného vzorce I, kde substituenty R₁ a R₂ mají jiný, výše uvedený význam.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použijí odpovídajícím způsobem substituované výchozí látky za vzniku sloučenin obecného vzorce I, kde X znamená oktyl, fenylethylaminopropyl, N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethyl)aminopropyl]aminopropyl nebo dibutylaminopropyl.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije odpovídajícím způsobem substituovaných výchozích látek za vzniku sloučenin obecného vzorce I, kde X znamená oktyl, fenylethylaminopropyl, N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethyl)aminopropyl]aminopropyl nebo dibutylaminopropyl, jako aldehyd se použije cyklooktylaldehyd, halogenfenylacetaldehyd nebo dibenzylxybenzaldehyd, a R₁ znamená cyklooktylmethyl, halogenfenylethyl nebo dibenzylxyfenylmethyl.

4. Způsob podle bodu 1, pro výrobu 3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethyl)amino]-

R₁ znamená cykloalkylovou skupinu s až 13 atomy uhlíku, alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku mající fenylový substituent, který může být substituován atomy halogenu, nebo fenylovou skupinu, která může být substituována alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující atomy halogenu, kyanoskupinu a benzyloxyskupinu, a

R₂ znamená atom vodíku, benzylovou skupinu nebo dibenzylxybenzylovou skupinu, vyznačující se tím, že se [amido]N-substituovaný derivát 3-(N-methyl-N-/3-aminopropyl/amino)propylaminobleomycinu obecného vzorce III

no)propyl]amino}propylamino-(amido)-N-[3-(/S/-1'-fenylethylamino)propyl]-bleomycinu, 3-[N-methyl-N-[3-(p-kyanobenzylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-(/S/-1'-fenylethylamino)propyl]-bleomycinu nebo 3-[N-methyl-N-[3-(cyklooktylmethylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-(/S/-1'-fenylethylamino)propyl]-bleomycinu, vyznačující se tím, že se 3-(N-methylaminopropylamino)propyl-(amido)-N-[3-(/S/-1'-fenylethylamino)propyl]-bleomycin nechá reduktivně kondenzovat s p-chlorbenzaldehydem, p-kyanobenzaldehydem nebo cyklooktylaldehydem.

5. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 3-[N-methyl-N-[3-(cyklooktylmethylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[oktyl]-bleomycinu, 3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenylethylamino/propyl)amino}propyl]amino-(amido)N-[oktyl]-bleomycinu, 3-[N-methyl-N-[3-(p-kyanobenzylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[oktyl]-bleomycinu nebo 3-[N-methyl-N-[3-bis(m,p-dibenzylxybenzyl)aminopropyl]amino}propylamino-(amido)N-[n-oktyl]-bleomycinu, vyznačující se tím, že se 3-(N-methylamino)propyl)-aminopropylamino-(amido)N-[n-oktyl]-bleomycin nechá reduktivně kondenzovat s cyklooktylaldehydem, p-chlorfenylacetaldehydem, p-kyanofenylbenzaldehydem nebo m,p-dibenzylxybenzaldehydem.

6. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethylamino)-propyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-

-(di-n-butylamino)propyl-bleomycinu nebo 3-[N-methyl-N-[3-(p-kyanobenzylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-bleomycinu, vyznačující se tím, že se nechá reduktivně kondenzovat 3-(N-methylaminopropyl)amino-propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-bleomycin s p-chlorfenylacetaldehydem nebo p-kyanobenzaldehydem.

7. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethylamino)propyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-/N-methyl-N-[3-(2/p-chlorfenyl/ethylamino)-propyl]amino]propylbleomycinu, vyznačující

cí se tím, že se 3-(N-methylaminopropyl)aminopropylamino-(amido)N-[3-[N-methyl-N-[3-(2-/p-chlorfenyl/ethylamino)propyl]-amino]propyl]-bleomycin nechá reduktivně kondenzovat s p-chlorfenylacetaldehydem.

8. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 3-[N-methyl-N-[3-bis(m,p-dibenzylloxybenzyl)-aminopropyl]amino]propylamino-(amido)N-[n-oktyl]-bleomycinu, vyznačující se tím, že se 3-(N-methylaminopropyl)-aminopropylamino-(amido)N-[n-oktyl]-bleomycin nechá kondenzovat s m,p-dibenzylloxybenzaldehydem.