

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

219878  
(11) (B2)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 14 01 77  
(21) (PV 250-77)

(40) Zveřejněno 30 07 82

(45) Vydáno 15 09 85

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 H 23/00  
C 07 G 11/00

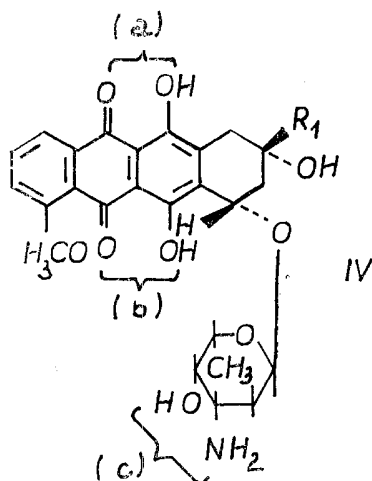
(72) (73)

Autor vynálezu GOSALVEZ MARIO dr., MADRID (Španělsko)  
a současně  
majitel patentu

## (54) Způsob výroby glykosidů

1

Vynález se týká způsobu výroby nových anthracyklinových glykosidů obecného vzorce IV



ve kterém

R<sub>1</sub> znamená skupinu

—COCH<sub>3</sub> nebo —COCH<sub>2</sub>OH,

a alespoň jeden z dvojvazebných ligandů (a), (b) a (c) je obsazen chelátovým kovovým kationtem zvoleným ze skupiny zahrnující Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> a Al<sup>3+</sup>.

2

Anthracyklinovými glykosidickými antibiotiky jsou sloučeniny, ve kterých tetrahydraftacenový chromofor je vázán na cukr, nejobvykleji na bazický cukr. Jako reprezentanty takových antibiotik lze jmenovat následující látky:

doxorubicin, deunorubicin, pyrromycin, rutilantin, cinerubin A, cinerubin B, ak-lavin, rhodomycin A, rhodomycin B, γ-rhodomycin 1, γ-rhodomycin 2, γ-rhodomycin 3, γ-rhodomycin 4, isorhodomycin A, retikulomycin A, doxorubiniol, retikulomycin B, isochinocyklin A, galirubin, mycetin, mycetin A, violacin, α-citromycin, γ-citromycin, 10-desoxyrhodomycin, β-isorhodomycin, γ-isorhodomycin, ε-isorhodomycin, minomycin, aqayamycin, ayamycin, nogalomycin.

Z těchto látek vzbudily široký zájem doxorubicin [americký patentový spis číslo 3 590 028], deunorubicin [britský patentový spis č. 1 033 383], jejich deriváty a jiné analogy jako onkolyticky působící látky, tj. látky použitelné k léčbě leukémie a k jiné chemoterapii rakoviny. Struktura doxorubicinu je zřejmá ze vzorce I na přiložené tabulce (vzorců), ve kterém znamená R<sub>1</sub> skupinu —COCH<sub>2</sub>OH a R vlastní daunosaminylovou část molekuly, znázorněnou jako vzorec II na přiložené tabulce vzorců. Jestliže místo

toho  $R_1$  znamená skupinu  $-\text{COCH}_3$ , vznikne strukutra daunorubicinu. Byly připraveny četné analogy těchto sloučenin, hlavně obměnami hydroxymethylketonového zbytku doxorubicinu, methylketonového zbytku daunorubicinu a aminoskupiny daunosaminového zbytku u obou sloučenin. Reprezentanty těchto analogů popisují například americký patentový spis č. 3 686 136, K. Yamamoto a spol. v J. Med. Chem. 15, 872 (1973), západooněmec. patentové spisy č. 2 327 211, 2 557 537, 1 920 198, E. Bachman a spol. v Agents and Actions 574, 383, P. Chandra v Cancer Chemother. Rep. 6, 115 (1975), F. Arcamon a spol. tamtéž na str. 123, a G. Zbinden a spol. v Cancer Chemother. Rep. 4, 707 (1975), na které se zde odkazuje. Rubidazon lze uvést jako jeden zvlášť zajímavý derivát, tj. sloučeninu vzorce I z připojené tabulky vzorců, ve kterém R má stejný význam jako ve vzorci II na připojené tabulce vzorců a  $R_1$  znamená skupinu  $-\text{CCH}_3\text{NNHCO}-\text{C}_6\text{H}_5$ . Dalšími jsou doxorubicinol a daunorubicinol.

Jeden z problémů, který stále provází použití těchto onkolytických anthracyklinových glykosidů, vyplývá z jejich všeobecně vysoké hematologické, gastrointestinální a kardiální toxicity, která omezuje jejich širší použití v dávkách odpovídajících účinné chemoterapii rakoviny. Jako zvlášť znepokojující se ukázala kardiotoxicita těchto látek. Vyznačená kardiotoxicita, často smrtelná, provází použití doxorubicinu v kumulativních dávkách převyšujících 500 mg/m<sup>2</sup>. Problém toxicity spojený s doxorubicinem nepochybně inspiroval četné pokusy o modifikaci této sloučeniny použitelným směrem, avšak nedávno (v roce 1975) byla jediná skupina badatelů nucena učinit závěr, že „sloučenina, ve které je kombinována význačná i širokospektrální protinádorová účinnost adriamycinu (doxorubicinu) s velmi nízkou srdeční toxicitou, nebyla zatím nalezena“. (G. Zbinden a spol., Cancer. Chemother. Rep. 59, 707).

Při zkoušení kardiotoxicity doxorubicinu bylo podle tohoto vynálezu shledáno, že je mohutným inhibitorem adenosintrifosfatázy, ovlivňující transport sodíku a draslíku srdeční membránou, a že je tudíž inhibitorem transportu draslíku. Rovněž bylo shledáno, že tato inhibice je blokována vápníkem, což naznačuje, že doxorubicin vytváří komplex s vápníkem. Kumulativní kardiotoxicita doxorubicinu by byla vysvětlena, kdyby komplex doxorubicinu s vápníkem vytvořený v krvi byl u adenosintrifosfatázy neúčinný, zatímco malý podíl volného glykosidu by byl v podstatě ireversibilně vázán na enzym. Autor tohoto vynálezu učinil závěr, že zcela nasycené monomerní deriváty anthracyklinových derivátů s kovy, například deriváty obsahující kationty kovu, jehož afinita k více vazebným ligandům glykosidu byla větší než vápníku, by nebyly kardiotoxické. Výsledná modifikace by mohla být součas-

ně nedostatečná k tomu, aby ovlivnila mechanismus onkolytické účinnosti látky, který může zahrnovat vmezezení do DNK nádorových buněk. Ať je mechanismus účinku jakýkoli, a autor tohoto vynálezu se nechce vázat na jakoukoli konkrétní teorii o účinku, připravil nyní deriváty anthracyklinových glykosidů s kovy, které, podržující si protirakovinový účinek výchozích sloučenin, zřejmě pozbývají podstatně jejich charakteristické kardiotoxicity. Jak zde bude uvedeno dále, nové sloučeniny přinášejí další významné výhody.

Někteří pracovníci popsali komplexy kovů s anthracyklinovými glykosidy. Například D. W. Yesair se spol. v A. A. C. R. Abstr., 285 (1974) se zmiňuje o tom, že adriamycin (doxorubicin) a daunomycin (daunorubicin) tvoří komplexy s  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a s dalšími kationty kovů. Tito pracovníci kombinovali  $\text{Cu}^{2+}$  s adriamycinem („A“) a daunomycinem („D“), přičemž pro posledně zmíněný uvádějí molární poměry  $\text{Cu}^{2+} : \text{D}$  (1 : 1) a činí závěr, že „ionty mědi chrání poněkud proti opožděné anthracyklinové toxicitě“. Další badatelé, kteří se pokoušeli později potvrdit tuto práci, shledali, že Yesairovou metodou se získává polymerní komplex 1 : 2 :  $\text{Cu}^{2+} : \text{D}$  (50 % kationtu kovu zůstává mimo komplex), avšak in vivo „dochází ihned k úplné disociaci komplexu“. [K. Mailer a spol., Biochem. Pharm. 25, 2085 (1976).] Tito badatelé dospěli k závěru, že účinky pozorované dříve in vivo „nemohou být způsobeny přítomností chelátové formy těchto látek“.

Výsledkem výzkumu tohoto problému je způsob výroby nových anthracyklinových glykosidů [obecného vzorce uvedeného v úvodu popisu tohoto vynálezu]. Jeho podstata spočívá v tom, že se uvádí do reakce jeden mol glykosidu, zvoleného ze skupiny zahrnující doxorubicin a daunorubicin, s alespoň jedním molem kovového kationtu zvoleného ze skupiny sestávající z  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ , načež se postupně zvyšuje pH vzniklé soustavy na hodnotu 6,5 až 7,5 za vzniku vzniklý roztok se bezprostředně oddělí od případných pevných vedlejších produktů s obsahem kovu a zpracováním roztoku ihned po oddělení se zastaví další reakce mezi glykosidem a kovovým kationtem.

Výhodně se jako kovového kationtu používá kationtu zvoleného ze skupiny zahrnující  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Co}^{2+}$ .

Při způsobu podle vynálezu se s výhodou postupuje tak, že se další reakce mezi glykosidem a kovovým kationtem zastaví zmrazením roztoku kapalným dusíkem.

Deriváty anthracyklinových glykosidů s kovem, připravené podle tohoto vynálezu, jsou v podstatě v monomerní formě (tj. jeden glykosid na jednu molekulu derivátu) a nežádoucí polymeraci, která může například zabránit vmezezení do DNK nádorových buněk, se v podstatě zabraňuje nový-

mi způsoby, které potlačují aktivní přítomnosti volného kovu. Současně směsí podle tohoto vynálezu výhodně obsahují více kationtů na jednu molekulu anthracyklinového glykosidu.

Způsob podle tohoto vynálezu se tedy týká způsobu slučování anthracyklinového glykosidu v roztoku, přičemž glykosid má alespoň jeden dvojjazebný ligand, a dvojmocného nebo trojmocného kationtu kovu, jehož afinita k ligandu je větší než u  $\text{Ca}^{2+}$ ; hodnota pH získaného systému se upravuje, aby se podpořila tvorba chelátu kovu s dvojjazebnými ligandy; výsledný roztok se oddělí od pevného vedlejšího produktu obsahujícího kov; získaný roztok se ihned zpracuje, aby se zabránilo další reakci mezi glykosidem a kationty kovu. Při izolaci může být rovněž odstraněno podstatné množství vedlejšího makromolekulárního polyglykosidického vedlejšího produktu. Nové sloučeniny připravené uvedeným způsobem se jeví v podstatě jako prosté kardiotoxicity, udržují si ještě onkolytickou účinnost vykazovanou výchozím glykosidem na bázi v podstatě srovnatelné (mg ku mg). Zavedení kovu do glykosidů mění spektra (viditelné, ultrafialové, infračervené a nukleárně-magnetické rezonanční spektrum) výchozích sloučenin, což dokazuje změnu v molekulární struktuře antibiotik, způsobenou parciální povahou kovalentní vazby, která je důsledkem interakce s kationty kovu. Kov také zřejmě snižuje katabolismus výchozí sloučeniny na toxické deriváty.

Deriváty kovů podle tohoto vynálezu mají ve srovnání s výchozími onkolytickými sloučeninami významně sníženou všeobecnou, gastrointestinální a hematologickou toxicitu. Zavedením kovu se mění elektronové vlastnosti výchozí sloučeniny a tak se zřejmě hluboce ovlivňují jejich permeabilní vlastnosti. Tak trojželezitý doxorubicin, který je výhodnou sloučeninou podle vynálezu, se jeví jako schopný pronikat hematocelulickou i intestinální bariérou, zatímco u samotného doxorubicinu toho není v účinné míře schopen. Lze očekávat, že se takové vlastnosti projeví i v dalších provedeních tohoto vynálezu, takže sloučenin podle vynálezu může být použito k léčbě neoplastických chorob mozku a v některých případech mohou být podávány orálně, například v potahované formě. Dodatkem ke všemu předchozímu se zdá, že zavedení kationtů kovu význačně snižuje imunosupresivní vlastnosti příslušné výchozí sloučeniny. Tak například ve srovnávacích testech doxorubicin snižoval významně hmotnost sleziny a imunkompetentních buněk, zatímco trojželezitý doxorubicin připravený podle vynálezu se ukázal mnohem méně imunosupresivním. Konečně, když se sloučeniny připravené podle tohoto vynálezu aplikují parenterálně, zřetelně se odstraní nekróza v sousedství místa aplikace, která provází příslušnou výchozí sloučeninu, například do-

xorubicin. Zdánlivě vyšší specifická onkolytických kovových derivátů podle tohoto vynálezu může být, jak je uvedeno výše, přisouzena změněným permeabilním vlastnostem. Ať je výhodnost mechanismu jakékoli, mělo by být zřejmé, že sloučeniny vyráběné podle tohoto vynálezu mají široké spektrum příznivých vlastností, které nemají příslušné výchozí sloučeniny.

O výhodných provedeních vynálezu může být snadno diskutováno s odkazem na vzorec III připojené tabulky vzorců, kde je znázorněna struktura některých anthracyklinových glykosidů, pokud jde o pochopení trimetalických anthracyklických glykosidů podle vynálezu. V popisovaném případě, jestliže znamená R atom vodíku a  $R_1$  skupinu  $-\text{COCH}_3$  nebo  $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$ , vznikají trimetalický daunorubicin a trimetalický doxorubicin. Jak bude odborníkům zřejmé,  $R_1$  může představovat různé deriváty a  $R_2$  může například obsahovat acylovou nebo jinou skupinu. V každém případě bude zřejmé, že dvojjazebné ligandy výchozí sloučeniny jsou ve výhodném případě všechny obsazeny kovem („Me“). Jestliže se při výrobě sloučeniny podle vynálezu použije menšího množství kovové reakční složky, než je v podstatě potřebné k nasycení všech dvojjazebných ligandů výchozího glykosidu, bude výhodné, že kationt může být různě distribuován mezi ligandy jednotlivých glykosidů vytvářejících směs. V takových případech se o ligandech aglykonu předpokládá, že mají převahu v kompetici pro kationt kovu. Při tvorbě sloučenin podle vynálezu se však nejvýhodněji dodává alespoň  $n$  molů kationtu kovu na 1 mol glykosidu, přičemž  $n$  je počet dvojjazebných ligandů v molekule glykosidu. Nicméně za níže popsaných opatření může být použito stechiometrického nadbytku kationtu kovu. V případě glykosidů se třemi dvojjazebnými ligandy v molekule výsledné směsi obsahují výhodně alespoň 2 moly kovu na 1 mol glykosidu. Nejvýhodnější poměr kovu ke glykosidu v tomto případě je asi 3:1. Ačkoli, jak bylo dříve prohlášeno, nechci být vázán teorií, je možné, že neobsazené dvojjazebné ligandy výchozích glykosidů působí jako místa vazby pro inhibici Na-K-adenosin trifosfatázy, takže je žádoucí věnovat pozornost tomu, aby bylo zajištěno jejich obsazení kovem.

V případě ilustrovaném na výkresu mají dvojjazebné ligandy anthracyklinonu (aglykonu) dikarbonylovou povahu. Odlišný ligand se objevuje ve zbytku daunosaminu, glykosylové hydroxylové skupiny. Samozřejmě jednotlivé anthracyklinové glykosidy, výhodně upotřebené podle tohoto vynálezu, mohou mít další druhy komplexotvorných ligandů. Rozmanité další dvojjazebné ligandy jsou popsány J. Kleinbergem v *Inorganic Chemistry* str. 218 až 220, D. C. Heath and Comp. Boston (1960), o čemž je zde pojednáno s odkazem na citaci.

Sloučeniny podle vynálezu se tvoří v roz-

toku, výhodně vodném, kombinací výchozího glykosidu a kationtu kovu dodávaného v některé vhodné formě, s výhodou ve formě soli. Užívá se takových kationtů, jejichž afinita k ligandu je větší než u  $\text{Ca}^{2+}$ , jak je stanoveno Hillovou metodou, například dvojmocných kationtů, jako  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Hg}^{2+}$ , a trojmocných kationtů, například  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ . Výhodné kationty zahrnují  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  jsou obzvláště výhodné. Výhodné reakční složky solí kovů zahrnují chloridy, sírany a dusičnany, ačkoli lze použít rovněž hydroxidů.

Obvykle, když se reagující složka kovu nejprve kombinuje ve vodném roztoku, má výsledný systém poměrně kyselou reakci. Protože rozpouštění reagující složky kovu je uskladněno při kyselém pH, dávám přednost nastavit nejdříve hodnotu pH na hodnotu blízkou neutralitě, aby došlo k deprotonaci dvojevazebných ligandů a podpořila se tvorba chelátů kationtů. Je žádoucí, aby reakční systém byl upraven v rozsahu hodnoty pH postačující k podpoře tvorby chelátů, s výhodou blízko neutrálnímu prostředí, například na hodnotu pH asi od 6,5 asi do 7,5, zvláště výhodně asi od 6,8 až do 7,2. Úprava hodnoty pH by měla být postupná, aby se snižovalo srážení pevné sloučeniny kovu, o jejíž přítomnosti se domnívám, že vede ke tvorbě neúčinných zbytků obsahujících polyglykosid.

Reakční teplota se řídí se zřetelem k rozpustnosti (spodní hranice) a teplotě degradace jednotlivého použitého anthracyklinu (horní hranice). Teplota se udržuje obvykle během upravování hodnoty pH v rozmezí asi od 15 až asi do 50 °C.

Po upravení hodnoty pH je žádoucí, aby se získané vcelku monomerní deriváty obsahující kov rychle oddělily od pevných vedlejších produktů obsahujících kovy, například filtrací. Většina glykosidických zbytků obsažených ve filtrátu je v monomerní formě. Jak bylo zjištěno technikou ultrafiltrace, je ve výhodných provedeních podle vynálezu více než asi 95 % a optimálně více než 99 % glykosidu obsaženého ve filtrátu v monomerní formě. Výsledný roztok, který stále obsahuje malé množství nekomplexovaných rozpustných kationtů kovů, se potom okamžitě zpracuje, aby se zabránilo další reakci kov–glykosid, která by mohla vést ke tvorbě neúčinných materiálů obsahujících polyglykosidy, o kterých se předpokládá, že mají složení dříve známých směsí, například takových popsaných výše Yesai-rem. Volný kov by mohl být absorbován například uhlíčitánem hořečnatým nebo odstraněn pomocí chromatografie. Zfiltrovaný roztok se zejména výhodně po případném dávkování jednoduše a rychle ztuhl rychlým zmrazením. Rychlým zmrazením zfiltrované reakční směsi se tak účinně blokuje další reakce sloučeniny glykosidu s kovem, ke které by jinak mohlo docházet. Po-

tom se produkt s výhodou lyofilizuje a uchovává při nízké vlhkosti, nejvýhodněji nižší než asi 1 %.

Lyofilizovaný materiál, který bude obvykle obsahovat větší podíl manitu nebo další přísady, by měl být užíván parenterálně, zásadně bezprostředně po provedené rekonstituci, například sterilní vodou do konečné koncentrace, například - ml/2,5 mg anthracyklinového glykosidu obsahujícího více kovu. Sloučeniny, jako například trojželezitý doxorubicin, mohou být podávány orálně, popřípadě v potahované formě.

Zatímco výhodný způsob výroby anthracyklinového glykosidu obsahujícího kov podle tohoto vynálezu je ten, který je uveden výše, tj. uvádění do reakce dříve připraveného anthracyklinového glykosidu, například doxorubicinu nebo daunorubicinu, s příslušnou reagující složkou soli kovu, je pochopitelné, že tvorbu chelátu je možné uskutečnit rovněž jako jeden z konečných stupňů syntetického postupu anthracyklinového glykosidu, aniž se ve skutečnosti izoluje volný anthracyklinový glykosid jako takový.

Dalšími možnými látkami využitelnými v tomto vynálezu jsou anthracyklinové glykosidy, jejichž glykosidický zbytek se liší od obvykle vázaných zbytků k danému anthracyklinonu (aglykonu), jak to probíhá u *Streptomyces* při tvorbě glykosidu. Takové anthracyklinové glykosidy se vyrábějí uváděním příslušného anthracyklinonu, například daunorubicinonu, do reakce s příslušným alkylačním činidlem, jako to popsal Penco v *Chim. Ind. (Milán)* 50, 908, (1968); C. A. 70, 1953; francouzský patentový spis č. 2 183 710. Vhodnými alkylačními činidly jsou 2,3,4,6-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glukopyranosylbromid; 3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-trifluoracetamido- $\alpha$ -D-glukopyranosylbromid; di-(N-trifluoracetyl- $\alpha$ -daunosamin).

Takovými reakcemi lze převádět aglykony zde jmenovaných anthracyklinových glykosidů v širokou paletu různých anthracyklinových glykosidů. Daunosaminové zbytky daunorubicinu a doxorubicinu lze nahradit například rhodosaminem nebo jinými bazickými cukry.

Cheláty kovu zde popisované mohou prokázat užitečnost rovněž při kontrole iontů stopových prvků, zejména s přihlédnutím k jejich schopnosti sloužit jako zdroje stopových kovů pro takové účely, jako je růst rostlin. Cheláty kovu  $\text{Fe}^{3+}$  by mohly mít zvláštní význam při využití k ošetření chlorosy železa nebo deficitu u rostlin. Množství použitého železitého chelátu by mělo být stanoveno pomocí obsahu dostupného železa v určité půdě, ve které rostliny rostou. Množství použitého železitého chelátu by mělo stačit k vyloučení chlorotických podmínek po dobu 1 až 2 týdnů. Sloučeniny by kromě toho mohly rovněž sloužit jako stabilizátory různých systémů, například plas-

tických hmot odvozených od vinylidenchloridu, kde stopy chloridu zvyšují nestálost plastické hmoty. V takových systémech by měl být chelát kovu použit v koncentracích postačujících k překonání účinků maximálního množství chloridu, který by mohl být uvolněn.

Účelem následujících příkladů je vynález objasnit, nikoli omezovat, protože na stejné bázi a s použitím podstaty tohoto vynálezu je možné mnoho dalších příkladů.

Biochemická a farmakologická studie produktů podle tohoto vynálezu

Níže, v tabulce I, jsou uvedeny disociační konstanty doxorubicinu a daunorubicinu s různými kovy. Kovy jsou uvedeny v pořadí

TABULKA I

| Kov              | Disociační konstanta derivátu doxorubicinu a daunorubicinu s kovem |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Fe <sup>3+</sup> | $5 \times 10^{-7}$ M                                               |
| Hg <sup>2+</sup> | —                                                                  |
| Cu <sup>2+</sup> | $1 \times 10^{-6}$ M                                               |
| Al <sup>3+</sup> | —                                                                  |
| Ni <sup>2+</sup> | —                                                                  |
| Pb <sup>2+</sup> | —                                                                  |
| Co <sup>2+</sup> | $1,3 \times 10^{-5}$ M                                             |
| Zn <sup>2+</sup> | —                                                                  |
| Fe <sup>2+</sup> | $3,5 \times 10^{-5}$ M                                             |
| Cd <sup>2+</sup> | —                                                                  |
| Mn <sup>2+</sup> | —                                                                  |

své obecné afinity k tvorbě chelátů. Pro některé z nich byla vymezena konstanta. Jak je uvedeno, trojmocné železo je kov s nejvyšší afinitou k doxorubicinu a daunorubicinu a vápník je kov s nejnižší afinitou. Disociační konstanta byla vypočtena Hillovou metodou, která využívá barevné změny během tvorby derivátů antibiotik s kovem. Uváděná disociační konstanta se týká v každém případě nejsilnější interakce ligand—kov. V dalším se odkaz na afinitu kovu k některému danému glykosidickému „ligandu“ v případě glykosidu s více ligandy týká toho, který představuje, jak je stanoveno Hillovou hodnotící metodou, nejsilnější interakci ligand—kov. V tabulkách „M“ znamená mol na litr.

Disociační konstanta derivátů doxorubicinu a daunorubicinu s kovem

| Kov              | Disociační konstanta derivátů doxorubicinu a daunorubicinu s kovem |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Ca <sup>2+</sup> | $12,7 \times 10^{-5}$ M                                            |
| Mg <sup>2+</sup> | —                                                                  |

Pokus z tabulky I ukazuje, že kovy s nejvyšší afinitou k doxorubicinu a daunorubicinu jsou Fe<sup>3+</sup> a Cu<sup>2+</sup> a že Co<sup>2+</sup> a Ca<sup>2+</sup> mají nejnižší afinitu. Ostatní kovy musí mít vzhledem ke své poloze v tabulce intermedijní afinitu.

V tabulce II je vysvětlen vliv doxorubicinu, železitého doxorubicinu 2 : 1 a železitého doxorubicinu 3 : 1 na účinnost adenosintrifosfatázy, enzymu závislého na sodíku a draslíku, izolovaného z králíčího srdce.

TABULKA II

Procento účinnost adenosintrifosfatázy, závislé na sodíku a draslíku v přítomnosti vzrůstajících koncentrací anthracyklinů

| Látka                               | OM  | Koncentrace (%)     |                     |                    |                    |                    |
|-------------------------------------|-----|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                     |     | 10 <sup>-13</sup> M | 10 <sup>-11</sup> M | 10 <sup>-9</sup> M | 10 <sup>-7</sup> M | 10 <sup>-5</sup> M |
| doxorubicin                         | 100 | 65                  | 40                  | 25                 | 25                 | 25                 |
| Fe <sup>3+</sup> -doxorubicin 1 : 1 | 100 | 80                  | 60                  | 60                 | 60                 | 60                 |
| Fe <sup>2+</sup> -doxorubicin       | 100 | 100                 | 100                 | 100                | 100                | 100                |
| Fe <sup>2+</sup> -doxorubicin       | 100 | 100                 | 100                 | 100                | 100                | 100                |

Pokus z tabulky II ukazuje, že doxorubicin je význačným inhibitorem Na-K-adenosintrifosfatázy, které je patrně v úzkém vztahu ke kardiotoxicitě. Železité cheláty doxorubicinu v poměru 2 : 1 a 3 : 1 jsou proti enzymu zcela neúčinné, zatímco železitý derivát 1 : 1 doxorubicinu vykazuje parciální inhibiční účinky. Z těchto skutečností lze na základě výsledků z tabulky I odvodit, že kovový derivát doxorubicinu vytvořený s kovem v poměru 2 : 1 nebo vyšším postrádá inhibiční účinky proti Na-K-adenosintrifosfatáze, to znamená, že by neměl být kardiotoxický. Podobná práce ukázala, že rovněž

deriváty daunorubicinu s kovem neinhibují Na-K-adenosintrifosfatázu. Lze očekávat, že ostatní zde popisované cheláty se mohou chovat obdobně. Bylo například prokázáno, že následující analogy doxorubicinu inhibují Na-K-adenosintrifosfatázu. U jejich příslušných derivátů kovů, připravených dříve uvedeným způsobem popsaným pro doxorubicin, lze očekávat význačné snížení kardiotoxicity. Sloučeniny mají strukturu I a II uvedenou v tabulce vzorců, kde R má stejný význam jako ve vzorci III a R<sub>1</sub> má udaný význam.

TABULKA III

| Analoga    | R <sub>1</sub>                                                                                                                                                             | Koncentrace 50% inhibice<br>Na-K-adenosintrifosfatázy |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Rubidazon  | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NHCO---C}_6\text{H}_5 \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                                       | $10^{-11}$ M                                          |
| NSC-219977 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4\text{Cl} \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                           | $10^{-11}$ M                                          |
| NSC-221264 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4\text{OH} \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                           | $10^{-10}$ M                                          |
| NSC-227013 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4\text{---N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | $10^{-10}$ M                                          |
| NSC-219976 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3 \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                        | $10^{-9}$ M                                           |
| NSC-237638 | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---O---CH}_3 \end{array}$                                                                                             | $10^{-9}$ M                                           |
| NSC-236672 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4 \text{ pH} \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                         | $10^{-9}$ M                                           |
| NSC-234740 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---CH}_6\text{H}_4\text{O---(CH}_2\text{)}_2\text{---CH}_3 \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                           | $10^{-8}$ M                                           |
| NSC-233854 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4\text{---Li} \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                        | $10^{-7}$ M                                           |
| NSC-211391 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---(CH}_2\text{)}_3\text{---CH}_3 \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                    | $10^{-6}$ M                                           |
| NSC-221266 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4\text{---Cl} \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                        | $10^{-6}$ M                                           |
| NSC-237672 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4\text{---Cl} \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                        | $10^{-5}$ M                                           |
| NSC-216071 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_5 \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$                                                           | $10^{-5}$ M                                           |
| NSC-221265 | $\begin{array}{c} \text{---C=N---NH---CO---C}_6\text{H}_4\text{---NO}_2 \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$                                                      | $10^{-5}$ M                                           |

Tabulka IV objasňuje srovnání mezi doxorubicinem a Fe<sup>3+</sup>-doxorubicinem 2,5 : 1 při

působení na syntézu DNK v buňkách myši s leukémií 1210.

TABULKA IV

Procento inhibice syntézy DNK při stoupajících koncentracích anthracyklinu

| Látka                           | 0 $\mu$ M | 3 $\mu$ M | Koncentrace (%) |             | 10 $\mu$ M |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------------|-------------|------------|
|                                 |           |           | 5 $\mu$ M       | 7,5 $\mu$ M |            |
| doxorubicin                     | 0         | 60        | 68              | 75          | 90         |
| železitý doxorubicin<br>(2:5:1) | 0         | 50        | 70              | 80          | 90         |

Pokus z tabulky IV ukazuje, že železité deriváty vykazují stejný inhibiční efekt na syntézu DNK jako výchozí antibiotikum a tudíž, že protinádorová účinnost, která je založena na inhibici syntézy DNK, je u derivátu s kovem zachována.

V tabulce V se srovnává toxicita doxorubicinu a železitého doxorubicinu. Tento po-

kus byl prováděn se vzorky železitého doxorubicinu připraveného s různými poměry železa k antibiotiku, většími než 2:1, a každý vzorek vedl k podobným výsledkům.

Látky byly podávány pouze jednou intraperitoneální injekcí skupině 10 myší a po 8 dnech byl hodnocen počet přežívajících zvířat.

TABULKA V

Procento přežívajících myší po podání anthracyklinů

| Látka                | 10 mg/kg | 20 mg/kg | Dávky (%) |          | 50 mg/kg | 60 mg/kg |
|----------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|
|                      |          |          | 30 mg/kg  | 40 mg/kg |          |          |
| doxorubicin          | 100      | 60       | 0         | 0        | 0        | 0        |
| železitý doxorubicin | 100      | 100      | 100       | 70       | 40       | 30       |

Tento pokus ukazuje, že železitý doxorubicin je mnohem méně toxický než doxorubicin. Po grafickém znázornění dat z tabulky IV se vypočte, že průměrná smrtelná dávka použitého železitého doxorubicinu je 47 mg/kg.

Tabulka VI ukazuje terapeutickou účinnost železitého doxorubicinu u myší s leukémií P-338. V tomto pokuse byl použit žele-

zitý doxorubicin vyráběný s různými poměry kovu k antibiotiku, včetně poměru 2:1 a většího, a se všemi se dosáhlo podobných výsledků. Průměrné přežívání bylo hodnoceno ve skupině 10 myší inokulovaných 100 000 leukemických buněk a léčených první den po inokulaci stoupajícími dávkami doxorubicinu a železitého doxorubicinu.

TABULKA VI

Dny průměrného přežívání leukemických myší

| Látka                | 0 mg/kg | 4 mg/kg | Dávka (i. p. dny) |          | 24 mg/kg | 36 mg/kg |
|----------------------|---------|---------|-------------------|----------|----------|----------|
|                      |         |         | 8 mg/kg           | 12 mg/kg |          |          |
| doxorubicin          | 11      | 50      | 48                | 42       | 6        | 4        |
| železitý doxorubicin | 11      | 50      | 48                | 42       | 35       | 23       |

Pokus z tabulky VI dokazuje, že železitý doxorubicin má u leukemických myší terapeutický účinek ekvivalentní doxorubicinu, lze jej však užívat v důsledku nízké toxicity ve vyšších dávkách. Protože v důsledku limitující toxicity nelze u lidí dosáhnout s doxorubicinem optimální léčebné dávky, železitý doxorubicin představuje v důsledku své nízké toxicity zřetelný terapeutický pokrok.

V tabulce VII jsou objasněny elektrokar-

diografické změny následující bezprostředně po intravenózní injekci stoupajících dávek doxorubicinu a železitého doxorubicinu 3:1 králíkům.

Tento pokus ukazuje, že po železitém doxorubicinu nedochází k významným změnám elektrokardiogramu, zatímco po doxorubicinu dochází k intenzívním změnám, a to je dokladem chybějící kardiotoxicity železitého doxorubicinu.

TABULKA VII

Elektrokardiografické změny

| Látka                   | 5 mg/kg                | 10 mg/kg | Dávka<br>15 mg/kg     | 20 mg/kg                        | 30 mg/kg                                         |
|-------------------------|------------------------|----------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------|
| doxorubicin             | zvýšená<br>T-neg. vlna | T-vlna   | neg. T. široký<br>QRS | neg. T široký<br>QRS<br>Arytmie | neg. T široký<br>QRS<br>bradykardická<br>arytmie |
| železitý<br>doxorubicin |                        | žádná    | žádná                 | bez<br>významných<br>změn       | bez<br>významných<br>změn                        |

Tabulka VIII ukazuje viditelné a infračervené spektrální charakteristiky doxorubicinu a železitého doxorubicinu (3 : 1).

TABULKA VIII

Optická absorpce procenta transmitance při různých vlnových délkách (%)

| Vlnová<br>délka<br>cm <sup>-1</sup> | 1730 | 1620 | 1590 | 1585 | 1570 | 600   | 480   | 280   |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| doxo-<br>rubicin                    | 30   | 50   | 0    | 30   | 0    | 0     | 0,180 | 0,200 |
| železitý<br>doxo-<br>rubicin        | 10   | 23   | 20   | 0    | 37   | 0,080 | 0,100 | 0,360 |

Z tabulky VIII lze pozorovat, že komplexy ve srovnání s volnými sloučeninami vykazují při různých vlnových délkách různé absorpce a že mají rovněž různá absorpční maxima.

Tabulka IX ukazuje srovnání hematologické toxicity doxorubicinu a železitého doxorubicinu (3 : 1).

TABULKA IX

Hematologická toxicita anthracyklinových derivátů (počet leukocytů/mm<sup>3</sup>)

| Látka                | Dávka (mg/kg) | 0     | Den<br>7 |
|----------------------|---------------|-------|----------|
| doxorubicin          | 10            | 4,700 | 3,300    |
|                      | 20            | 4,700 | 2,400    |
| železitý doxorubicin | 10            | 4,700 | 5,100    |
|                      | 15            | 4,700 | 4,400    |
|                      | 20            | 4,700 | 4,400    |
|                      | 30            | 4,700 | 3,600    |
|                      | 40            | 4,700 | 3,800    |
|                      | 50            | 4,700 | 2,800    |
|                      | 60            | 4,700 | 1,800    |

Lze pozorovat, že po železitém doxorubicinu se až do koncentrací větších než 50 mg/kg nedosahuje hematologické toxicity pozorované po aplikaci 20 mg/kg doxorubicinu.

Biochemická a farmakologická studia uvedená v tabulkách I až IX závěrem ukazují, že doxorubicin daunorubicin tvoří chelátové deriváty se všemi kovy uvedenými v tabulce I, že tyto chelátové deriváty kovů vytvořené

trojmocným železem, mědí a kobaltem jsou obzvláště stálé; a že tyto chelátové deriváty kovů vzniklé z kovů a antibiotika v poměru 2 : 1 nebo větším jsou neúčinné proti Na-K-závislému enzymu adenosintrifosfátáze, méně toxické u myši a králíků a terapeuticky aktivní leukémie myši. Ačkoli většina pokusů, které byly demonstrovány, byla provedena s železitým doxorubicinem s různými poměry kovů k antibiotiku (2 : 1 nebo vět-

ším), výsledky s chelátovými deriváty kovů obou antibiotik s různými kovy v různých poměrech jsou podobné.

#### Příklad 1

Železitý doxorubicin (trojželezitý doxorubicin)

100 mikromolů doxorubicinu a 300 mikromolů chloridu železitého se smísí za stálého míchání ve vodném roztoku při teplotě místnosti v baňce opatřené registrujícím pH-metrem. Po styku železa s antibiotikem se začíná tvořit komplex a hodnota pH se nastaví pomalu koncentrovaným hydroxidem sodným na 7,3. Roztok se upraví vodou na koncentraci 1 mg doxorubicinu v 1 ml a při hodnotě pH 7,3 se přidá tris-hydroxymethylaminomethanový pufr do konečné koncentrace 12 mM. Roztok se poté rychle zfiltruje 0,22 mikronovým sterilním filtrem. Potom se roztok ihned přenesse do malé baňky, zmrazí tekutým dusíkem a lyofilizuje. Lyofilizovaný prášek se sterilně uzavírá do ampulek obsahujících 10 mg, které se rekonstituují bezprostředně před použitím pomocí 10 ml vody.

Podobně lze uvádět do reakce s chloridem železitým jiné anthracyklinové glykosidy za vzniku příslušných železitých chelátů.

#### Příklad 2

Železitý doxorubicin (3,5 : 1)

Používá se způsobu z příkladu 1, avšak za použití 350 mikromolů chloridu železitého a reakční teploty 42 °C.

#### Příklad 3

Železitý doxorubicin (2,5 : 1)

Používá se způsobu z příkladu 1, avšak za použití 250 mikromolů chloridu železitého a nastavení hodnoty pH na 6,9.

#### Příklad 4

Železitý doxorubicin (2 : 1)

Opakuje se způsob z příkladu 3 za použití 200 mikromolů chloridu železitého, čímž se získá derivát kovu v poměru 1 : 2.

#### Příklad 5

Železitý doxorubicin (1 : 1)

Používá se způsobu z příkladu 1, avšak za použití 100 mikromolů hydroxidu železitého.

#### Příklad 6

Měďnatý doxorubicin

Používá se způsob z příkladu 1, avšak za

použití síranu měďnatého namísto chloridu železitého.

#### Příklad 7

Kobaltnatý doxorubicin

Používá se způsobu z příkladu 1, avšak za použití chloridu kobaltnatého namísto chloridu železitého.

Z předchozího budou odborníkům jasné další možnosti, kterými lze získávat sloučeniny podle tohoto vynálezu. Například v některém z předchozích způsobů lze doxorubicin nahradit monochlorhydrátem daunorubicinu. Lze opět použít jiných polárních rozpouštědel než vody, například deriváty kovů mohou vznikat kombinací kationtu a glykosidu v alkoholu za současného míchání a s vyloučením vzduchu. Podobně může být použito četných reakčních složek obsahujících kov jiných, než je chlorid železitý. Například:

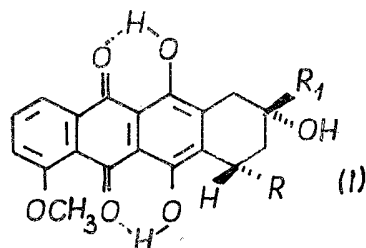
TABULKA X

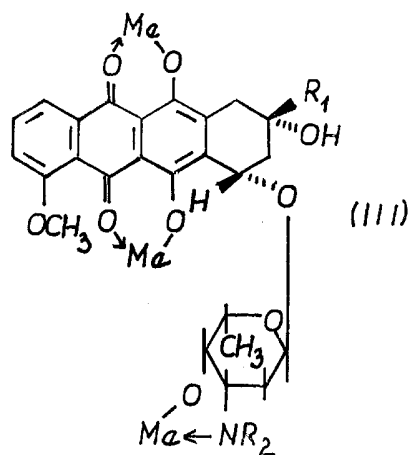
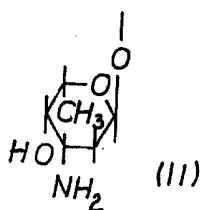
Zástupci solí obsahujících kov použitelných podle vynálezu

|                                                 |                                      |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------|
| FeSO <sub>4</sub>                               | HgCl <sub>2</sub>                    |
| CuSO <sub>4</sub>                               | ZnSO <sub>4</sub>                    |
| NiCl <sub>2</sub>                               | Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>    |
| CoCl <sub>2</sub>                               | Pd(OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
| Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>    |

Když se sloučenin podle vynálezu používá k léčbě rakoviny, podávají se v onkologicky účinných množstvích, obvykle v kombinaci s fyziologicky neškodným nosičem. Například trojželezitý doxorubicin a trojželezitý daunorubicin mohou být podávány pacientům trpícím neoplastickými chorobami v dávkách pohybujících se asi od 40 až asi do 250 mg/m<sup>2</sup> povrchu těla v intervalech mezi asi 1 až 3 týdny. Obvykle jsou tyto sloučeniny indikovány k použití u všech rakovin, u kterých se používá odpovídajících výchozích glykosidů, a u dalších druhů rakoviny, kde deriváty prokázaly účinnost díky svým novým vlastnostem permeability (například v mozku).

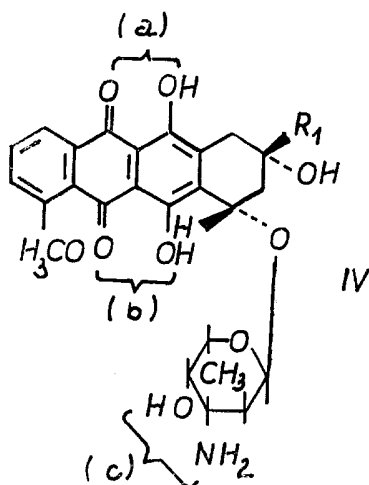
Tabulka vzorců





# PREDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby glykosidů obecného vzor-  
ce IV



ve kterém

R<sub>1</sub> znamená skupinu  
—COCH<sub>3</sub> nebo —COCH<sub>2</sub>OH  
a alespoň jeden z dvojbazných ligandů (a),

(b) a (c) je obsazen chelátovým kovovým kationtem zvoleným ze skupiny zahrnující Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> a Al<sup>3+</sup>, vyznačující se tím, že se uvádí do reakce jeden mol glykosidu, zvoleného ze skupiny zahrnující dextrorubicin a daunorubicin, s alespoň jedním molekulou kovového kationtu zvoleného ze skupiny zahrnující Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> a Al<sup>3+</sup>, načež se postupně zvyšuje pH vzniklé soustavy na hodnotu 6,5 až 7,5 za vzniku monomerních glykosidů s obsahem kovu, vzniklý roztok se bezprostředně oddělí od případných pevných vedlejších produktů s obsahem kovu a ihned po oddělení se zastaví další reakce mezi glykosidem a kovovým kationtem.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako kovového kationtu používá kationtu zvoleného ze skupiny zahrnující Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> a Co<sup>2+</sup>.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se další reakce mezi glykosidem a kovovým kationtem zastaví zmrazením roztoku kapalným dusíkem.