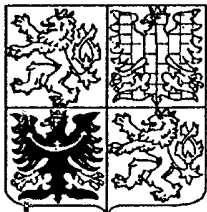


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 20.12.91
(32) 02.11.88
(31) 88/266460
(33) US
(40) 12.05.93

(21) 3973-91.B

(13) A3

(51) Int. Cl.⁵:

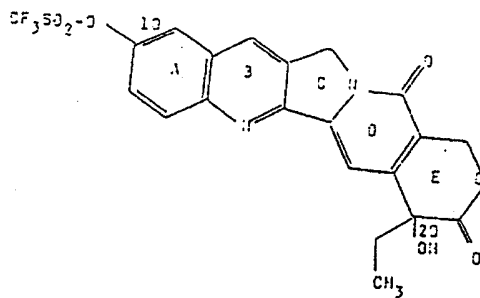
C 07 D 491/22

// A 61 K 31/47

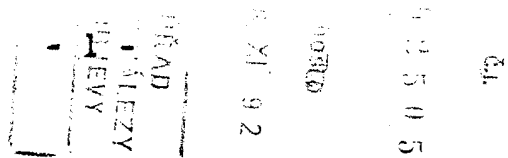
- (71) SmithKline Beecham Corporation, Philadelphia, Pennsylvania, US;
(72) Boehm Jeffrey C., King of Prussia, Pennsylvania, US;
Hecht Sidney M., Charlottesville, Pennsylvania, US;
Holden Kenneth G., Malvern, Pennsylvania, US;
Johnson Randall K., Ardmore, Pennsylvania, US;
Kingsbury William D., Wayne, Pennsylvania, US;

(54) Ve vodě rozpustné camptothecinové sloučeniny užitečné v inhibici růstu živočišných nádorových buněk

(57) Ve vodě rozpustné camptothecinové sloučeniny, farmaceutické prostředky s jejich obsahem a způsob inhibice růstu nádorových buněk citlivých na tyto látky u zvířat, která to potřebují. Popisuje se jejich struktura, jejich cytotoxicita, farmaceutické prostředky je obsahující a příkladech se uvádí výroba těchto látek.



(11)



Ve vodě rozpustné camptothecinové sloučeniny ~~užitečné~~
v inhibici růstu živočišných nádorových buněk

Oblast vynálezu

Vynález se vztahuje na ve vodě rozpustné camptothecinové sloučeniny, farmaceutické prostředky obsahující růst nádorových buněk inhibující množství takového analogu a způsob inhibice růstu nádorových buněk citlivých na takové analogy u zvířat, která to potřebují.

Dosavadní stav techniky

Struktura helixu DNA vyvolává v eukaryotických buňkách určité topologické problémy, které musí buněčný aparát vyřešit, má-li užít genetický materiál jako templát. Oddělení jednotlivých řetězců DNA je základem pro některé buněčné pochody, jako jsou replikace a transkripce DNA.

Vzhledem k tomu, že DNA je v eukaryotických buňkách organizována ve chromatinu chromosomálními bílkovinami, zakončení jsou sevřena a řetězce se nemohou rozvinout bez zásahu enzymů, měnících topologii. Již dlouho bylo uznáváno, že by postup transkripce a replikace podél helixu DNA byl usnadněn otočným bodem, který by snížil torsní napětí, vznikající při těchto pochodech. Topoisomerázy jsou enzymy, které jsou schopné vyvolat změny v topologii DNA eukaryotických buněk. Jsou rozhodující pro důležité buněčné funkce a buněčnou proliferaci.

V eukaryotických buňkách jsou dvě třídy topoisomeráz, typ I a typ II. Topoisomeráza I je monomerní enzym, molekulární hmotnosti přibližně 100 000. Enzym se váže na DNA a působí přechodné jednotlivé přerušení řetězce, rozvinutí dvojitého helixu, nebo možnost jeho rozvinutí, a následně znovuzavření tohoto přerušení před disociováním od řetězce DNA.

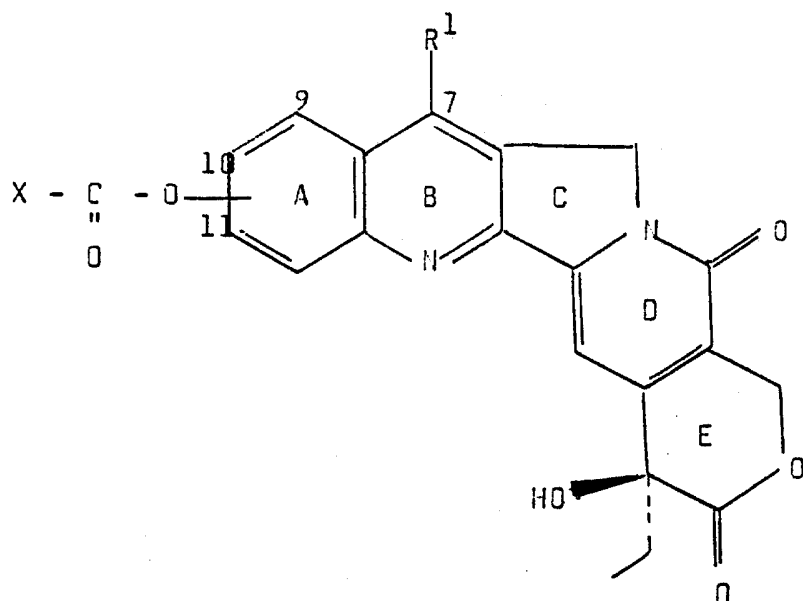
Topoisomeráza II je tvořena dvěma identickými podjednotkami molekulární hmotnosti 170 000. Topoisomeráza II přechodně přerušuje oba řetězce helixu, což umožní průchod druhého dvojitěno segmentu řetězce přes toto přerušování.

Camptothecin je ve vodě nerozpustný, cytotoxický alkaloid vytvářený stromy *Camptotheca accuminata*, domácí v Číně a *Nothapodytes foedita*, domácí v Indii. Camptothecin a několik jeho úzce příbuzných kongenerů jsou jedinou známou třídou sloučenin inhibujících topoisomerázu I.

Inhibice topoisomerázy II je hlavním cílem důležitých komerčních onkolytických látek, například etoposid, doxorubicin a mitoxantron, stejně jako dalších onkolytických činidel, která jsou ještě ve vývoji. Camptothecin (a jeho známé kongenery) nemají žádný účinek na topoisomerázu II a žádné známé inhibitory topoisomerázy II nemají signifikantní účinek na topoisomerázu I.

Camptothecin a jeho známé topoisomerázu I inhibující kongenery se neosvědčily jako atraktivní pro vývoj klinicky použitelných farmak užívaných jako cytolytická činidla pro nedostatek klinické účinnosti, nepřijatelnou toxicitu omezující dávky, napředvídatelnou toxicitu, slabou rozpustnost ve vodě a/nebo nepřijatelnou stabilitu při skladování. Proto existuje potřeba pro inhibiční činidla topoisomerázy I, která jsou prostá nežádoucích vlastností camptothecinu a jeho známých k topoisomeráze I vztažených inhibičních kongenerů. Sloučeniny tohoto vynálezu splňují tyto požadavky.

Miyasaka a další, U.S. patent č. 4 604 463 uveřejněný 5. srpna 1986 a přidělený Yakult Honsha K. K., popisuje camptothecinové deriváty obecného vzorce



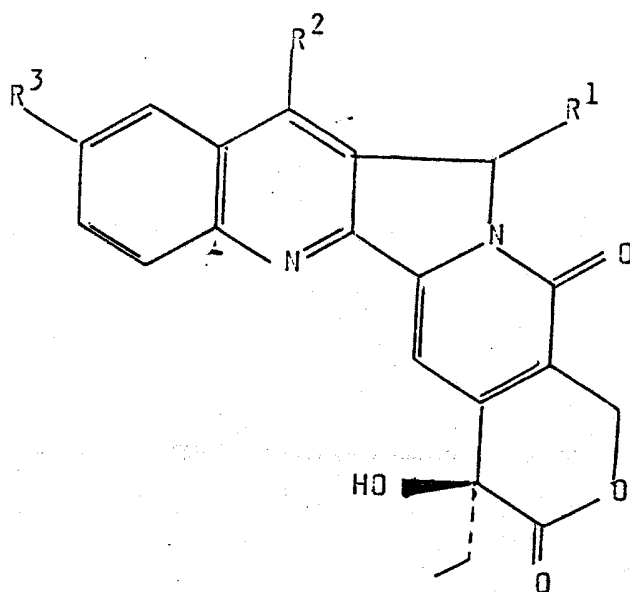
ve kterém

R^1 je atom vodíku, atom halogenu nebo alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku a

X je atom chloru nebo kde $-NR^2R^3$, ve které R^2 a R^3 jsou stejné nebo různé a každý znamená atom vodíku, substituovanou nebo nesubstituovanou skupinu vybranou ze skupiny tvořené cyklopentylem, cyklohexylem, N-methylpyridylem-(4), 2-pyrrolodylem, fenylem, tolylem, xylylem, pyridylem-2 a 2-methylpyridylem-(4) s výjimkou, že když oba R^2 a R^3 jsou substituované nebo nesubstituované alkylové skupiny, mohou být spolu spojeny s atomem dusíku, ke kterému jsou vázány, k vytvoření heterocyklického kruhu vybraného ze skupiny sestávající z pyrrolidinu, piperidinu, 2-oxopyrrolidinu, morfolinu, thiomorfolinu a 4- R^4 -piperidinových kruhů, ve kterých R^4 je atom vodíku, substituovaná nebo nesubstituovaná alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku nebo substituovaná nebo nesubstituovaná fenylová skupina a ve kterém seskupení $-O-CO-X$ je vázáno atomem umístěným v jakékoli 9-, 10- a 11-poloze v kruhu A, a jejich amonné soli nebo jejich soli alkaličkových kovů.

Miyasaka a další také konstatují, že takové camptothecinové deriváty jsou užitečné protinádorové léky, mající silný protinádorový účinek se sníženou toxicitou.

Miyasaka a další, US patent č. 4 473 692 uveřejněný 25. září 1984 a přidělený Yakult Honsha K. K., popisuje camptothecinové deriváty obecného vzorce



ve kterém

R^1 je atom vodíku, přímá nebo větvená alkylová skupina s 1 až 30 atomy uhlíku, alkoxy skupina s 1 až 30 atomy uhlíku nebo aryloxy skupina s 1 až 17 atomy uhlíku,

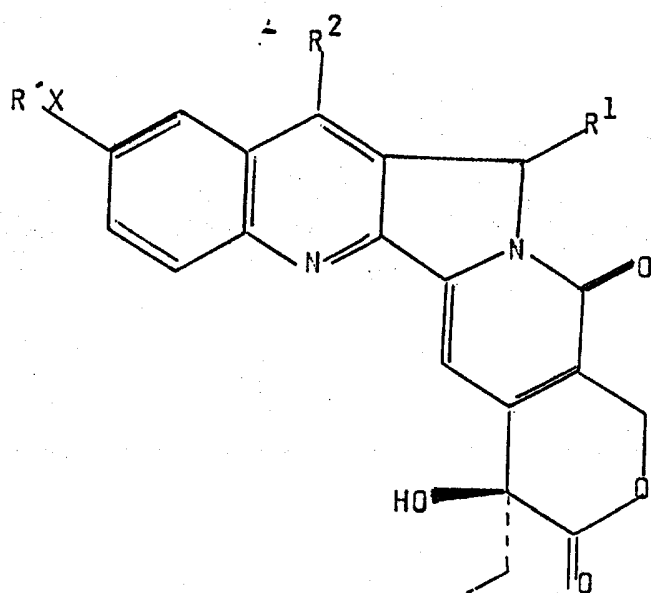
R^2 je atom vodíku, přímá nebo větvená alkylová skupina s 1 až 30 atomy uhlíku, cykloalkylová skupina s 5 až 8 atomy uhlíku, fenylalkylová skupina, naftylalkylová skupina, hydroxymethylová skupina, karboxymethylová skupina nebo aryloxymethylová skupina s 1 až 17 atomy uhlíku a

R^3 je XR' , kde R' je atom vodíku, přímá nebo větvená alkylová skupina s 1 až 30 atomy uhlíku nebo acylová skupina s 1 až 17 atomy uhlíku a

X je atom kyslíku nebo síry, nebo ve které R' je nitro-skupina, aminoskupina, alkylaminoskupina s 1 až 3 atomy uhlíku, acylaminoskupina s 1 až 17 atomy uhlíku nebo atom halogenu s výjimkou, že když oba R^1 a R^2 jsou atomy uhlíku, R^3 není hydroxy-, methoxy- nebo acetoxy-skupina.

Miyasaka rovněž uvádí, že svrchu uvedené camptothecinové deriváty mají značný protinádorový účinek s malou toxicitou.

Miyasaka a další, US patent č. 4 545 880 uveřejněný 8. října 1985 popisuje metodu výroby camptothecinových derivátů obecného vzorce

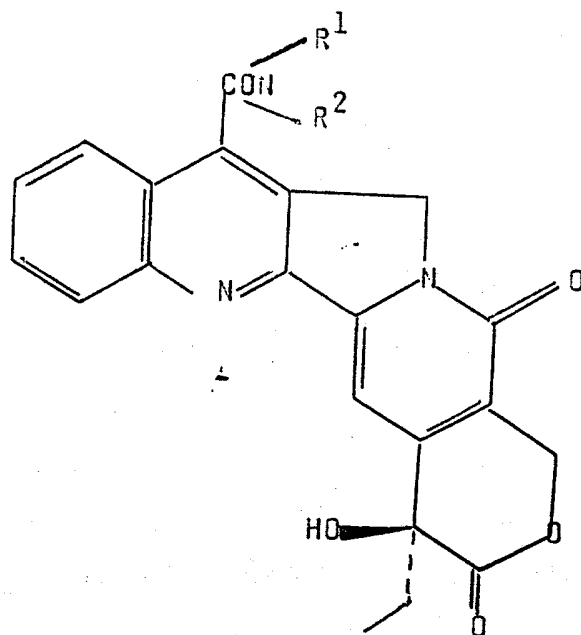


ve kterém

- R^1 znamená atom vodíku, alkylovou skupinu, hydroxylovou skupinu, alkoxyskupinu nebo acyloxyskupinu,
- R^2 znamená atom vodíku, alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, hydroxymethylovou skupinu, karboxymethylovou skupinu nebo acyloxymethylovou skupinu,
- R^3 znamená atom vodíku, alkylovou skupinu nebo acylovou skupinu a

X znamená atom kyslíku nebo síry.

Yakult Honska K. K., evropská patentová přihláška
publikační č. 0,038 642, A2, publikovaná 4. září 1983
popisuje camptothecinové deriváty obecného vzorce



ve kterém

R^1 a R^2 každý znamená atom vodíku, substituovanou nebo nesubstituovanou skupinu, substituovanou nebo nesubstituovanou aralkylovou skupinu nebo substituovanou nebo nesubstituovanou arylovou skupinu a R^1 a R^2 vzato dohromady s atomem dusíku, ke kterému jsou připojeny, mohou tvořit cyklickou skupinu.

Yakult Honsha K. K. uvádí, že takové sloučeniny jsou užitečné jako farmaceutické meziprodukty pro protinádorová činidla.

Wani a další, J. Med. Chem., 29, 2358 - 2363 (1986) popisují L-1210 myší leukemiové zkoušky protinádorové aktivity různých camptothecinových analogů včetně 9-nitro-20(S)-camptothecinu, 9-amino-20(S)-camptothecinu, 9-nitro-10-methoxy-20(S)-

-camptothecinu, 9-nitro-10-hydroxy-20(S)-camptothecinu s 9-acetamido-10-hydroxy-20(S)-camptothecinu.

Nitta a další, Proc. 14th International Congr. Chemo-therapy, Kyoto, 1985, Tokyo Univ. Tokyo Press, Anticancer Section 1, str. 28 až 30, popisuje, že sloučenina označená CPT-11 má profilovou účinnost v preklinických modelech tumorů. CPT-11 je ve vodě rozpustný camptothecinový analog s 4-(piperidino)-piperidinovým postranním řetězcem spojeným přes karbamátovou vazbu na C-10 10-hydroxy-7-ethylcamptothecinu.

Ačkoliv camptothecin je toxický pro močový měchýř a má nepředvídatelnou toxicitu na proliferující tkáň předem vy- lučující jako užití, 10-hydroxycamptothecin se zdá mít podle čínské literatury schopnost zadržovat aktivitu lidských so- lidních tumorů s mnohem více sníženou toxicitou. Viz Xu Bin a Yang Jin Long "Advances in Chinese Medicinal Materials Research", H. M. Chang a další, Eds., World Scientific Publ. Co., Singapore, 1985, str. 377, kteří diskutují výsledky fá- ze I a fáze II klinických zkoušek 10-hydroxycamptothecinu u 253 pacientů s několika typy lidských solidních nádorů.

Department of Maxillo facial surgery, 9th People's Hospital, Shanghai, Clin. J. Stomatology, 13, 75 (1978), dis- kutuje fázi II klinických zkoušek camptothecinu a 10-hydroxy- camptothecinu u několika typů lidských solidních nádorů.

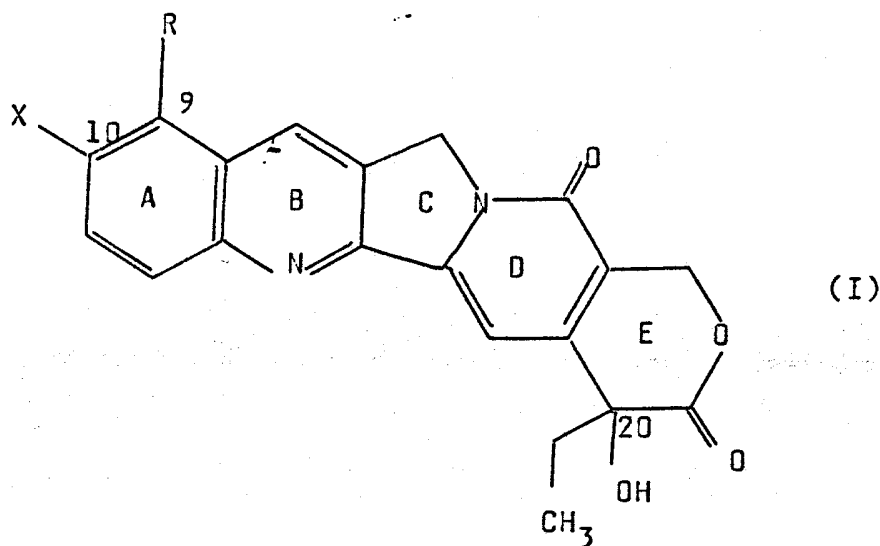
Wani a další, J. Med. Chem., 23, 554 (1980) popisuje syntesu různých syntetických analogů camptothecinu a 10- -hydroxycamptothecinu včetně analogu, kterým je diethylamino- ethylther na C-10.

Wani a další, J. Med. Chem. 30, 1774 (1987) popisuje syntesu různých 11-substituovaných camptothecinových analogů včetně kyano-, nitro-, amino-, dimethylamino, formylových aminomethylových a hydromethylových. Wani a další referují,

že mezi těmito analogy pouze 11-kyano, 11-nitro a 11-amino-camptothecinové analogy jsou účinné ve zkoušce protinádorové aktivity. Zřetelně 11-aminomethylový analog a jeho hydrochloridová sůl jsou popisovány jako neúčinné.

Podstata vynálezu

Vynález se týká sloučeniny obecného vzorce I



ve kterém

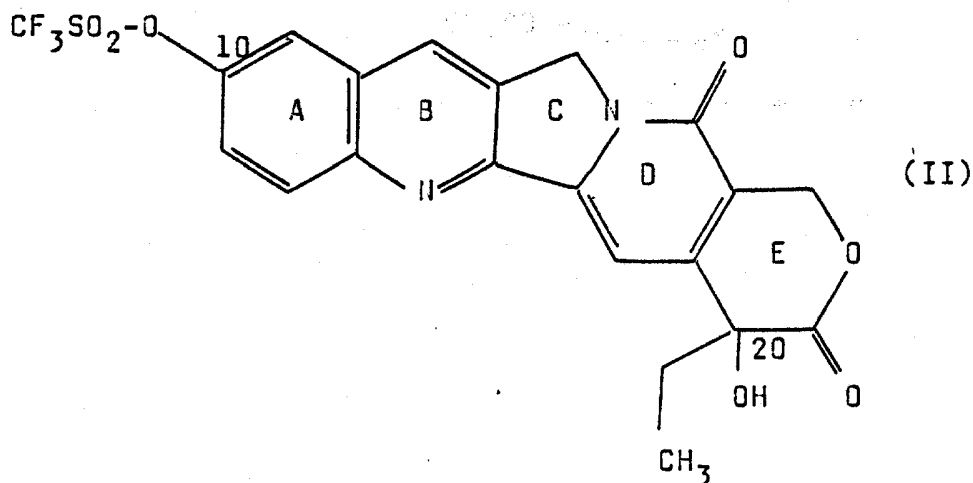
- X je hydroxyskupina, atom vodíku, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, nebo formylóvá skupina,
- R znamená atom vodíku v případě, že X znamená CH_2NH_2 nebo formyl, nebo znamená R skupinu $-\text{CHO}$ nebo CH_2R^1 v případě, že X znamená atom vodíku nebo hydroxyskupinu,
- R^1 znamená $-\text{O}-\text{R}^2$, $-\text{S}-\text{R}^2$, CH_2NH_2 , $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$ nebo $-\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$ za předpokladu, že v případě, že R^1 znamená skupinu $-\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$, je sloučenina spojena s farmaceuticky přijatelným aniontem,
- R^2 , R^3 a R^4 , stejné nebo různé, se volí ze skupiny atom vodíku, alkyl o 1 až 6 atomech uhlíku, hydroxyalkyl o 2 až 6 atomech uhlíku, dialkylaminoskupina o 1 až 6 atomech

uhlíku v každé alkylové části, dialkylaminoalkyl o 1 až 6 atomech uhlíku v každé alkylové části a o 2 až 6 atomech uhlíku v alkylové skupině, alkylaminoalkyl o 1 až 6 atomech uhlíku v jedné alkylové části a o 2 až 6 atomech uhlíku ve druhé alkylové části, aminoalkyl o 2 až 6 atomech uhlíku nebo nesubstituovaný nebo substituovaný uhlíkový kruh a 3 až 7 atomech v kruhu a v případě, že R^1 znamená skupinu $-N-R^2(R^3)(R^4)$, mohou skupiny

R^2 a R^3 společně s atomem dusíku, na nějž jsou vázány, tvořit heterocyklický kruh za předpokladu, že se tento kruh volí ze skupiny morfolinový, N-methylpiperazinylový nebo 4'-piperidinopiperidinylový kruh, přičemž tyto kruhy mohou obsahovat ještě další heteroatomy,

jakož i farmaceuticky přijatelných solí, hydrátů nebo solvátů těchto sloučenin.

Vynález se rovněž vztahuje na sloučeninu vzorce II



Sloučenina vzorce II je užitečná ve výrobě sloučenin vzorce I.

Pojmem "karbocyklický kruh" je míněn plně nasycený nebo plně nenasycený kruhový systém.

Výhodné sloučeniny vzorce I zahrnují takové, ve kterých, když X je hydroxyskupina, R je dimethylaminomethylová, N-morfolinomethylová, N-methylpiperazinylmethylová, (4'-piperidin)-N-piperidinylmethylová, (2'-hydroxyethyl)aminomethylová, trimethylamoniummethylová, cyklohexylaminomethylová, N-methylanilinomethylová, ethoxymethylová, cyklopropylaminomethylová, N,N-dimethylaminoethoxymethylová, N,N-dimethylaminoethylaminomethylová, kyanomethylová, aminoethylová nebo formylová skupina. Výhodné sloučeniny vzorce I rovněž zahrnují takové sloučeniny, ve kterých R je vodík, X je kyanoskupina, formylová nebo aminomethylová skupina. Nadto výhodnými sloučeninami vzorce I jsou takové, ve kterých X je vodík a R je dimethylaminomethylová nebo N-morfolinomethylová skupina. Zejména výhodné jsou sloučeniny vzorce I, kde R je dimethylaminomethylová skupina, zejména její S-isomerová forma.

Vynález se rovněž vztahuje na farmaceutické prostředky tvořené účinným množstvím, inhibujícím růst nádorových buněk, sloučeniny vzorce I a inertní farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo.

Vynález se rovněž vztahuje na způsob inhibice růstu nádorových buněk citlivých na sloučeninu vzorce I, která pozůstává z aplikování zvířatům včetně lidí, ovlivněných zmíněnými nádorovými buňkami, účinného, růst nádorových buněk inhibujícího množství takové sloučeniny.

Je známo, že v důsledku přítomnosti asymetrického atomu uhlíku v kruhu E sloučenin vzorce I, tj. uhlíkovému atomu číslo 20, budou existovat optické isomery. Výhodným isomerem je S-isomer, avšak R-isomer a racemická směs (racemát) jsou rovněž zahrnuty v rozsahu sloučenin vzorce I.

Odborníkům jsou dobře známé farmaceuticky přijatelné soli a jejich výroba. Výhodné farmaceuticky přijatelné soli

sloučenin vzorce I zahrnují acetát, methansulfonát a hydrochlorid, takový jako mono- a di-hydrochlorid, stejně jako soli alkalických kovů sloučenin vzorce I, takové jako sodíkové, ve kterých E-kruh laktonu byl podroben hydrolýze zásadou.

Odborníkům jsou dobře známé farmaceuticky přijatelné aniony kvarterních solí. Výhodné farmaceuticky přijatelné soli sloučenin vzorce I, ve kterých R^1 je $-N^+-R^2(R^3)(R^4)$ zahrnují methansulfonát a chlorid.

Sloučeniny vzorce I mohou vytvářet hydráty nebo solváty. Odborníkům je známo, že nabitě sloučeniny tvoří hydratované druhy, když jsou lyofilizovány s vodou, nebo tvoří solvované druhy, když jsou koncentrovány v roztoku s vhodným organickým rozpouštědlem.

Sloučenina vzorce II se může vyrobit způsobem vyloženým v příkladu 22.

Sloučeniny vzorce I se mohou vyrobit z 10-hydroxycamptothecinem cestou Mannichovy reakce. Kondenzace 10-hydroxycamptothecinu s formaldehydem a primárním nebo sekundárním aminem (Mannichova reakce) poskytne všechny sloučeniny vzorce I výjma sloučenin, ve kterých X je vodík, kyanoskupina nebo formylová skupina a R^1 je $-N-R^2(R^3)$ a R^2 a R^3 jsou stejné a jsou vodíky. Alternativně se 10-hydroxycamptothecin může formylovat (Duffova reakce), čímž vznikne 9-formyl-10-hydroxycamptothecin, který se může podrobit kondenzaci s aminy, následovanou chemickou redukcí s kyanoborohydridem sodným nebo katalytické redukcí (Pd/C , H_2), čímž vzniknou produkty analogické těm, jež jsou získány Mannichovou reakcí, stejně jako sloučeniny vzorce I, ve kterých R^1 je $-N^+-R^2(R^3)(R^4)$ a R^2 a R^3 jsou stejné a jsou vodíky. Sloučeniny vzorce I, ve kterých R^1 je $-N^+-R^2(R^3)(R^4)$ a R^2 , R^3 a R^4 nejsou vodíky se získají působením odpovídajících sloučenin vzorce I, ve kterých R^1 je $-N-R^2(R^3)$ s alkylačním činidlem. Mannichova reakce byla objevena Magarianem a dalšími, J. Pharm. Sci., 56, 987 (1967).

Duffova reakce byla popsána Duffem a dalšími, J. Chem. Soc., 547, 1941.

Sloučeniny vzorce I, kde R^1 je O - R^2 nebo S - R^2 se mohou vyrobit z 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin nebo jeho soli zahříváním s vhodným alkoholem nebo thiolem v inertním rozpouštědle, takovém jako dimethylformamid. Když se užije volné baze, přidá se malé množství silné kyseliny, takové jako kyselina chlorovodíková. Takové deriváty se také mohou vytvořit přímo v Mannichově reakci, když alkohol nebo thiol se zahrne v reakční směsi a přidá se silná kyselina, nebo aminová složka je solí silné kyseliny.

Sloučeniny vzorce $\hat{I}$, kde X je vodík, kyanoskupina, formylová nebo aminomethylová skupina se mohou vyrobit ze sloučeniny vzorce II paladiem katalyzovanou karbonylací. Paladium-katalyzovaná karbonylace aryltriflátů je popsána Cacchim a dalšími, Tetrahedron Letters, 27, 3931, 5541 (1986), Petrakisem a dalšími, J. Amer. Chem. Soc., 109, 2831 (1981) a Chataním a dalšími, J. Org. Chem., 51, 4714 (1986).

Výchozí materiál pro výrobu sloučenin vzorce I, to je 10-hydroxycamptothecin je přirozeným produktem nalézajícím se ve stejné rostlině jako camptothecin (viz Wani a další, J. Org. Chem., 34, 1364, 1969). 10-methoxycamptothecin byl také izolován ze stejné rostliny jako camptothecin a může se přeměnit na 10-hydroxycamptothecin zahříváním pod zpětným chladičem s bromovodíkem. Sám camptothecin se může také přeměnit na 10-hydroxycamptothecin redukcí pyridinového kruhu následovanou oxidací s octanem olovičitým $/(CH_3COO)_4Pb/$ (viz Yakult Honsha K. K., japonská patentová přihláška č. 9005188, vyplněná 30. černa 1982). Racemický 10-hydroxycamptothecin se rovněž může vyrobit metodou Waniho a dalších, J. Med. Chem., 23, 554 (1980). Bylo referováno o velkém počtu metod totální syntesy camptothecinu. Viz například Hutchinson, Tetrahedron, 37, 1047, 1981 a Suffness a Coldel, "The Alkaloids Chemistry and Pharmacology", Brossi A. a další, sv. 25, Academic Press, Orlando, Fla., 73,

(1935) pro přehled literatury. Nejpraktičtější cestou (dále označovaná jako Waniho cesta) pro výrobu camptothecinu, který je racemický na uhlíku v 20. poloze, je popsána Wanim a dalšími, J. Med. Chem., 23, 554 (1980).

Užitečnost sloučenin vzorce I:

a) cytotoxicita

Acetátová sůl sloučeniny vzorce I, ve které R je dimethylaminomethyl (S-isomer) (v dalším označená jako "sloučenina č. 1S") vykazuje silnou antiproliferativní účinnost v řadě kultivovaných buněčných liniích (tabulka 1). V serii osmi kultivovaných buněčných linií z nádorových buněk lidského kolon, byla sloučenina č. 1S dosti konsistentní ve své cytotoxické účinnosti. Za krátkou expozici (2 hodiny) farmaku, 50% inhibiční koncentrace se pohybovaly od 0,12 - 2,1 mikrogramů/ml. Jestliže farmakou bylo ponecháno v kultivačním mediu po plné sedmidenní období v průběhu, kterého buňky byly ponechány proliferovat, hodnoty IC_{50} byly v rozsahu od 3,9 do 75 ng/ml.

Rovněž byly vyhodnoceny na citlivost ke sloučenině č. 1S tři hlodavší nádorové buněčné linie a dvě "normální" hlodavčí buněčné linie.

Byly hodnoceny buněčné linie K12/Tr potkaního karcinomu kolon a potkaní ledviny a intestinálních epithelií ve stejném experimentu s použitím koncového bodu užívaného v pokusech s lidskými kolonovými nádorovými buňkami, CACO-2 a WiDR. Myší tumorové buněčné linie, L1210 leukemie a B16 melanom, nebyly více citlivé na sloučeninu č. 1S než nádorové buněčné linie lidského tlustého střeva. Ve skutečnosti B16 melanomová buněčná linie se zdála být značně méně citlivá než druhá testovaná linie. Zbytečně B16 a L1210 jsou obě dosti citlivé na sloučeninu č. 1S v in vivo terapeutických zkouškách u myší s těmito nádory.

Protokol užitý k hodnocení cytotoxicity sloučeniny č. 15 v buněčných liniích uvedených v tabulce 1 byl obecně následující:

Buněčné linie se užívají a přechovávají jako jedno-
vrstevné kultury v minimálním esenciálním mediu (Grand
Island Biological Co., Grand Island, N.Y.) doplněním 10%
fetálním telecím sérem v 5% CO₂ zvlhčováním inkubátoru při
37 °C. Různé koncentrace sloučeniny vzorce I za sterilních
podmínek se nechají reagovat po 2 hodiny, následované aspi-
rací media nebo se exponují kontinuálně. Desky se inkubují
po 7 dnů při 37 °C v CO₂ inkubátoru. Medium se aspiruje a
buňky se fixují a napustí ethanolem a Geismovým barvivem.
Populace přežívajících buněk se určí snímáním ploten pomocí
obrazového analyzátoru. Procento inhibice proliferace se ur-
čí relativně k buňkám inkubovaným v nepřítomnosti farmaka a
interpolací se určí 50% inhibiční koncentrace (IC₅₀).

T a b u l k a 1

Cytotoxicita sloučeniny č. 15 na nádorové buňky v kultuře

označení linie	IC ₅₀ (μg/ml)	
	2 hod exposice	kontinuální exposice
buněčné linie nádorů lidského kolon		
SW-620	0,12	0,0065
SKCO-1	0,23	0,0039
SW-948	0,26	0,016
DLD-1	0,44	0,015
LOVO	0,58	0,0097
HT-29	0,58	0,016
CACO-2	1,7	0,075
WIDR	2,1	0,025

Tabulka 1 - pokračování

označení linie	IC ₅₀ (μg/ml)	
	2 h bd exposice	kontinuální exposice
buněčné linie nádorů hlodavců		
L1210 leukemie	1,4	n.t.
K12/Tr karcinom kolon	3,9	0,084
B16 melanom	n.t. ^x	0,62
normální buněčné linie hlodavců		
NRK52E (potkaní ledviny epithe)	1,2	0,052
IEC-6 (intestinální epithe potkana)	3,9	0,017

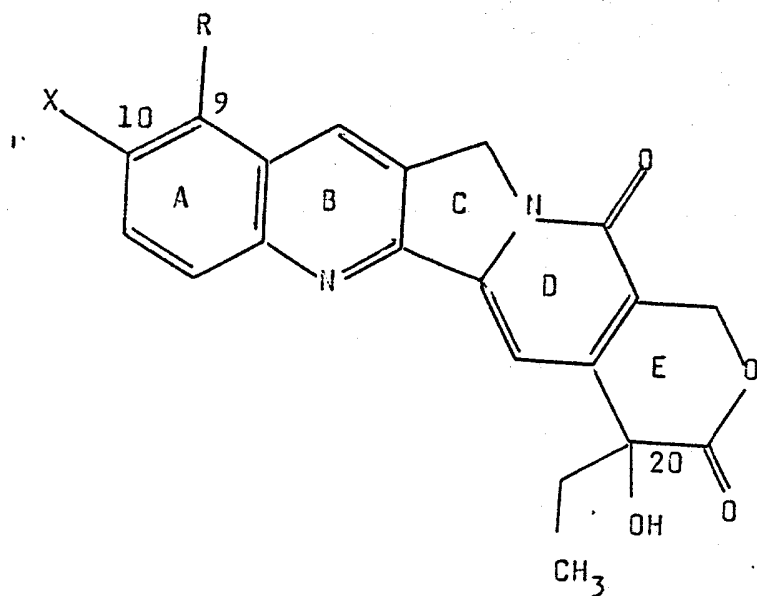
^x n.t. = netestováno

Řada sloučenin vzorce I byla hodnocena pro cytotoxicitu proti L1210 buněk leukemie rostoucích v suspensní kultuře (tabulka 2). Buňky byly exponovány kontinuálně po klonování do media obsahujícího 0,2 % Nobleho agaru. Po inkubaci při 37 °C s CO₂ inkubátoru po tři dny, kolonie byly napuštěny specifickým formazanovým barvivem pro životaschopné buňky a 24 hodin později byly spočteny počítačem kolonií (Biotran II, New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J.) upraveném k identifikaci kolonií o více než 50 buňkách. Koncentrace, které snižují účinnost klonování o 50 % (IC₅₀), byly určeny interpolací. Sloučeniny vzorce I mají hodnoty IC₅₀ od 12 do 690 nM, to je hodnoty IC₅₀, které judikují cytotoxický účinek. Příbuzný přirozený produkt, 10-hydroxy-comptothexin má IC₅₀

18 nM. Cytotoxické sloučeniny vzorce I jsou silnými inhibitory purifikované topoisomerázy I. Jak je stanoveno v následujícím oddílu vztaženém k aktivitě in vivo, řada sloučenin vzorce I ačkoliv je obecně méně cytotoxická než 10-hydroxycaptothecin, má protinádorový účinek proti L1210 leukemii in vivo, který je ekvivalentní nebo lepší než účinek 10-hydroxycamptothecinu. Například sloučenina č. 15 byla asi třikrát méně účinná než 10-hydroxycaptothecin s ohledem na cytotoxickou účinnost proti L1210 leukemických buněk in vitro, ale vykazovala in vivo růst nádorových buněk inhibiční aktivitu, která byla obecně lepší než 10-hydroxycamptothecin a řady transplantovatelných hlodavčích nádorových modelů.

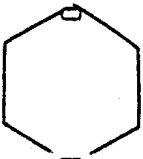
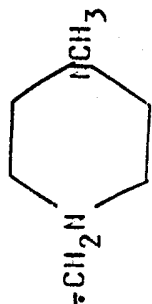
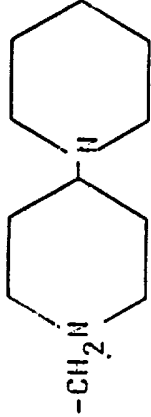
T a b u l k a 2

Aktivita sloučenin vzorce I proti L1210 leukemii in vitro a in vivo u myši nesoucích i.p.-implantované nádory

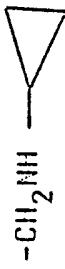
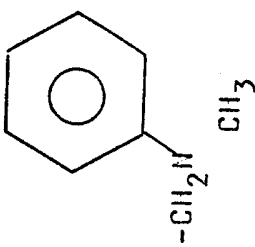
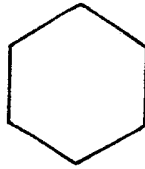


Tabulka 2

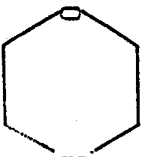
- 17 -

sloučenina	R	X	aktivita IC ₅₀ (nM)	protinádorová aktivita in vitro	
				MTD (mg/kg)	ILS (%)
10-hydroxy- camptothecin	-H	hydroxy	18	9	94
1S	-CH ₂ N(CH ₃) ₂ (acetát)	hydroxy	56	15	<200
2S	-CHO	hydroxy	260	42	75
3S	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	hydroxy	150	42	>200
4S	-CH ₂ HNHCH ₂ CH ₂ OH	hydroxy	250	42	75
5S		hydroxy	370	100	83
6S		hydroxy	72	75	>200
7S		hydroxy	270	>42 ^x	44

Tabulka 2 - pokračování

sloučenina	R	X	aktivita IC ₅₀ (nM)	protinádorová aktivita MID (mg/kg)	ILS (%)
8S	 -CH ₂ NH	hydroxy	130	25	131
9S	 -CH ₂ N CH ₃	hydroxy	69	42	112
10S	-CH ₂ OCH ₂ CH ₃	hydroxy	48	25	131
11S	 -CH ₂ NH-	hydroxy	56	25	> 200
12S	-CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	hydroxy	49	42 ^x	94
13S	-CH ₂ OCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	hydroxy	n.t. ^x	42	198
14S	-CH ₂ SCCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	hydroxy	12	42	112
15S	-CH ₂ N(CH ₃) ₂	hydrogen	65	15	88

Tabulka 2 _ pokračování

sloučenina	R	X	aktivita IC ₅₀	protinádorová aktivita MID ILS (%) (mg/kg)
16S	hydrogen	kyano	80	3 100
17S	-CH ₂ CN	hydroxy	400	12 > 200
18S		hydrogen	690	13 144
19S	hydrogen	-CHO	62	n.t.
20S	hydrogen	-CH ₂ NH ₂	90	92 112
21S	-CH ₂ H(CH ₃) ₂ (sodná sůl)	hydroxy	n.t.	54 > 200
22S	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	hydroxy	360	100 75

x n.t. = nebylo zkoušeno.

Pro studie in vivo L1210 buňky se implantují intraperitoneálně (i.p.) (10⁶ na myš) a farmaka se aplikují i.p. ve dnech 1. a 5. Vzestup v rozsahu života (ILS) byl založen na průměrné době přežití skupiny 6 myší léčených maximálně tolerovatelnou dávkou farmaka (MTD)

* Nejvyšší testovaná dávka (stupeň aktivity je pravděpodobně větší při vyšší dávkové hladině).

Pro in vitro studie buňky L1110 se nechají růst v suspenční kultuře a exponují se farmaky kontinuálně po klonování buněk do některého agaru. Stanoví se klonovací účinnost. Interpolací se stanoví 50% inhibiční koncentrace (IC_{50}).

Všechny svrchu uvedené sloučeniny byly účinnými inhibitory topoisomerázy I a purifikovány z rakovinných buněk lidského koton, 50% inhibiční aktivita enzymu byla pozorována v koncentracích $\leq 3 \mu M$.

b) Inhibice růstu nádorových buněk in vivo

Sloučeniny vzorce I se z počátku ohodnotí na in vivo protinádorovou aktivitu u myši nesoucích intraperitoneálně (i.p.) implantovanou L1210 leukemii (sloučeniny č. 1S a 4S - 13S v tabulce prodlouží rozsah života o $>40\%$ při jejich maximálně tolerovatelných dávkových hladinách). Tři sloučeniny č. 1S, 6S a 11S jsou zejména účinné, prodlužují rozsah života o $>200\%$ a vyvolávají dlouhodobá, beznádorová přežití. Řada sloučenin má aktivitu lepší než přirozený produkt, 10-hydroxycamptothecin, kterému jsou sloučeniny vzorce I strukturně příbuzné. Pro dvě ze sloučenin č. 7S a 13S, nejvyšší testovaná dávka nebyla toxická, tak tyto sloučeniny mohou mít větší aktivitu při vyšších dávkových hladinách. Přesto tyto sloučeniny byly aktivní při testovaných dávkových hladinách.

Založeno na jejím vysokém stupni aktivity a potence in vivo (tj. nízké maximálně tolerované dávce) sloučenina č. 1S byla ohodnocena v řadě transplantovaných myších nádorových modelech. Sloučenina č. 1S má vysoký stupeň aktivity ve své, maximální dávce v řadě zvířecích nádorových modelů, včetně leukemií a solidních nádorů různých histiotypů.

Spektrum aktivity sloučeniny č. 1S je shrnuto v tabulce 3. Vysoká hladina aktivity byla pozorována u většiny tumorových modelů, s tím, že pouze u jednoho z modelů i.p. karcinomu 26 holou byla pozorována téměř úplná refrakternost na farmakon. Také dva ze subkutánních s.c.) modelů karcinomu 26 holou a Madisonova plicního karcinomu se prokázaly jako poněkud refrakterní na farmakon, tj. v těchto modelech, skromná aktivita to je >70% inhibice růstu tumoru byla zřejmá, když byly léčeny myši nesoucí subkutánní nádory, sloučeninou č. 1S. U druhých s.c. nádorových modelů, byla prokázána vysoká aktivita (větší než 90% inhibice). Zřetelně sloučenina č. 1S aplikovaná i.p. vykazovala vysokou aktivitu nejen proti i.p. nádorovým modelům, ale u myši inokulovaných nádory intravenózně (i.v.) nebo subkutánně (s.c.). Léčivý účinek byl zřejmý u určitých nádorových modelů včetně i.p. a i.v. implantovaných P388 a L1210 leukemií a i.v. a s.c. implantovaného Lewisova karcinomu plic. Úroveň a spektrum aktivity sloučeniny č. 1S u zvířecích nádorových modelů je vhodně srovnatelná s nejvíce účinnými ze známých protinádorových farmak, takových jako cyklofosfamid, cisplatin a doxorubicin.

Výsledky těchto studií na transplantovaných myších nádorových modelech jsou shrnuty podrobněji v tabulce 4, která ukazuje prodloužení rozsahu života (ILS) nebo procentní inhibici měřitelného (tj. subkutánního) růstu pevných nádorů při optimálních dávkách a optimálních rozvrzích aplikace sloučeniny 1S. Také jsou v tabulce 4 ukázány výsledky získané ve srovnávacích studiích na těchto nádorových modelech s původními sloučeninami přirozeného produktu, camptothecinu a 10-hydroxycamptothecinu. Tyto výsledky byly dosaženy při i.p. nebo i.v. aplikaci sloučeniny č. 1S při intermitentním rozvrhu, tj. každý čtvrtý nebo sedmý den. V některých případech byly výsledky získány s optimálním dávkovým rozvrhem léčení, ve kterém sloučenina č. 1S byla aplikována v rozděleném dávkovém režimu (každé 3 hodiny krát 4) v každém dni léčení, jak je podrobněji popsáno níže. Camptothecin a 10-hydroxycamptothecin se vždy aplikují jako suspenze i.p. v důsledku je-

jich nerozpustnosti ve vodných vehikulech.

Z tabulky 4 je zřejmé, že všechny tři sloučeniny mají široké spektrum aktivity u zvířecích nádorových modelů. Lepší aktivita sloučeniny č. 1S je zřejmá v některých nádorových modelech včetně: i.p. L1210 leukemii, i.p. B16 melanomu, i.v. P388 leukemii, i.v. L1210 leukemii, s.c. Lewisově plicním karcinomu, s.c. B16 melanolu/podlinie F10, s.c. karcinom 51 kolon, a s.c. Madisonově plicním karcinomu. 10-hydroxycamptothecin je dosti účinný u i.p. implantovaných nádorových modelů, ale má nedostatečnou aktivitu u nádorových modelů, u kterých je nádor implantován v místě vzdáleném od místa aplikace farmaka, toto farmaka má při nejlepším maximální účinnost u s.c. implantovaných solidních nádorových modelů. To pravděpodobně není způsobeno slabou rozpustností 10-hydroxycamptothecinu, protože camptothecin je stejně nerozpustný, ale je značně účinný u určitých s.c. tumorových modelů. Je možné, že aromatická hydroxylová skupina 10-hydroxycamptothecinu je vnímavá na první průchod a biliární exkreci a tak sloučenina nedosahuje přiměřenou koncentraci v systémové cirkulaci. Pozoruhodně sloučenina č. 1S, která má také 10-hydroxylovou skupinu a je však vysoce aktivní u s.c. a i.v. nádorových modelů. To může být způsobeno přítomností basického postranního řetězce v 9. poloze sloučeniny č. 1S, který může inhibovat metabolismus 10-hydroxylové skupiny sterickou zábranou, vázáním vodíku nebo vytvořením interní soli. 10-hydroxycamptothecin je vysoce aktivní u i.p. karcinomu 26 kolon, který je necitlivý na sloučeninu č. 1S a minimálně citlivý na camptothecin. Avšak stejný tumor je refrakterní na 10-hydroxycamptothecin, když je implantován s.c. má ještě skromnou citlivost na sloučeninu č. 1S v tomto uspořádání.

Nadto k vysokému stupni a širokému spektru aktivity sloučeniny č. 1S, jak je demonstrována v tabulce 4, sloučenina by měla také zachovávat plný protinádorový účinek při

orální aplikaci. To bylo demonstrováno u myší nesoucích s.c. implantovaný Lewisův karcinom plic a je níže podrobněji popsáno.

Jinou vlastností sloučeniny č. 1S je její retence aktivity v subliniích P388 leukemie, které vykazují resistenci na mnohotné protinádorové látky jak je níže popsáno. Jako hlavní problém v chemoterapii rakoviny je objevení resistantních populací nádorových buněk, které selhávají v odpovědi na původně účinné režimy podání farmak, stejně jako režimy léčby sekundárních linií, dostupnost farmak, na které resistantní buňky nejsou zkříženě resistantní, by měly mít signifikantní dopad na ovládání rakoviny.

Aktivita sloučeniny č. 1S v každém z nádorových modelů, které byla testovány je popsána ve větších detailech v následujících oddílech.

i.p. nádorové modely

Aktivita sloučeniny 1S aplikované i.p. nebo s.c. v různých programech léčení myší nesoucích i.p.-implantované tumory je ukázána v tabulce 5. Údaje ukazují závislost protinádorového účinku na dávce sloučeniny č. 1S u šesti i.p.-implantovaných nádorových modelů.

P388 leukemie: Když je podána i.p. ve dni 1 a 5 myším nesoucím i.p. P388 leukemií, sloučenina č. 1S vyvolává 200% ILS se 4/6 dlouhodobě přežívajících zvířat (v kůře) a její maximálně tolerovatelná dávka je 15 mg/kg. Nižší dávky jsou také vysoce účinné se vzestupy v rozsahu života 125 a 92 %. Tento vysoký stupeň aktivity byl potvrzen v jiném pokusu dále popsaném (viz tabulka 8), ve kterém maximálně tolerovaná dávka vyvolávala 228% ILS s 2/6 dlouhodobě přežívajících zvířat. Tak sloučenina č. 1S měla léčebný účinek u myší nesoucích i.p. P388 leukemií.

L1210 leukemie: Když byla podána i.p. ve dnech 1 a 5, sloučenina č. 1S, byla reprodukovatelně aktivní u myší nemocných i.p. L 1210 leukemií. V reprezentativním pokuse ukázaném v tabulce 5, bylo 219 % ILS s 2/6 vyléčeními při maximální tolerované dávce 15 mg/kg. Rovněž se našla dobrá aktivita při dvou nižších dávkách. Sloučenina č. 1S byla v tomto uspořádání hodnocena v osmi přidáných stadiích dávky a odpovědi. Procento ILS a dlouhodobě přežívající získané při maximálně tolerovaných dávkách v těchto experimentech byly: 44 % (0/6), >300 % (5/6), 119 % (0/6), 156 % (1/6), 138 % (0/6), 156 % (2/6), 350 % (2/6) a 138 % (1/6). Tak v 8/9 pokusů sloučenina č. 1S vyvolávala >100% ILS a v 6/9 pokusů byli přítomni dlouhodobě přežívající jedinci.

B16 melanom: V tomto nádorovém modelu, ve kterém sloučenina č. 1S byla zřetelně lepší než camptothecin a 10-hydroxycamptothecin (viz tabulka 4), farmakou vyvolávalo 52% ILS při své maximální tolerované dávce 15 mg/kg podané i.p. ve dnech 1, 5, 9 a 13. Tento výsledek se potvrdil v druhém pokuse, ve kterém nejvyšší testovaná dávka 9,6 mg/kg vyvolala 130% ILS.

B16 melanom/podlinie F10: F10 podlinie B16 melanomu je vysoce metastasující podlinií tohoto nádoru, který byl vybrán klonováním. Sloučenina č. 1S vyvolává 105% ILS při své maximálně tolerované dávce 15 mg/kg podané i.p. ve dnech 1, 5, 9 a 13. Jak je indikováno, aktivita zvyšuje rozsah života $0 > 40$ %, a byla stejně zřejmá i u dvou nižších dávek.

M5076 sarcom: M5076 sarcom je metastasující sarkom retikulárních buněk, který vzniká v ovariu C57Bl/6 myší a bylo nalezeno, že je transplantovatelným nádorem. Tento nádor implantovaný i.p. byl citlivý na sloučeninu č. 1S, když látka byla podána s.c. stejně jako i.p. aplikací. Stupeň aktivity byl virtuálně identický 98% ILS a 105% ILS, těmito dvěma aplikačními cestami v děleném dávkovém schématu každé tři hodiny krát 4

ve dni 1, 5 a 9. Toto schema jak níže popsáno, se jeví být optimální pro sloučeninu č. 1S v řadě nádorových modelů. Sloučenina č. 1S byla hodnocena ve třech přídavných studiích dávky a účinku u myši nesoucích i.p. M5076 sarkom. V těchto studiích látka byla podána jako jedinná dávka ve dnech 1, 5 a 9 i.p. (75% ILS s 1/3 vyléčeními), jako jednotlivá dávka ve dnech 1, 5, 9 a 13 i.p. (71% ILS s 1/3 vyléčeními) a jako jedna dávka ve dnech 1, 5 a 9 s.c. (57% ILS). Jako při i.v. a s.c. nádorových modelech (jak níže popsáno), sloučenina č. 1S se zdá být nejúčinnější u i.p. M5076 sarkomu, když je podána v děleném dávkovém režimu. Přesto bez ohledu na schema aplikace je sloučenina č. 1S reprodukovatelně aktivní u tohoto nádorového modelu.

Karcinom 26 kolon:

Karcinom 26 kolon je vysoce invazivní ametastasující nediferenciovaný tumorový model na kolon. Tento nádor, v testovaném schematu se ukázal jako refrakterní k maximálně tolerované dávce sloučeniny č. 1S.

i.v. nádorové modely

Aktivita sloučeniny č. 1S aplikované i.p. nebo i.v. myším nesoucím systémové (i.v. inokulované) leukemie nebo Lewisův plicní karcinom je ukázána v tabulce 6. Závislost odpovědi na dávce a závislost na schematu podání sloučeniny č. 1S je jasně v těchto studiích demonstrována. V každém ze tří nádorových modelů, sloučenina č. 1S vykazovala léčebný účinek.

P388 leukemie:

P388 leukemie je obecně mnohem méně citlivá na farmaka je-li implantována i.v. než když je inokulována i.p. Avšak sloučenina č. 1S byla vysoce účinná proti i.v. P388 leukemii,

byla-li dána ve své maximálně tolerované dávce ve dnech 1 a 5 i.p. (279% ILS s 2/6 vyléčeními) nebo i.v. (250% ILS se 2/6 vyléčeními). V třetím pokuse tohoto nádorového modelu sloučenina č. 1S vyvolává 125% ILS se 1/6 vyléčeními v maximálně tolerované dávce 15 mg/kg podané i.p. ve dnech 1 a 5.

L1210 leukemie:

Sloučenina č. 1S se ukázala být reprodukovatelně a vysoce aktivní proti i.v. implantované L1210 leukemie. Byly uskutečněny extensivní studie závislosti na schematu podání u tohoto nádorového modelu s farmakou aplikovaným i.v. Jak je demonstrováno v tabuлке 6, aplikace v rozděleném dávkovém režimu vedla k vyššímu stupni aktivity v širším dávkovém rozsahu. Léčebný účinek byl pozorován, když farmakou bylo podáno i.v. ve dnech 2 a 6 jako jediná dávka nebo jako čtyři dávky v tříhodinových intervalech. Nadto k údajům ukazujícím v tabulce 6, je zde deset studií vztahu dávky a účinku při i.v. aplikaci sloučeniny č. 1S u myší nesoucích i.v. L1210 leukemii. Výsledky jsou následující: dny 2 a 6, 171% ILS s 2/6 vyléčeními, 4 působení v tříhodinových intervalech ve dnech 2 a 6, > 300% ILS se 6/6 vyléčeními, tři léčení v šestihodinových intervalech ve dnech 2 a 6 200% ILS s 2/7 vyléčeními, dvě léčení ve 12hodinových intervalech ve dnech 2 a 6, 229% ILS se 2/7 vyléčeními, jediné léčení ve dnech 2 až 6, 143% ILS a 129% ILS, dvě léčení ve dvanáctihodinových intervalech ve dnech 2 až 6, 193% ILS a 171% ILS, jediná dávka ve dni 2, 114% ILS, a 4 léčení v tříhodinových intervalech ve dni 2, 244% ILS se 1/6 vyléčeními. Sloučenina č. 1S by se měla jevit nejúčinnější, když je splikována ve schematu každé 3 hodiny. Je méně účinné, když je podávána denně, než když je podána každý čtvrtý den. Optimální schema z těchto studií bylo užito pro určité pevné nádory, jak svrchu diskutováno pro i.p. M5076 sarkom a jak je popsáno níže. U řady tumorových systémů stupeň aktivity je zvýšen a účinný dávkový rozsah je širší, když sloučenina č. 1S je podána v děleném dávkovacím, tj. každé 3 hodiny čtyřikrát denně, schematu.

Lewisův karcinom plic:

Lewisův karcinom plic je vysoce metastasující, nediferencovaná plicní rakovina, která se široce užívá pro hodnocení farmak. Tento nádorový model je refrakterní na řadu zavedených protinádorových farmak, když je užit jako skrínigový systém identifikuje jen velmi málo sloučenin jako účinné. Sloučenina č. 15 má léčivé působení u tohoto chemorefrakterního nádorového modelu, ve kterém je nádor inokulován i.v., což vede k nádorovým jádrům v plicích. Léčivé působení u tohoto nádoru je neobvyklým zjištěním.

Jak je zřejmé ze všech tří i.v. inokulovaných nádorových modelů, sloučenina č. 15 je dosti účinná proti systemovým tumorům, když je aplikována i.p. stejně jako i.v.

s.c. nádorové modely

Sloučenina č. 15 byla hodnocena u deseti pevných nádorových modelů, ve kterých nádory byly implantovány s.c. a farmakou bylo aplikováno i.p., i.v. nebo orálně (p.o.). V těchto modelech je protinádorová aktivita hodnocena stupněm inhibice růstu nádoru v místě implantace nádoru. Nádory se obecně měří 2 až 3 týdny následující po implantaci nádoru, když jsou zřejmé velké tumory ($\geq 500 \text{ mm}^3$) u neléčených kontrolních zvířat. Pro vysoce metastasující solidní tumory se rovněž může použít čas přežití jako měřítko aktivity. Pro méně metastasující nádorové modely čas přežití neléčených zvířat je značně variabilní a zvířata mohou přežívat po dlouhá období s extrémně velkými nádory, které často zvředovatí a infikují se. Sloučenina č. 15 byla vysoce účinná v 8 z 10 s.c. solidních tumorových modelů, inhibujíc vzrůst nádorů o více než 90 % při své maximální tolerované dávce (tabulka 7). Úplná inhibice růstu nádoru u vysoce metastasujících nádorů včetně Lewisova karcinomu plic, B16 melanolu, B15 melanomu podlinie F10 a M5076 sarkomu byla provázena prodloužením rozsahu života. Dokonce

i u méně respresibilních nádorových modelů, Madisonově karcinomu plic a karcinomu 26 kodon, sloučenina č. 1S měla nějaký účinek na růst nádorů s $\geq 70\%$ inhibicí prokazatelnou při maximálně tolerované dávce.

Lewisův karcinom plic: Tento vysoce metastasující plicní nádor byl nejcitlivější na sloučeninu č. 1S ze všech testovaných nádorových modelů. To je neobvyklý nález, jelikož Lewisův karcinom plic byl široce užíván ve studii protinádorových farmak a je refrakterní na většinu známých protinádorových farmak. Když je podána i.p. ve dnech 1, 5, 9 a 13, sloučenina č. 1S úplně inhibuje růst Lewisova plicního karcinomu u téměř všech myší léčených 15 nebo 9 mg/kg. V maximálně tolerované dávce 4 g 8 myší byly vyléčeny. V době měření nádoru, tumory u neléčených kontrol měly v průměru objem 1685 mm³. V druhém pokuse sloučenina č. 1S byla aplikována i.v. a p.o. ve dnech 1, 5 a 9. U obou aplikačních cest byla 99% inhibice růstu nádorů (TGI) s více než polovinou zvířat, které nevykazovaly žádnou přítomnost nádoru v době měření (13. den). Mimoto maximálně tolerovaná dávka oběma cestami aplikace byla v podstatě stejná, což vede k domněnce, že sloučenina č. 1S má výtečnou biologickou dostupnost po orální aplikaci. V tomto pokuse, tumory popřípadě rostou v místě implantace, což indikuje buď, že i.p. léčení je optimální u tohoto nádorového modelu nebo, že delší léčení je potřebné pro léčebný účinek.

B16 melanom: Tento metastasující melanomový model byl široce používán k hodnocení a vyhledávání protinádorových farmak. Když je implantován s.c., tento nádor je refrakterní na většinu protinádorových farmak, sloučenina č. 1S byla hodnocena u myší nesoucích B16 melanom ve studiích závislosti na dávce. Když je podána v jednotlivé dávce ve dnech 1, 5 a 9, maximální tolerovaná dávka sloučenina č. 1S aplikovaná i.v. nebo i.p., vyvolává 99% inhibici růstu nádoru (TGI) s většinou zvířat, které nemají žádné měřitelné nádory v 16. nebo 14. dni, kdy

většina kontrolních myší má nádory velikosti 864 a 758 mm³ ve dvou pokusech. Když je podána v optimálním děleném dávkovém léčebném schematu, sloučenina č. 1S vyvolá úplnou inhibici růstu tumoru v širším rozsahu dávek. To je shodné s výsledky získanými u jiných nádorových modelů. U s.c. B16 melanomového modelu, nádory případně rostou u všech léčených zvířat a nejsou zde žádná vyléčení. V tomto metastasujícím nádorovém modelu dochází k prodloužení rozsahu přežití, které se objevuje s úplnou inhibicí růstu nádoru. V děleném dávkovém režimu bylo 52 % ILS, zatímto při jednotlivých dávkách 24 mg/kg ve dnech 1, 5 a 9 se prodlužoval rozsah života o 39 %. V posledním schematu i.v. aplikace vedla k 53 % ILS.

B16 melanom/podlinie FlO: Tato podlinie B16 melanomu vybraná pro zvýšení metastatické vlastnosti byla ve svých odpovědích na léčení sloučeninou č. 1S, podobná původnímu B16 melanomu. I.p. léčení ve dnech 1, 5, 9 a 13 vedlo k úplné inhibici růstu nádorů v maximálně tolerovaných dávkových hladinách. V těchto pokusech, tumory byly měřeny 16. den a tumory kontrolních myší byly velmi velké, průměrně 1927 a 1196 mm³. Tumory ve všech léčených skupinách případně rostly a nebyla zde žádná vyléčení. Avšak léčení i.p. při 25 mg/kg vedlo k 70 % vzestupu v rozsahu přežití (ILS), i.v. léčení ve stejné dávce poskytlo 38 % ILS.

ADJ PC₆-plasmacytom: Tento nádorový model, který je nejvíce příbuzný lidské rakovině typu mnohotného myelomu, byl vysoce citlivý na sloučeninu č. 1S aplikovanou i.p. ve dnech 1, 5, 9 a 13. Tumory byly měřeny 19. den a měly v průměru 828 mm³ u kontrolních myší. Sloučenina č. 1S vyvolávala > 90% inhibici růstu nádoru ve čtyřech dávkových úrovních při nebo pod maximálně tolerovanou dávkou. Byl zde 1 z 8 dlouhodobě přežívajících beznádorových zvířat v každé z vrchních tří dávkových hladin. Jelikož tento tumor není vysoce metastasující, nebyl určován medianový čas přežití.

M5076 sarkom: M5076 sarkom implantovaný s.c. byl dosti citlivý na sloučeninu č. 1S s >90% inhibicí TGI ve třech dávkových hladinách při nebo pod maximálně tolerovanou dávkou. Nádory byly měřeny 17. den, když kontrolní nádory měřily průměrně 1045 mm³. Farmakou bylo aplikováno i.p. ve dnech 1, 5, 9 a 13. Farmakou nebylo léčivé u tohoto modelu, ale prodlužovalo rozsah života o 31 %.

Mammární adenokarcinom 16/C: Tento nádorový model tumoru prsů je transplantovatelnou podlinií spontánního tumoru mammary, C₃H myší. Sloučenina č. 1S inhibovala růst nádoru o 96 % při maximální tolerované dávce 10 mg/kg, podané ve dnech 1, 5, 9 a 13. Tumory byly měřeny 19. den, když průměrná velikost nádoru u kontrolních myší byla 630 mm³. V druhém pokuse ve stejném léčebném schématu, sloučenina č. 1S vyvolávala 73% inhibici růstu nádorů (TGI) u mamárního adenokarcinomu 16/C. Jelikož nádor není vysoce metastasující, přežívání zvířat nebylo měřeno.

Adenokarcinom 38 hodin: Tento nemetastasující nádorový model byl široce používán v hodnocení farmak a je považován za jeden z nejvíce na farmaka refrakterních nádorových modelů. Sloučenina č. 1S byla aplikována i.p. jako jednotlivá dávka nebo v děleném dávkovém režimu ve dnech 3, 10, 17 a 24. Bylo zvoleno mnohem delší léčebné použití, pro pomalý růst tohoto solidního nádoru. Tumory byly měřeny 31. den a měly v průměru pouze 349 mm³ u neléčených kontrol. Jako v jiných nádorových modelech sloučenina č. 1S byla mnohem účinnější v děleném dávkovém schématu vyvolávající >90% inhibici ve dvou dávkových hladinách. Stejně tak byla prokazatelná dobrá aktivita (89 % TGI) v jednotlivém dávkovém režimu.

Adenokarcinom 51 kolon: To je jiný pomalu rostoucí kolonový nádorový model, který byl vyzkoušen jako refrakterní u většiny protinádorových farmak. Užitý protokol pro tento nádor byl

podobný jako po adenokarcinomu 38 kolon. Sloučenina č. 1S byla účinná proti adenokarcinomu 51 kolon vyvolávajíc 88% TGI s jednotlivým dávkovým režimem a 92% TGI v děleném dávkovém působení. Jako u jiných nádorů, sloučenina č. 1S byla účinná v širším rozsahu dávek, když byla podána v děleném dávkovém režimu. Adenokarcinom 51 kolon byl měřen 24. den, když kontrolní nádory měly v průměru 766 mm³.

Madisonův plicní karcinom: Madisonův plicní karcinom jako Lewisův plicní karcinom je rychle rostoucí nediferencovaný nádorový model s vysokou metastatickou aktivitou. Na rozdíl od Lewisova plicního nádoru, Madisonův plicní nádor není vysoce citlivý na sloučeninu č. 1S. V jednotlivém dávkovém režimu podávaném i.v. ve dnech 1, 5 a 9, zde není prakticky žádná, tumorový růst inhibující aktivita (28 % TGI) při maximální tolerované dávce. Ve dvou přídatných pokusech se stejným léčebným schematem s farmakem podaným i.p., sloučenina č. 1S vyvolala jenom 55% a 23% TGI. Avšak v optimálním děleném dávkovém režimu, sloučenina č. 1S aplikovaná i.v. vykazovala účinek proti Madisonově plicnímu karcinomu s 85% TGI při maximální tolerované dávce. Farmakon bylo poněkud méně účinné v tomto léčebném schematu při podání i.p. (74 % TGI při maximální tolerované dávce). Madisonovy plicní nádory byly měřeny 12. nebo 13. den ve dvou oddělených pokusech, když nádory u kontrolních myší měřily v průměru 1571 a 942 mm³, což odráží velkou rychlost vzrůstu tohoto nádoru. Tak dokonce u refrakterního nádoru, sloučenina č. 1S, ve svém optimálním léčebném režimu, může vést k signifikantní inhibici růstu tumoru.

Karconom 26 kolon: U tohoto vysoce invazivního a metastasujícího nediferenciovaného nádoru kolon, sloučenina č. 1S, vyvolávala pouze hraniční inhibici růstu tumoru (72 % TGI) při i.p. aplikaci ve své maximální tolerované dávce ve dnech 1, 5, 9 a 13. Tumory byly měřeny 19. den, když kontrolní tumory měřily průměrně 1052 mm³. Není známo zda by sloučenina č. 1S vykazovala

dobrou aktivitu u tohoto modelu, kdyby byla podávána ve svém optimálním děleném dávkovém režimu.

Podlinie resistantní na více farmak

Přestože nejdůležitějším problémem v terapii rakoviny je necitlivost běžných neoplasmat na všechna dostupná činidla nebo kombinační režimy, jiným velkým problémem je vznik resistantních nádorových buněk z předtím odpovídajících nádorů. Většina pacientů s "chemosensitivními" tumory jako velkobuňčný karcinom plic, ovariální adenokarcinom, akutní nonlymfocytická leukemie, karcinom prsu a jisté lymfomy mohou být uvedeny do remise kombinačními režimy, které byly stanoveny jako terapie první linie pro tato různá onemocnění. Avšak ve většině případů je značně redukována u pacientů s rekurentním onemocněním schopnost vyvolat významné remise i přes uplatnění značně intenzivních kombinačních režimů. Charakteristiky se tyto rekurentní tumory prokázají být refrakterní na farmaka, která nejsou příbuzná strukturně a/nebo mechanisticky látkám, které byly původně užity k vyvolání remise. Tento fenomen resistance na více farmak je v současné době intenzivně zkoumán v řadě laboratoří. Současná evidence vede k domněnce, že zesílení a vyjádření genu resistance na více farmak (mdr = multidrug resistance) a přítomnost mdr genového produktu P170 membránového glykoproteinu, je spojena s resistencí na více farmak. P170 účelně slouží jako effluxní transportní pumpa s neuvěřitelnou růzností substrátové specificity. Současné práce vedou k domněnce, že silná exprese mdr genu u jistých dříve neléčených nádorů takových, jako feochromocytom a adenokarcinom by mohlo být odpovědná při nejmenším částečně za vrozený na farmaka refrakterní fenotyp těchto nádorů.

Tak je důležité identifikovat nová činidla, která si po-
drží vysoký stupeň účinnosti proti nádorům, které vykazují fe-
notyp resistance na více farmak. Taková činidla mohou být slib-
ná pro další pokroky v léčbě chemosensitivních nádorů (to je

prokázáním účinnosti u předtím léčených pacientů nebo vybitím mdr subpopulace jako složky kombinačních režimů první linie) stejně tak jako pro v současné době neodpovídající nádory, které jsou necitlivé k dostupným farmakům pro vrozené vyjádření mdr genu. Camptothecin prokázal být neobvyklým v tom, že je jedním z mála přirozených produktů cytotoxických činidel, která nevykazují zkříženou resistenci u dobře charakterizovaných nádorových podlinií, které vykazují mdr-fenotyp, to je P388 podlinie resistantní na doxorubicin, vinkristin, amsakrin, ellipticin nebo mitoxantron. Jelikož většina z farmak, která mají zkříženou resistenci u buněčných linií resistantních na více farmak je zásaditá, bylo očekáváno, že přidání zásaditého postranního řetězce k molekule camptothecinu jako u sloučeniny č. 15, by mělo vést ke sloučenině, která by byla transportována z buněk pomocí P170 glykoproteinu a tak se prokázat neúčinnou u tumorů vyjadřujících mdr gen. Sloučenina č. 15 byla hodnocena u myši nesoucích P388 a jako doxorubicin a mitoxantron resistantní podlinie (tabulka 8). Pro srovnání byl zahrnut doxorubicin a mitomycin. P388/mitoxantron si ponechávaly citlivost na sloučeninu č. 15. Tyto buněčné linie resistantní na více farmak vykazovaly očekávanou resistenci na doxorubicin. P388/doxorubicin byl rovněž resistantní na mitomycin c. Tak sloučenina č. 15 si zachovává protinádorový účinek u buněčných linií resistantních na více farmak, což je charakteristická vlastnost camptothecinu.

Racemické formy sloučeniny č. 1

Všechny předtím popsané biologické studie byly uskutečnĚny s S isomerem sloučeniny č. 1, to je, konfigurací na C-20, která existuje v přirozeně se vyskytujícím camptothecinu a 10-hydroxycamptothecinu. Racemická forma sloučeniny č. 1 byla připravena celkovou syntesou a byla hodnocena na protinádorový účinek u myši nesoucích i.p. P388 leukemii (tabulka 9). Racemická forma sloučeniny č. 15, v dalším ozna-

čována jako sloučenina č. 1RS, je vysoce aktivní u P388 leukemie vyvolávající 165% ILS s 1/6 dlouhodobě přežívajících v dávce 29 mg/kg aplikované i.p. ve dnech 1 a 5. Ačkoliv není tak aktivní jako sloučenina č. 1S (srovnej tabulky 5 a 8), sloučenina č. 1RS má výtečné účinky v tohoto nádorového modelu.

Různé solné formy sloučeniny č. 1S

Sloučenina č. 1S je ve vodě rozpustná účinkem přítomnosti zásaditého postranního řetězce v poloze 9, který tvoří soli s kyselinami, takovými jako kyselina octová, chlorovodíková methansulfonová. Experimenty popsané v tabulkách 2 až 9 byly uskutečněny buď s acetátovými nebo chlorovodíkovými solmi sloučeniny č. 1S. Rozpustná forma sloučeniny č. 1S se rovněž může připravit zásaditou hydrolýzou E-kruhu laktonu sloučeniny č. 1S s vytvořením ve vodě rozpustných solí alkalických kovů karboxylátové formy sloučeniny. Přímé srovnání acetátových, hydrochloridových, dihydrochloridových a sodných solí sloučeniny č. 1S bylo uskutečněno u myši nesoucích i.v. L1210 leukemii (tabulka 10). Sloučeniny byly aplikovány jako roztoky v 5% dextrose i.v. ve dnech 1 a 5. Dihydrochloridová sůl se vytvoří po přidání přebytku kyseliny chlorovodíkové a pravděpodobně vede k protonaci chinolinového dusíku v kruhu B, stejně jako dusíku dimethylaminomethylové skupiny. Každá solná forma byla aktivní u tohoto nádorového modelu se 100% ILS zřejmými pro acetát, 175 % ILS pro hydrochlorid, 133 % ILS pro dihydrochlorid a 203 % ILS pro sodnou sůl. Tři soli kyselin byly ekvipotentní, to je měly identickou maximální tolerovanou dávkovou úroveň 15 mg/kg. Avšak sodíková sůl byla asi 3, 5-krát méně účinná s maximálně tolerovanou dávkou 54 mg/kg.

T a b u l k a 3

Spektrum aktivity sloučeniny č. 1S u zvířecích nádorových
modelů

tumorový model	aktivita při maximálně tolerované dávce
----------------	--

ip tumorové modely

P388 leukemie	+++
L1210 leukemie	+++
B16 melanom	++
B16 melanom/F10 podlinie	++
M5076 sarkom	++
karcinom 26 kolon	-

iv tumorové modely

P388 leukemie	+++
L1210 leukemie	+++
Lewisův plicní karcinom	+++

sc tumorové modely

Lewisův plicní karcinom	+++
B16 melanom	++
B16 melanom/F10 podlinie	++
ADJ-PC6 plasmacytom	++
M5076 sarkom	++
Mammarův adenokarcinom 16/c	++
adenokarcinom 38 kolon	++
adenokarcinom 51 kolon	++
Madisonův plicní karcinom	+
karcinom 26 kolon	+

Vysvětlivky k tabulce 3

Sloučenina č. 15 byla aplikována i.o. nebo i.v. v každý čtvrtý nebo sedmý den po 2 až 4 běhy začínající 1 až 3 dny po implantaci nádoru.

+++ = léčivý ($> 200\%$ vzestup v rozsahu života ILS)

++ = $> 100\%$ vzestup v rozsahu života (ILS) nebo $> 90\%$ inhibice růstu nádoru (TGI)

+ = $> 50\%$ ILS nebo $> 70\%$ TGI

- = $< 50\%$ ILS nebo $< 70\%$ TGI.

T a b u l k a 4

Srovnání sloučeniny č. 15 s captothecinem a 10-hydroxycaptothecinem
u řady zvířecích nádorových modelů

tumorový model	sloučenina č.15 prodloužení doby přežití	Captothecin ILS inhibice růstu tumoru (TGI)	10-hydroxycaptothecin ILS inhibice růstu tumoru (TGI)
<u>ip tumorové modely</u>			
P388 leukemie	léčivý	léčivý	léčivý
L1210 leukemie	léčivý	172% ILS	94% ILS
B16 melanom	152% ILS	36% ILS	95% ILS
B16 melanom/F10 podlinie	105% ILS	68% ILS	100% ILS
M5076 sarkom	105% ILS	81% ILS	98% ILS
karcinom 26 kolon	25% ILS	50% ILS	léčivý
<u>iv tumorové modely</u>			
P388 leukemie	léčivý	75% ILS	40% ILS
L1210 leukemie	léčivý	136% ILS	100% ILS
Lewisův plicní karcinom	léčivý	netestováno	netestováno
<u>sc tumorové modely</u>			
Lewisův plicní karcinom	léčivý	92% TGI	4% TGI
B16 melanom	100% TGI	78% TGI	netestováno
B16 melanom/F10 podlinie	100% TGI	90% JGI	58% TGI
ADJ-PC6 plasmacytom	100% TGI	100% TGI	76% TGI

tumorový model

složenina č. 15
prodlouženú doby
přežítí

Camptothecin 10-hydroxycamptothecin
ILS inhibice růstu tumoru (TGI)

M5076 sarkom	100% TGI	100% TGI	66% TGI
Mammariu adenokarcinom			
16/c	96% TGI	99% TGI	61% TGI
adenokarcinom 38 kolon	96% TGI	100% TGI	netestováno
adenokarcinom 51 kolon	92% TGI	75% TGI	netestováno
Madisonu plicní karcinom	85% TGI	63% TGI	33% TGI
karcinom 26 kolon	72% TGI	66% TGI	37% TGI

T a b u l k a 5

Aktivita sloučeniny č. 15 u myší nesoucích¹² implantované nádory

tumorový model	schema léčení/ způsob podání	dávka (mg/kg/ inj.)	ILS (%)	dlouhodobé přežití
P388 leukemie	A/ip	30	toxický	
		15	>200	4/6
		7,5	125	
		3,8	92	
L1210 leukemie	A/ip	25	toxický	
		15	219	2/6
		9	138	
		5,5	81	
		3,2	31	
B16 melanom	B/ip	25	toxický	
		15	152	
		9	100	
		5,4	52	
		3,2	43	
B16 melanom/ F10 podlinie	B/ip	25	toxický	
		15	105	
		9	68	
		5,4	63	
		3,2	37	
M5076 sarkom	C/ip	10	toxický	
		5	toxický	
		2,5	105	
		1,2	75	1/8
		0,62	70	1/8
M5076 sarkom	C/sc	10	toxický	
		5	toxický	
		2,5	98	
		1,2	70	1/8
		0,62	36	

Tabulka 5 - pokračování

tumorový model	schema léčení/ způsob podání	dávka (mg/kg/ inj.)	ILS (%)	dlouhodobé přežití
karcinom 26 kolon	8/ip	40	toxický	
		20	toxický	
		10	25	
		5	5	
		2,5	7	

T a b u l k a 6

Aktivita sloučeniny č. 1S u myší nesoucích iv-implantované nádory

tumorový model	schema léčení/ způsob podání	dávka (mg/kg/ inj.)	ILS (%)	dlouhodobé přežití
P388	A/ip	25	279	2/6
		15	132	
		9	100	
		5,4	58	
		3,2	42	
P388 leukemie	A/iv	25	toxický	
		19	250	2/6
		14	145	
		10	110	
		7,9	65	
L1210 leukemie	A/ip	25	toxický	
		15	171	1/6
		9	136	
		5,4	93	
		3,2	57	
L1210 leukemie	D/iv	40	toxický	
		24	>300	4/7
		14	157	
		8,6	129	
		5,2	71	
L1210 leukemie	E/iv	6	toxický	
		3,6	>300	5/7
		2,2	>300	1/7
		1,3	243	2/7
		0,78	186	
Lewisův plicní karcinom	B/ip	25	toxický	
		15	>200	7/7
		9	111	1/7
		5,4	37	
		3,2	16	

T a b u l k a 7

Aktivita sloučeniny č. 1S u myši nesoucích sc-implantované nádory

tumorový model	schema léčení/ způsob podání	dávka (mg/kg/ inj.)	TGI (%)	myši bez hmata- telných nádorů
Lewisův plicní karcinom	B/ip	25	toxický	
		15	100	8/8 ^x
		9	99	7/8 ^{xx}
		5,4	68	2/8
		3,2	31	
Lewisův plicní karcinom	F/iv	25	99	5/8
		15	95	3/8
		9	93	1/8
		5,4	87	4/8
Lewisův plicní karcinom	F/po	45	toxický	
		27	99	4/8
		16	90	1/8
		9,7	89	2/8
		5,8	51	
B16 melanom	F/ip	24	99	7/8
		14	57	3/8
		8,6	63	3/8
		1,2	20	1/8
		3,1	63	2/8
B16 melanom	F/iv	25	toxický	
		15	99	7/8
		9	96	6/8
		5,4	79	3/8
		3,2	54	2/8
B16 melanom	C/ip	6	100	7/7
		3,6	100	7/7
		2,2	92	2/8
		1,3	64	1/8
		0,78	46	1/8

Tabulka 7 - pokračování

tumorový model	schema léčení/ způsob podání	dávka (mg/kg/ inj.)	TGI (%)	myši bez hma- tatelných nádorů
B16 melanom/ F10 podlinie	B/ip	25	100	7/8
		15	87	
		9	57	
		5,4	62	
		3,2	52	
B16 melanom/ F10 podlinie	F/iv	25	97	6/8
		15	97	7/8
		9	60	2/8
		5,4	34	1/8
		3,2	22	1/8
ADJ-PC6 plasmacytom	B/ip	25	toxický	
		15	100	7/7 ^{xxx}
		9	100	8/8 ^{xxx}
		5,4	92	4/8 ^{xxx}
		3,2	93	3/8
M5Q76 sarkom	B/ip	25	toxický	
		15	100	8/8
		9	98	6/8
		5,4	92	3/8
		3,2	64	2/8
Mammární adenokarcinom 16/C	B/ip	20	toxický	
		10	96	5/8
		5	61	2/8
		2,5	59	1/8
adenokarcinom 38 kolon	G/ip	24	89	4/7
		14	78	5/8
		8,6	55	3/7
		5,2	0	1/7
		3,1	0	2/7

Tabulka 7 - pokračování

tumorový model	schema léčení/ způsob podání	dávka (mg/kg/ inj.)	TGI (%)	myši bez hmatatelných nádorů
adenokarcinom 38 kolon	H/ip	6	96	5/7
		3,6	93	6/7
		2,2	74	4/7
		1,3	68	4/7
		0,78	53	2/7
adenokarcinom 51 kolon	G/ip	24	88	3/8
		14	76	1/8
		8,6	53	1/8
		5,2	36	1/8
		3,1	34	
adenokarcinom 51 kolon	H/ip	3,6	92	4/8
		2,2	89	4/8
		1,3	88	3/8
		0,78	73	1/8
Madisonův plicní karcinom	F/iv	24	28	1/8
		12	0	
		6	21	
		3	0	
		1,5	0	
Madisonův plicní karcinom	C/iv	3	toxický	
		1,5	85	3/8
		0,75	63	1/8
		0,38	41	
		0,19	0	
karcinom 26 kolon	B/ip	20	toxický	
		10	72	
		5	39	
		2,5	38	

Vysvětlivky k tabulce 7

$\times_{4/8}$ dlouhodobé přežití bez nádorů

$\times\!\times_{2/8}$ dlouhodobé přežití bez nádorů

$\times\!\times\!\times_{1/8}$ dlouhodobé přežití bez nádorů

léčebné schemata jsou: B = dny 1, 5, 9 a 13,

C = každé 3 hodiny $\times$ 4 ve dnech 1, 5 a 9,

F = dny 1, 5 a 9, G = dny 3, 10, 17 a 24,

H = každé 3 hodiny $\times$ 4 ve dnech 3, 10, 14 a 24.

Inhibice růstu nádoru (TGI) je založena na středním objemu nádorů skupin 7 nebo 8 myší relativně k neléčeným kontrolám. Nádory byly měřeny mezi 12. a 19. dnem, vyjma 24. den pro adenokarcinom 51 kolon a 31. den pro adenokarcinom 38 kolon).

Ve všech, vyjma dva pokusy, všechny neléčené kontrolní myši (21 nebo 24 myší/skupinu) měly měřitelné nádory. V 816/F10, schematu F, 21/24 kontrolních myší mělo měřitelné nádory. V pokuse s adenokarcinomem 38 kolon, 19/21 kontrolních myší mělo měřitelné nádory.

Vzestup v rozsahu života (ILS) je založen na medianu přežívací doby skupin 6 myší. Čisté zabití tumorových buněk (NCK = net cell kill) je vypočteno z medianu přežívací doby standardními metodami, jelikož přežívací doba je lineární funkcí logaritmu zatížení nádorových buněk. Jelikož mitoxantronová resistantní podlinie má delší zdvojovací čas než ostatní dvě buněčné linie užití v tomto pokuse, menší ILS je spojena s větší NCK než u P388 nebo dixirubicinově resistantní buněčné linie.

T a b u l k a 8

Nedostatek zkřížení resistance na sloučeninu č. 15 na více farmak,
P388 leukemie resistantních podliní

sloučenina	dávka (mg/kg, i.p., dny 1 a 5)	P388 ILS (%)	NCK (log)	P388/doxorubicin ILS (%)	NCK (log)	P388/Mitoxantron ILS (%)	NCK (log)
sloučenina 15	25		toxická		toxická		toxická
	15	228	6,5	176	6,0	107	5,7
	9	211	6,5	90	2,2	79	3,6
	5,4	128	3,5	33	0	57	2,1
	3,2	67	1,0	14	0	29	0
	9	233	6,5	14	0	7	0
Doxorubicin	5,4	156	4,6	19	0	4	0
	3,2	172	5,3	24	0	0	0
	1,9	167	5,1	24	0	0	0
	1,2	117	3,0	19	0	0	0
	7,5	178	5,5	52	0,5	104	5,5
	4,5	156	4,6	62	1,0	136	6,5
Mitomycin C	2,7	128	3,5	52	0,5	54	1,8
	1,6	106	2,6	48	0,3	29	0
	1,0	83	1,7	29	0	14	0

T a b u l k a 9

Aktivita racemické směsi sloučeniny č. 1S u myší
nesoucích i.p. P388 leukemii

sloučenina	dávka (mg/kg, ip, dny 1 a 5)	ILS (%)	dlouhodobé přežívání
IRS	29	165	1/6
	14	135	
	7,2	80	
	3,6	30	

Zvířata byla implantována i.p. s 10^6 buňkami. Vzestup
v rozsahu života (ILS) je založen na medianu přeživací do-
by skupin 6 myší relativně k neléčeným kontrolám. Dlouho-
dobé přežití bylo bez tumorů ve 45. dni.

T a b u l k a 10

Srovnávací aktivita různých solných forem sloučeniny č. 1S
u myší nesoucích i.v. L1210 leukemii

sloučenina	dávka (mg/kg, ip, dny 1 a 5)	ILS (%)
1S (acetátová sůl)	25	toxický
	15	100
	9	83
	5,4	67
	3,2	50
1S (hydrochlori- dová sůl)	25	toxický
	15	175
	9	125
	5,4	92
	3,2	50
1S (dihydrochlori- dová sůl)	25	toxický
	15	133
	9	83
	5,4	50
	3,2	50
1S (sodná sůl)	90	toxický
	54	208
	32	133
	19	100
	12	67
	6,5	33

Zvířata byla inokulována i.v. s 10^6 buňkami. Vzestup
v rozsahu života (ILS) je založen na medianu přežívacího času
skupin 6 myší relativně k neléčeným kontrolám.

Farmaceutické přípravky a způsob léčení

Farmaceutické přípravky podle tohoto vynálezu tvoří účinné vzrůst nádorových buněk inhibující množství sloučeniny vzorce I a inertní farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo. Tyto přípravky jsou připraveny v dávkové jednotkové formě vhodné pro parenterální nebo orální aplikaci.

Sloučenina vzorce I se aplikuje v běžné dávkové formě připravené kombinací terapeuticky účinného množství, tj. účinného růstu tumorů inhibujícího množství, sloučeniny vzorce I ("aktivní složka") se standardními farmaceutickými nosiči nebo ředidly podle běžných postupů. Tyto postupy mohou zahrnovat mísení, granulování a stlačení nebo ředění složek, jak je vhodné pro žádaný přípravek.

Užití farmaceutického nosiče mohou být například buď pevné nebo kapalné. Příkladnými pevnými nosiči jsou laktosa, bílá hlína, mastek, sacharosa, želatina, agar, pektin, akacie, stearan hořečnatý, kyselina stearová a podobně. Příkladnými kapalnými nosiči jsou sirup, podzemnicový olej, olivový olej, voda a podobně. Podobně nosiče nebo ředidla mohou obsahovat zpoždovací materiály dobře v oboru známé, takové jako glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát samotné nebo s voskem, ethylcelulosou, hydroxypropylmethylcelulosou, methylemethakrylátem a podobně.

Může se užít široká řada farmaceutických forem, přípravky se mohou tabletovat, naplnit do tvrdých želatinových kapslí v práškové nebo peletové formě nebo mohou tvořit pastilky. Množství pevného nosiče se bude široce měnit, ale výhodně bude mezi 25 mikrogramy do asi 1,0 g. Když je užit kapalným nosičem, přípravek bude ve formě sirupu, emulze, měkké želatinové kapsle, sterilního injekčního roztoku nebo suspenze v ampulích nebo lahvičkách nebo v nevodné kapalně suspenzi.

K získání stabilní ve vodě rozpustné dávkové formy, farmaceuticky přijatelná sůl sloučeniny vzorce I se rozpustí ve vodném roztoku organické nebo anorganické kyseliny, takové jako 0,3M roztok kyseliny jantarové nebo výhodně kyseliny jantarové nebo výhodně kyseliny citronové. Jestliže není dostupná rozpustná solná forma, sloučenina vzorce I se rozpustí ve vhodném spolurozpouštědle nebo jejich kombinacích. Příklady takových vhodných spolurozpouštědel zahrnují, ale nejsou omezeny na alkohol, propylenglykol, polyethylenglykol 300, polysolvát 80, glycerin a podobně v koncentracích v rozsahu od 0 až 60 % celkového objemu.

Přípravky mohou také být ve formě roztoku nebo solné formy aktivní složky ve vhodném vodném vehikulu jako je voda, nebo isotonické solní nebo dextrosové roztoky. Pro tx sloučeniny vzorce I, které nemají zásaditý postranní řetězec v 9. poloze jako jsou sloučeniny č. 2S a 10S (viz tabulka 2 pro struktury), sůl alkalického kovu karboxylátu vytvořeného alkalickou hydrolýzou E-kruhu laktonu by měla nést k rozpustným solím, jak příkladně uvedeno pro sodnou sůl sloučeniny 1S.

Bude třeba ohodnotit, že aktuální výhodné dávkování sloučenin vzorce I užití v prostředcích podle vynálezu se bude měnit podle užitého určitého komplexu, určitého vytvořeného přípravku, způsobu aplikace a určitého místa, hostitele a nemoci, jež má být léčena. Optimální dávkování pro danou sadu podmínek může být odborníky určeno s užitím běžných dávek určujících testů s ohledem na svrhu uvedené pokusné údaje. Pro parenterální aplikaci, dávka obecně užívaná je od asi 20 do asi 150 mg/m² tělesného povrchu, na den pro jeden až pět dní, výhodně opakované každý čtvrtý týden pro čtyři běhy léčení. Pro orální aplikaci, dávka obecně užívaná je od asi 20 do asi 150 mg/m² tělesného povrchu na den pro jeden až pět dní, s běhy léčení opakovanými ve vhodných intervalech.

Následující příklady ilustrují a) protokol užití pro měření aktivity různých sloučenin vzorce I u transplantovaných

myších nádorových modelů, b) chemickou výrobu sloučenin vzorce I užitých v přípravcích a metodách podle vynálezu a c) orální a parenterální farmaceutické přípravky podle vynálezu.

Má se za to, že bez dalšího vypracování odborník s použitím předchozího popisu může využít vynález v jeho nejplnějším rozsahu. Následující příklady jsou proto konstruovány pouze jako ilustrativní a žádným způsobem neomezují rozsah vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

I. Protokoly, užitě pro transplantované myší nádorové modely

Protokoly užití pro hodnocení protinádorové aktivity sloučenin vzorce I jsou dobře známé a využívané odborníky v hodnocení účinků farmak v preklinických nádorových modelech. Tyto studie obecně sledují protokoly stanovené National Cancer Institute, jak popsáno Geranem a dalšími, Cancer Chemotherapy Reports, část 3, sv. 3, 1 - 103, 1972.

A. i.p. nádorové modely

Tumory užitě v těchto studiích-P388 leukemie a její dexorbicinové a mitoxantronové resistantní podlinie, L1210 leukemie, B16 melanom, B16 melanom/F10 podlinie, M5076 sarkom a karcinom 26 kolon se udržují seriovou transplantací u syngeneických kmenů myší. Pro leukemie jsou tyto tumory přechovávány na DBA/2 myších. M5076 sarkom, B16 melanom a jeho F10 podlinie jsou přechovávány na C57BL/6 myších a karcinom 26 kolon je udržován na BALB/c myších. Leukemie a M5076 sarkom se seriově transplantují i.p. jako ascitová buněčná suspenze, zatímco B16 melanomové linie a karcinom 26 kolon se seriově transplantují jako s.c. solidní tumory.

Pro terapeutické zkoušky, se tumory asepticky odstraní z myších dárců a připraví se jako suspenze k i.p. aplikaci testovným zvířatům. Testovnými zvířaty pro karcinom 26 kolon jsou samice BALB/c myši (20 až 25 g). Testovnými zvířaty pro ostatní nádorové modely jsou syngeneické samice F_1 hybridu B6D2F₁ myši (C57BL/6xDBA/2). Inokulační hladiny jsou různé podle typu nádoru: P388 leukemie se inokuluje při 10^6 buňkách na myš, L1210 leukemie při 10^5 nebo 10^6 buněk na myš, M5076 sarkom při 5×10^6 na myš. Pro implantaci B16 melanomových linií a karcinomu kolon, s.c., tumory z myších dárců se rozsekají a homogenizují na volně uloženém teflonovém skleněném homogenisátoru k poskytnutí nádorové suspenze. Inokulační i hladiny jsou 0,5 ml 10% (hmotnost:objem) suspenze karcinomu 26 kolon, B16 melanomových linií a 0,5 ml 5% (hmotnost:objem) suspenze karcinomu 26 kolon. Po inokulaci tumoru, myši se náhodně rozdělí na léčené skupiny tvořené každá 6 až 8 zvířaty. V každém pokuse jsou tři skupiny neléčených kontrolních myší. Farmaka se rozpustí nebo suspendují v přiměřeném vodném vehikulu a podávají řadou cest a schemat: aplikace v širokém rozsahu dávkových hladin. Zvířata jsou pěstována v krabicových klecích a denně monitorována na mortalitu po 30 (L1210), 45 (P388) nebo 60 (B16, M5076, karcinom 26 kolon) dní. Konečným bodem pro aktivitu je median přežívacího času a vzestup v rozsahu života relativně k neléčeným kontrolám. Farmakou je považováno za účinné v těchto tumorových modelech, jestliže prodlužují rozsah života 0 ± 40 %.

B. i.v. nádorové modely

Tumory užívané v této studii P388 leukemie, L1210 leukemie a Lewisův plicní karcinom se přechovávají seriální transplantací u syngeneických kmenů myší DBA/2 pro leukemie a C57BL/6 pro Lewisův plicní karcinom. Leukemie se seriově transplantuje i.p. jako ascitová buněčná suspenze, zatímco Lewisův plicní karcinom se seriově transplantuje jako s.c. solidní nádor.

Pro terapeutické zkoušky tumory se asepticky odeberou u myších dárců a připraví se jako suspenze k implantaci testovným zvířatům, které jsou pro každý tumor syngeneické samčí F_1 hybridy B6D2F₁ myší (C57BL/6 x DBA/2). Hladina inokula se mění s typem nádoru. P388 leukemie při 10^6 buněk na myš, L1210 leukemie při 10^5 nebo 10^6 buněk na myš a Lewisův plicní karcinom 0,25 ml 10 % (hmotnost:objem) suspenze. Suspenze Lewisova plicního karcinomu se připraví jak svrchu popsáno pro B16 melanom. Po inokulaci tumoru se myší náhodně rozdělí na léčené skupiny každá o 6 až 8 myších. V každém pokuse jsou tři skupiny neléčených kontrolních myší.

C. s.c. nádorové modely

Tumory užití v těchto studiích se udržují seriovou transplantací u syngeneických kmenů myší C57BL/6 pro: Lewisův plicní karcinom, B16 melanom a jeho F10 podlinii, M5076 sarkom, a adenokarcinom 38 kolon; BALB/c pro karcinom 26 kolon, ADJ-PC6 plasmacytom, Madisonův plicní karcinom a adenokarcinom 51 kolon; C3H pro mamární adenokarcinom 16/c. S výjimkou M5076 sarkomu, který je přechován jako i.p. ascitová buněčná suspenze, všechny ostatní tumory se seriově transplantují jako s.c. solidní tumory.

Pro terapeutické zkoušky, tumory se asepticky odstraní z myších dárců a připraví se pro implantaci s.c. testovným zvířatům. Testovnými zvířaty pro Lewisův plicní karcinom, B16 melanom a jeho F10 podlinii, M5076 sarkom a adenokarcinom 38 kolon jsou syngeneické samičí F_1 hybridy B6D2F myší (C57BL/6 x DBA/2). ADJ-PC6 plasmacytom a karcinom 26 kolon jsou hodnoceny u samic BALB/c myší. Madisonův plicní karcinom a adenokarcinom 51 kolon jsou hodnoceny u syngeneických samic F_1 hybridů CD2F₁ myší (BALB/c x DBA/2). Mamární adenokarcinom 16/c je hodnocen na samicích C3H myší. Inokulum se mění podle druhu nádorů. Adenokarcinom 38 kolon se implantuje trocharem jako 2 mm fragmenty. M5076 sarkom a ADJ-PC6 plasmacytom se implantují jako buněčné suspenze při 5×10^6 a 2×10^6 buněk

na myš. Karcinom 26 kolon, adenokarcinom 51 kodon, Lewisův plicní karcinom, Madisonův plicní karcinom a B16 melanom a jeho F10 podlinie se implantují jako tumorové suspenze připravené jak popsáno svrchu v objemu 0,5 ml. Koncentrace suspenze byla 10 % (hmotnost:objem) výjma karcinomu 26 kolon, pro který koncentrace suspenze byla 5 %. Po inokulaci nádoru se myši náhodně rozdělí do léčených skupin 7 nebo 8 myší. V každém pokuse jsou tři skupiny neléčených kontrolních myší.

Farmaka se rozpustí nebo suspendují ve vhodných vodných vehikulech a podávají se různými aplikačními cestami a v různých léčebných schematech v rozsahu dávkových hladin. Zvířata jsou chována v krabicovitých klecích a denně monitorována na mortalitu. V období, když neléčená kontrolní zvířata mají velké měřitelné tumory (obvykle $> 500 \text{ mm}^3$), se u všech zvířat měří nádory v kolmých průměrech s noniovým posuvným měřidlem a objem nádoru se vypočte ze vzorce: délka $\times$ (šířka)² $\times$ 0,5. Doba měření nádorů závisí na rozličných rychlostech vzrůstu různých nádorů: nejrychleji rostoucí nádory, takové jako Lewisovy a Madisonovy plicní karcinomy, B16 melanom a jeho F10 podlinie se měří mezi 12. a 16. dnem. Pomaleji rostoucí nádory se měří v pozdějších časových bodech: 17. den pro M5076 sarkom, 16. nebo 19. den pro ADJ-PC6 plasmacytom a karcinom 26 kolon, 24. den pro adenokarcinom 51 kolon a 31. den pro adenokarcinom 38kolon. Koncovými body pro aktivitu jsou střední nádorový objem, procento inhibice nádorového růstu relativně k neléčeným kontrolám a počet zvířat bez hmatatelných nádorů ve dni měření. Farmakou je považováno za účinné u těchto nádorových modelů, když vyvolává $\geq 70\%$ inhibici nádorového růstu při nebo pod maximálně tolerovanou dávkou.

Pro vysoce metastasující nádory včetně: Lewisových a Madisonových plicních nádorů, karcinomu 26 kolon a B16 melanomu a jeho F10 podliní, myši nesoucí nádory jsou rovněž monitorovány na dobu přežití. Pro méně metastasující nádorové modely, myši nesoucí nádory jsou zabity po měření ná-

doru. V této sestavě vzestup v rozsahu života větší nebo rovný 30 procentům je považován za průkaz účinnosti farmaka.

II. Synthesa sloučenin vzorce I

V následujících syntetizačních příkladech, teplota je uváděna ve stupních Celsia ($^{\circ}\text{C}$). Pokud není vyznačeno jinak, jsou všechny výchozí materiály získány z komerčních zdrojů.

Příklad 1

Výroba (20S)1,2,6,7-tetrahydrocamptothecinu

32 g, 0,092 mol camptothecinu získaného od Tainjain SKaF Ltd., Tainjain, Čína, byl smísen s Pt^0 /připravené redukci 8,0 g amorfního PtO_2 v 800 ml HOAc po 1,5 hodiny pod 0,1 MPa (1 atmosféra) H_2 a 1,6 l HOAc. Redukce se uskutečnila při 0,1 MPa (1 atm.) H_2 po 8,5 hodiny při silném míchání směsi. Na konci této doby, teoretické množství H_2 se absorbuje (o něco více než 4,1 l) a vychytávání H_2 se značně zpomalí. Reakční směs se zbaví plynu proudem Ar po přibližně 10 minut a pak se filtruje přes vrstvu celitu, která se promyje 200 ml HOAc.

Výsledný roztok se bezprostředně užije v následující reakci popsané v příkladu 2.

Příklad 2

Výroba (20S) 10-hydroxycamptothecinu

K silně míchanému roztoku 1,2,6,7-tetrahydrocamptothecinu připraveném jak svrchu popsáno v příkladu 1, se přidá 64 g, 0,144 mol $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ v jedné porci. Reakční směs se míchá pod Ar 30 minut a všechny $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ se rozpustí. Koncentrací se získá gumovitý zbytek, který se trituruje s 1 litrem ledové

chladné vody, čímž vznikne světle hnědá pevná látka, která se odfiltruje, promyje se dalšími 200 ml ledově chladné vody, tlakově se suší s pryžovou přehradou a vzduchem přes noc. Výsledný částečně vlhký produkt obsahuje 44,3 % 10-hydroxycamptothecinu, 26,9 % 10-acetoxycamptothecinu a 23,1 % camptothecinu podle vysokotlaké kapalinové chromatografické (HPLC) analýze (Whatman Partisil 5 ODS3 Rac II 60% CH₃OH/H₂O).

Surová směs se smísí s 1,7 litrem vodného HOAc a zahřívá se přes noc pod zpětným chladičem. Reakční směs se chladí a koncentruje se přibližně na 50 - 100 ml. Přidá se 1 litr ledově chladné vody a precipitát se odfiltruje, promyje se dalšími 200 ml ledově chladné vody, tlakově suší s pryžovou přehradou a suší se ve vysokém vakuu po dva dny, čímž vznikne 21,16 g materiálu obsahujícího 70,9 % 10-hydroxycamptothecinu, 1,2 % 10-acetoxycamptothecinu a 21,3 % camptothecinu podle HPLC analýzy.

Příklad 3

Výroba acetátové soli (20S) 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu

20 g 10-hydroxycamptothecinu (který byl zkoušen při 62% 10-hydroxycamptothecinu a proto obsahoval 12,4 g, 34,1 mmol 10-hydroxycamptothecinu) připravený jak popsáno v příkladu 2, se smísí s 620 ml HOAc, 12,4 ml (přibližně 149 mmol) 37% vodného CH₂O a 12,4 ml (přibližně 109 mmol) 40% vodného dimethylaminu a míchá se přibližně 18 hodin a chromatografuje na tenké vrstvě indikuje něco zbývajících výchozího materiálu (tlc v 9 : 1 CH₂Cl₂, CH₃OH na silikagelu). Tento systém je vhodný pro sledování vymizení 10-hydroxycamptothecinu, ale ne pro monitorování vytváření produktu. 6 ml (přibližně 72 mmol) dalšího 37% vodného CH₂O a 6 ml (přibližně 53 mmol) 40% vodného

dimethylaminu se přidá, míchání pokračuje dalších 24 hodin. Reakční směs se koncentruje do sucha, trituruje se s 1 litrem 0,5% vodné HOAc, filtruje a pevná látka se promyje dalšími 500 ml 0,5% vodné HOAc. Sušená pevná látka měla hmotnost 6,3 g a rekovertuje se 94 % camptothecinů podle HPLC (Whatman Partisil 10 ODS 3 50% CH₃OH/H₂O; retenční čas 9 minut). Smísené vodné filtráty se extrahují 3 x 600 ml EtOAc a 600 ml petrol-etheru a potom se lyofilizují.

Chromatografie surového zbytku se dosáhne injekcí materiálu v 600 ml rozpouštědla A (rozpuštědlo A = 99% H₂O, 1% HOAc) a elucí při 350 ml/min přes 50 mm x 600 mm ocelový sloupec naplněný 680 g Whatman Partisil 40 ODS 3 se 34 minutovým lineárním gradientem ze 100% rozpouštědla A do 40% rozpouštědla B (rozpuštědlo B = 99% CH₃OH, 1% HOAc). Chromatografie se monitoruje při 410 nm a shromáždí se 1 litr filtrací a ty, které se analyzují při = 99% čistotě analytickou HPLC (Whatman Partisil 10 ODS 3 50% CH₃OH/H₂O, retenční čas 9 minut) se shromáždí, koncentrují, a znovu rozpustí v minimálním množství 0,5% vodné HOAc a lyofilizují se, čímž vznikne 10,58 g (62 %) jmenovaného produktu.

IR (KBr) 3400, 2960, 1740, 1650, 1590 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃/CO₂OD) 1,04 (t, 3, J = 7 Hz, C18), 1,96 (q, 2, J = 7 Hz, C19), 2,01 (s, 3, CH₃CO₂), 2,50 (s, 6, (CH₃)₂NH), 4,20 (s, 2, ArCH₂N), 5,28 (d, 1, J = 19 Hz, C17), 5,29 (s, 2, C5), 5,50 (d, 1, J = 19 Hz, C17), 7,42 (d, J = 9 Hz, C11), 7,67 (s, 1, V14), 8,05 (d, J = 9 Hz, C12), 8,51 (s, C7).

Vypočteno pro C₂₃H₂₃N₃O₅ 1 HOAc 1 H₂O (molekulová hmotnost = 515,5):

vypočteno C 58,24, H 5,67, N 8,15 %

nalezeno C 58,55, H 5,22, N 8,54 %.

Pb analýza s <14,5 ppm.

Další uvedené produktové materiály, které byly >90% čistší podle HPLC (viz svrchu), se koncentrují do sucha a dále rechromatografují s podobnými materiály izolovanými z druhých běhů.

Příklad 4

Výroba acetátové soli (20S) 9-morfolinomethyl-10-hydroxycamptothecinu

100 mg, 0,27 mmol 10-hydroxycamptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 2, 0,5 ml 37% vodného CH_2O , 0,1 ml morfolinu a 10 ml 2 : 1-HOAc/EtOH se smísí a míchá se přes noc. Hydroxycamptothecin reagoval (tlc, silikagel, 9 : 1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$) a reakční směs se koncentruje do sucha, rozpustí se asi v 5 ml vody obsahující několik kapek HOAc a nerozpustný materiál se odfiltruje. Filtrát se lyofilizuje a lyofilizát se chromatografuje (15 mm x 250 mm oxidu křemičitého střední tlakovou kapalinovou chromatografií (MPLC) elucí s CH_2Cl_2 obsahujícím 0 - 2% CH_3OH), čímž vznikne zbytek, který se rozpustí v zředěném vodném HOAc a lyofilizuje se a tím vznikne 53 mg (38 %) výsledné sloučeniny.

IR (KBr) 3400, 3100, 2960, 2920, 2840, 1740, 1650, 1590 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): 1,12 (t, 3, $J = 7$ Hz, C18), 1,94 (q, 2, $J = 7$ Hz, C19), 2,73 (m, 4, morfolino- CH_2N), 3,83 (m, 4, morfolino- CH_2O), 4,19 (s, 2, ArCH_2N), 5,26 (s, 2, C5), 5,25 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 5,76 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 7,27 (s, 1, C14), 7,40 (d, 1, $J = 8$ Hz, CH), 8,07 (d, 1, $J = 8$ Hz, C12), 8,36 (s, 1, C7).

Analýza pro $\text{CH}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot \text{CH}_3 \text{CO}_2\text{H}$ (molekulová hmotnost = 525,6)

vypočteno C 61,71, H 5,95, N 8,00 %

nalezeno C 61,30, H 5,44, N 8,35 %.

Příklad 5

Výroba acetátové soli (20S) 9-N-methylpiperazinylmethyl-10-hydroxycamptothecinu

100 mg, 0,27 mmol 10-hydroxycamptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 2, 10 ml 2 : 1 HOAc/EtOH, 0,5 ml 37% vodného CH_2O a 0,1 ml N-methylpiperazinu se smísí a míchá se 20 hodin. 10-hydroxycamptothecin reaguje (tlc 9 : 1 CH_2Cl_2 / CH_3OH) a reakční směs se koncentruje, rozpustí se v 50 ml vody a promyje se 5 x 20 ml EtOAc a 20 ml petroletheru a vodná fáze se lyofilizuje. Zbytek se znovu rozpustí ve zředěném vodném HOAc a chromatografuje se na MPLC (Whatman Partisil 40 ODS 3, 9 mm x 250 mm sloupce) elucí s 0 až 20% CH_3OH v H_2O obsahující 0,02% HOAc. Žádaný lyofilisát poskytne 67 mg (46 %) výsledné sloučeniny.

IR (KBr) 3400, 2960, 2910, 1740, 1650, 1590 cm^{-1} .

^1H -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): 1,03 (t, 3, $J = 7$ Hz, C18), 1,89 (q, 2, $J = 7$ Hz), 2,02 (s, 3, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), 2,37 (s, 3, NCH_3), 2,65 m, 1,8, piperazin- CH_2), 4,21 (s, 2, ArCH_2), 5,26 (s, 2, C5), 5,30 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 5,71 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 7,45 (d, 1, $J = 7$ Hz, C11), 8,05 (d, 1, $J = 7$ Hz, C12), 8,47 (s, 1, C7).

Analýza pro $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 1,5 \text{ HOAc} \cdot 1/2 \text{ H}_2\text{O}$ (molekulární hmotnost = 528,1)

vypočteno C 61,41, H 6,01, N 10,61 %

nalezeno C 61,62, H 5,74, N 10,93 %.

Příklad 6

Výroba acetátové soli (20S) 9-(4'-piperidinopiperidinyl)-methyl-10-hydroxycamptothecinu

100 mg, 0,27 mmol 10-hydroxycamptothecin připraveného jak popsáno v příkladu 2, 100 mg, 0,60 mmol 4-piperidino-piperidinu, 0,5 ml 37% vodného CH_2O a 10 ml 2 : 1 HOAc/EtOH se míchají 20 hodin. 10-hydroxycamptothecin reaguje (tlc, silikagel, 9 : 1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$) a reakční směs se koncentruje, rozpustí se v 1% vodné kyselině octové, filtruje se a lyofilizuje se. MPLC (Whatman Partisil 40 ODS 3 9 x 250 mm sloupec) elucí se 100 ml vody a pak 0 až 8 % CH_3OH v 0,02% vodné HOAc poskytne 44 mg (30 %) výsledné sloučeniny po lyofilizaci.

IR (KBr) 3400, 2940, 1745, 1660, 1590 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 0,99 (t, 3, $J = 7$ Hz, C18), 1,3 - 3,3 (m, 19, piperidin, C19), 4,11 (s, 2, CH_2N), 5,21 (s, 2, C5), 5,25 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 5,70 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 7,85 (d, 1, $J = 7$ Hz, C11), 7,59 (s, 1, C14), 8,00 (d, 1, $J = 7$ Hz, C12), 8,35 (s, 1, C7).

Analýza pro $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$ (molekulární hmotnost = 631,7)

vypočteno C 58,94, H 6,22, N 8,81 %

nalezeno C 59,02, H 6,44, N 8,53 %.

Příklad 7

Výroba acetátové soli (20S)-9-(2'-hydroxyethylamino)methyl-10-hydroxycamptothecin

200 mg, 0,55 mmol 10-hydroxycamptothecin vyrobeného jak popsáno v příkladu 2, 16 mg, 0,55 mmol paraformaldehydu, 61 mg, 1,1 mmol ethanolaminu a 6 ml HOAc se 48 hodin míchá, po kterých většina 10-hydroxycamptothecin reagovala. Reakční směs se koncentruje, znovu rozpustí ve 200 ml zředěné HOAc a promyje se 4 x 30 ml EtOAc a 30 ml petroletheru a výsledný vodný roztok se lyofilizuje. Surový lyofilizát se rozpustí v 50 ml vody. MPLC (Whatman Partisil 40 ODS 3, 15 mm x 250 mm sloupec) elucí se 100 ml vody a potom 0 až 10 % CH_3OH v 0,02% HOAc ve vodě poskytne 88 mg (33 %) výsledné sloučeniny po lyofilizaci.

IR (KBr) 3400, 2980, 2940, 1750, 1570 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): 1,03 (t, 3, $J = 7$ Hz, C18), 1,89 (q, 2, $J = 7$ Hz, C19), 2,00 (s, 3, HOAc), 3,03 (m, 2, CH_2NH), 3,75 (m, 2, CH_2OH), 4,49 (s, ArCH_2NH), 5,24 (s, 2, C5), 5,30 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 5,70 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 7,41 (d, 1, $J = 8$ Hz, C11), 7,6 (s, 1, C14), 8,00 (d, 1, $J = 8$ Hz, C12), 8,48 (s, 1, C7).

Analýza pro $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$ HOAc 1 1/8 H_2O (molekulární hmotnost = 531,3)

vypočteno C 56,52, H 5,83, N 7,91 %

nalezeno C 56,07, H 5,40, N 8,27 %.

Příklad 8

Výroba methansulfonátové soli (20S)-9-trimethylammonium-methyl-10-hydroxycamptothecin

65 mg, 0,14 mmol acetátové soli 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu, připraveného jak popsáno v příkladu 3, se rozpustí v asi 70 ml CH_2Cl_2 a filtruje se. Filtrát se smísí s 1 ml methylmethansulfonátu, chladí se a částečně se koncentruje pod proudem argonu (Ar). Po 4 hodinách se rozpouštědlo koncentruje na poloviční objem a chladí se. Precipitát se filtruje, rozpustí se v 10 ml vody, promyje 3 x 10 ml EtOAc a potom 10 ml petroletherem a lyofilizuje se, čímž vznikne 50 mg (60 %) výsledné sloučniny.

IR (KBr) 3400, 2950, 2900, 1760, 1660, 1600 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): 1,03 (d, 3, $J = 7$ Hz, C18), 2,01 (q, 2, $J = 7$ Hz, C19), 2,78 (s, >3, CH_3SO_3), 2,94 (s, 9, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 4,72 (s, 2, ArCH_2N), 5,20 (s, 2, C5), 5,22 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 5,67 (d, 1, $J = 16$ Hz, C17), 7,62 (d, $J = 7$ Hz, C11), 7,71 (s, C14), 8,16 (d, 1, $J = 7$ Hz, C12), 8,89 (s, 1, C7),

Analýza pro $C_{24}H_{25}N_3O_5 \cdot 1,5 CH_3H_2O$ (mol.hmotnost = 615,7)
vypočteno C 49,74, H 5,72, N 6,82 %
nalezeno C 49,36, H 5,15, N 7,53 %.

Příklad 9

Výroba (20S)-9-formyl-10-hydroxycaptothecinu

100 mg, 0,27 mmol 10-hydroxycaptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 2, 0,80 mg, 5,5 mmol hexamethyltetraaminu a 15 ml kyseliny trifluoroctové (TEA) se 20 hodin zahřívá pod zpětným chladičem pod argonem. Reakční směs se koncentruje, smísí se s 15 ml vody a míchá se 1 hodinu, přidá se 75 ml vody a pH se upraví na 3,4 přidáním $NaHCO_3$. Vodná fáze se promyje 3 x 75 ml EtOAc, okyslí se na pH 1,5 3N HCl a potom se extrahuje 5 x 75 ml EtOAc. Smísené organické extrakty se promyjí 5 x 75 ml 1N HCl, 75 ml vody a 25 ml nasyceného vodného roztoku NaCl a koncentrují se. Zbytek se pak přečistí rychlou chromatografií (1 cm x 15 cm oxid křemičitý se surovým materiálem preabsorbovaným na vložce 1 cm x 1 cm Na_2SO_4). Produkt se eluuje s 1% CH_3OH v CH_2Cl_2 , čímž vznikne 50 mg (47 %) výsledné sloučeniny. Analyticky čistý vzorek se získá frakcionovanou precipitací z přibližně 25% CH_3OH v CH_2Cl_2 pomalým chlazením a koncentrací pod proudem dusíku.

IR (KBr) 3400, 3100, 2950, 1755, 1660, 1600 cm^{-1} .

1H -NMR (CCl_3D/CD_3OD): 1,04 (t, 3, J = 7 Hz, C18), 1,96 (d, 2, J = 7 Hz, C19), 5,32 (d, 1, J = 14 Hz, C17), 5,33 (s, 2, C5), 5,68 (d, 1, J = 14 Hz, C17), 7,50 (d, 1, J = 9 Hz, C11), 7,67 (s, 1, C14), 8,33 (d, 1, J = 9 Hz, C12), 9,34 (s, 1, C7).

Analýza pro $C_{21}H_{16}H_2O_6 \cdot 1 H_2O$ (mol.hmotnost = 410,39)

vypočteno C 61,46, H 4,42, N 6,83 %
nalezeno C 61,09, H 4,17, N 6,52 %.

Příklad 10

Výroba soli (20S)-9-cyklopropylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu

Směs 254 mg, 0,7 mmol 10-hydroxycamptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 2, 1,0 ml, 37% vodného formaldehydu, 400 mg, 0,7 mmol cyklopropylaminu v 16 ml ledové kyseliny octové a 8 ml ethanolu se přes noc míchá při teplotě místnosti a koncentruje se ve vakuu do sucha. Zbytek se trituruje s vodou, filtruje se a suší, čímž vznikne 260 mg (75% výtěžek) zmíněné sloučeniny jako její acetátová sůl, která se přemění ve zmíněnou hydrochloridovou sůl triturací s 0,1 N HCl.

Analýza pro $C_{24}H_{23}N_3O_5 \cdot HCl \cdot 3H_2O$

vypočteno C 55,01, H 5,57, N 8,02 %

nalezeno C 54,94, H 5,18, N 8,18 %.

1H -NMR (D_2O): 0,96 (m, 7), 2,1 (m, 2), 2,8 (m, 1), 4,6 (s, 2), 4,8 (s, 2), 5,2 (s, 2), 7,2 (s, 1), 7,5 (q, 2), 8,6 (s, 1).

Příklad 11

Výroba (20S)-9-ethoxymethyl-10-hydroxycamptothecinu

Směs 364 mg, 1,0 mmol 10-hydroxycamptothecinu připraveného jak posáno v příkladu 2, 90 mg, 1,1 mmol dimethylaminohydrochloridu a 1,5 ml 37% vodného formaldehydu se zahřívá pod zpětným chladičem ve 25 ml 95% ethanolu 5,5 hodiny. Reakční směs se koncentruje na malý objem a precipitovaný produkt se shromáždí a suší. Přечиštění silikagelovou chromatografií elucí s 3% MeOH v CH_2Cl_2 poskytne 85 mg (20% výtěžek) výsledné sloučeniny.

FAB spektrum: m/e 423 (MH^+).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO): 0,85 (t, 3), 1,1 (t, 3), 1,9 (m, 2), 3,5 (s, 2), 4,8 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,4 (s, 2), 7,2 (s, 1), 7,7 (m, 2), 8,6 (s, 1).

Analýza pro $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$

vypočteno C 62,08, H 5,27, N 6,29 %

nalezeno C 61,80, H 5,22, N 6,12 %.

Příklad 12

Výroba (20S)-9-(N-methylanilinomethyl)-10-hydroxycamptothecinu

Směs 254 mg, 0,7 mmol 10-hydroxycamptothecinu vyrobeného jak popsáno v příkladu 2, 1,0 ml 37% vodného formaldehydu, 0,75 ml, 0,7 mmol N-methylanilinu v 16 ml ledové kyseliny octové a 8 ml ethanolu se míchá 40 hodin při teplotě místnosti. Po koncentraci na olej, částečné přečištění se získá silikagelovou chromatografií elucí 1,2 a 3% MeOH v CH_2Cl_2 . Frakce produkce stále ještě obsahují v methylanilin. Dalšího přečištění se dosáhne užitím silikagelového MPLC sloupce a produkt se eluuje s 2% MeOH v CH_2Cl_2 . Frakce produktu se smísí a koncentrují se ve vakuu, čímž vznikne 77 mg (24 %) výsledné sloučeniny jako žluté pevné látky.

DCI-spektrum: m/e 484 (MH^+).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,0 (t, 3), 1,9 (m, 2), 2,8 (s, 3), 5,0 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,5 (q, 2), 6,9 (m, 5), 7,5 (s, 1), 7,9 (q, 2), 8,4 (s, 1).

Analýza pro $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 1,2 \text{ H}_2\text{O}$

vypočteno C 66,58, H 5,74, N 8,32 %

nalezeno C 66,97, H 5,69, N 7,91 %.

Příklad 13

Výroba hydrochloridové soli (20S)-9-cyklohexylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu

Směs 364 mg, 1,0 mmol 10-hydroxycamptothecinu připraveného podle popisu v příkladu 2, 1,5 ml, 37% vodného formaldehydu, 1,3 ml, 10 mmol cyklohexylaminu ve 25 ml ledové kyseliny octové a 12 ml ethanolu se přes noc míchá při teplotě místnosti a koncentruje se ve vakuu do sucha. Zbytek se přečistí na MPLC sloupci v reversní fázi elucí s 15% vodným MeOH obsahujícím 0,02 % ledové kyseliny octové. Po koncentraci na malý objem a lyofilizaci se získá výsledná sloučenina jako acetátová sůl (250 mg, 47 %). Acetátová sůl se přemění na výslednou hydrochloridovou sůl přidáním 0,1N HCl a spůl se shromáždí filtrací.

^1H -NMR (DMSO): 0,9 (t, 3), 1,0 - 2,0 (m, 10), 3,1 (s, 1), 4,5 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,4 (s, 2), 7,2 (s, 1), 7,9 (q, 2), 8,9 (s, 1).

Analýza pro $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{HCl} \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$

vypočteno C 60,93, H 6,11, N 7,89 %

nalezeno C 60,83, H 5,98, N 7,75 %

Příklad 14

Výroba hydrochloridové soli (20S)-9-N,N-dimethylaminoethyloxymethyl-10-hydroxycamptothecinu

Směs 100 mg, 0,2 mmol vodné báze 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu připravené jak popsáno v příkladu 21, ve 4 ml 2-dimethylaminoethanolu obsahujícího tři kapky 3N HCl se zahřívá pod argonem při 80 °C po 24 hodin. Na polopevnou reakční směs se působí 5 m vody a 10 ml isopropanolu, míchá se a filtruje, čímž vznikne 60 mg (59 %) výsledné sloučeniny.

^1H -NMR (DMSO): 0,9 (t, 3), 1,35 (m, 2), 2,3 (s, 6), 3,3 (s, 2), 4,1 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,4 (s, 2), 7,3 (s, 1), 7,4 (d, 1),

8,0 (d, 1), 8,7 (s, 1).

Analýza pro $C_{25}H_{27}N_3O_6 \cdot HCl \cdot 0,5 H_2O$

vypočteno: C 58,77, H 5,72, N 8,25 %

nalezeno C 58,94, H 4,92, N 7,90 %.

Příklad 15

Výroba hydrochloridové soli (20S)-9-N,N-dimethylaminoethyl-thiomethyl-10-hydroxycamptothecinu

Směs 100 mg, 0,2 mmol hydrochloridové soli 9-dimethyl-10-hydroxycamptothecinu připraveného v podstatě jako v příkladu 18, a 560 mg, 4 mmol 2-dimethylaminoethanthiol-HCl ve 13 ml DMF se zahřívá na 85 °C pod argonem 5 hodin. Nerozpustná pevná látka (přebytek thiolu) se odstraní filtrací a filtrát se ve vakuu koncentruje na olejovitý zbytek, který se přečistí s užitím MPLC v reversní fázi. Produkt se slučuje s užitím 5% a 10% MeOH ve vodě, čímž vznikne 45 mg (41 %) výsledné sloučeniny jako žluté pevné látky.

1H -NMR (D₂O): 1,0 (t, 3), 1,9 (m, 2), 2,8 (s, 6), 4,4 (s, 2), 5,3 (s, 2), 7,1 (d, 1), 7,2 (s, 1), 7,6 (d, 1), 8,2 (s, 1).

Analýza pro $C_{25}H_{28}N_3O_5S \cdot HCl \cdot 3 H_2O$

vypočteno C 49,34, H 5,79, N 6,90 %

nalezeno C 48,98, H 5,82, N 6,54 %.

Příklad 16

Výroba dihydrochloridové soli (20S)-9-N,N-dimethylaminoethyl-aminomethyl-10-hydroxycamptothecinu

Směs 364 mg, 1,0 mmol 10-hydroxycamptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 2, 100 mg, 1,1 mmol N,N-dimethylethyldiaminu, 1,5 ml 37% vodného formaldehydu ve 25 ml ledové kyseliny octové a 10 ml ethanolu se míchá při teplotě

místnosti 64 hodin. Rozpouštědlo se ve vakuu odstraní a na pevný zbytek se působí 10 ml vody a 10 ml isopropanolu obsahujícího 3 ml 3N HCl. Konečně precipitovaná pevná látka se shromáždí, promyje se isopropanolem a suší se, čímž vznikne 218 mg (40%-výtěžek) výsledné sloučeniny.

^1H -NMR (CD_3OD): 1,0 (t, 3), 1,9 (m, 2), 2,9 (s, 6), 4,5 (s, 2), 5,1 (m, 4), 5,4 (q, 2), 7,3 (d, 1), 7,5 (s, 1), 7,8 (d, 1), 8,4 (s, 1).

Analýza pro $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2\text{HCl}$

vypočteno C 55,87, H 5,63, N 10,42 %

nalezeno C 55,91, H 5,72, N 9,86 %.

Příklad 17

Výroba acetátové soli (20R,S)-9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu

Výsledná sloučenina se vyrobí jak popsáno v příkladu 3 s výjimkou, že výchozí materiál je racemický 10-hydroxycamptothecin připravený podle metody Wani a další, J. Med. Chem., 23, 554 (1980).

Příklad 18

Výroba monohydrochloridové soli (20S)-9-dimethylaminoethyl-10-hydroxycamptothecinu

Acetátová sůl 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 3, která byla analyzována na 2,5 ekvivalentů kyseliny octové a 0,75 ekvivalentů vody (8,5 g, 14,5 mmol založeno na molekulární hmotnosti 585) se rozpustí ve 170 ml, 17 mmol 0,1N kyselině chlorovodíkové, lyofilizuje se a pumpuje se pod vysokým vakuem po 3 dny, čímž vznikne 8,3 g výsledné sloučeniny.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): 0,5 (t, 3, $J = 7,5$), 1,98 (q, 2, $J = 7,5$ Hz), 2,95 (s, 6), 4,77 (s, 2), 5,33 (s, 2), 5,36 (d, 1, $J = 16$ Hz), 5,62 (d, 1, $J = 16$ Hz), 7,59 (d, 1, $J = 9$ Hz), 7,66 (s, 1), 8,20 (d, 1, $J = 9$ Hz), 8,86 (s, 1).

Analýza pro $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

vypočteno C 53,96, H 5,91, N 8,21, Cl 6,92 %

nalezeno C 53,68, H 5,61, N 8,16, Cl 6,84 %.

Příklad 19

Výroba dihydrochloridové soli (20S)-9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu

0,389 g, 1,07 mmol podle HPLC analogy, acetátové soli 8-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu připravené jak popsáno v příkladu 3 se rozpustí v 6 ml, 2,4 mmol 0,4N HCl, lyofilizuje se a pumpuje pod vysokým vakuem 40 hodin, čímž vznikne 0,269 g výsledné sloučeniny.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): 1,05 (t, 3, $J = 7,5$ Hz), 1,92 (q, 2, $J = 7,5$ Hz), 3,01 (s, 6), 4,85 (s, 2), 5,31 (d, 1, $J = 16$ Hz), 5,36 (s, 2), 5,65 (d, 1, $J = 16$ Hz), 7,64 (d, 1, $J = 9$ Hz), 7,73 (s, 1), 8,23 (d, 1, $J = 9$ Hz), 9,07 (s, 1).

Analýza pro $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

vypočteno C 50,37, H 5,70, N 7,66, Cl 12,93 %

nalezeno C 50,76, H 5,64, N 7,57, Cl 12,61 %.

Příklad 20

Výroba sodné soli (20S)-9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu

Na 100 mg, 0,2 mmol acetátové soli 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 3 se působí 4,5 ml, 0,45 mmol 0,1N hydroxid sodného a roztok

se nechá projít přes H-20 pryskyřicový sloupec (2 x 22 cm). Pryskyřice se promyje 250 ml vody a produkt se eluuje 1:1 směsí vody a methanolu. Frakce obsahující produkt se smísí, koncentrují se na malý objem a lyofilizují se, čímž vznikne 93 mg (93 %) výsledné sloučeniny.

IR (nujol) 1600 cm^{-1} , (karboxylát).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 0,65 (m, 3), 1,8 (m, 2), 2,8 (s, 6), 3,0 (m, 2), 4,21 (s, 2), 4,5 (s, 2), 7,1 (q, 2), 7,2 (s, 1), 7,8 (s, 1).

Analýza pro $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na} \cdot 1,5\text{ H}_2\text{O}$

vypočteno C: 56,55, H 5,57, N 8,60 %

nalezeno C 56,21, H 5,65, N 8,44 %.

Příklad 21

Výroba volné baze (20S)-9-dimethylaminomethyl-10-hydroxy- camptothecinu

Směs 729 mg, 2,0 mmol 10-hydroxycamptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 2, v 50 ml. ledové kyseliny octové, 20 ml ethanolu, 3 ml 37% vodného formaldehydu a 3 ml 40% vodného dimethylaminu se míchá za teploty místnosti 20 hodin. Rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku, zbytek se zahřívá na 50°C pod vysokým vakuem 2 hodiny a trituruje 10 ml isopropanolu, aby precipitovalo 561 mg (64 %) výsledné sloučeniny jako žlutá pevná látka. FAB hmotové spektrum: m/e 422 (MH^+).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): 1,0 (t, 3), 1,9 (m, 2), 2,5 (s, 6), 4,3 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,4 (q, 2), 7,6 (s, 1), 7,7 (q, 2), 8,5 (s, 1).

Příklad 22

Výroba trifluormethylsulfonátu(triflát) (20S)-10-hydroxycamptothecinu

Ke směsi 1,44 g, 4,0 mmol 10-hydroxycamptothecinu připraveného jak popsáno v příkladu 2, ve 40 ml DMF se přidá 1,2 g, 12 mmol triethylaminu a potom se přidá 2,0 g, 6 mmol N-fenyltrifluormethansulfonimidu. Reakční směs se zahřívá při 50 °C 3 dny. Rozpouštědlo se ve vakuu odstraní a zbytek se trituruje vodou, filtruje se a suší. Teoretický výtěžek surového produktu se získá jako jediná skvrna chromatografií na tenké vrstvě (TLC) vykazující něco původních nečistot. Malý vzorek sepřečistí rychlou chromatografií na silikagelovém sloupci elucí produktu 2% MeOH v CH₂Cl₂.

¹H-NMR (CDCl₃): 1,0 (t, 3), 1,9 (m, 2), 5,3 (s, 2), 5,4 (q, 2), 7,7 (s, 1), 7,6 - 7,9 (m, 2), 8,2 (d, 2), 8,5 (s, 1).

FAB hmotové spektrum m/e 497 (MH⁺), 495 (M-H)⁻.

Analýza pro C₂₁H₁₅N₂SF₃

vypočteno C 50,81, H 3,05, N 5,64 %

nalezeno C 51,38, H 3,42, N 4,99 %.

Příklad 23

Výroba (20S)-9-dimethylaminomethylcamptothecinu

Acetátová sůl trifluormethansulfonát (20S)-9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu se připraví in situ jak následuje. Na směs 482 mg, 1 mmol acetátové soli 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecinu připravené jak popsáno v příkladu 3 ve 40 ml N,N-dimethylformamidu (DMF) pod argonem se působí 268 mg, 2,5 mmol 2,6-lutidinu a 0,54 g, 1,5 mmol N-fenyltrifluormethansulfonamidu. Reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti. Pak se ke svrchu vytvořenému

filtrátu přidá 0,4 ml, 3,0 mmol triethylaminu, 8 mg, 0,04 mmol paladiumacetátu, 20 mg, 0,08 mmol trifenylofosfinu a 0,08 ml koncentrované kyseliny mravenčí. Reakční směs se 8 hodin zahřívá při 60 °C. Rozpouštědlo se ve vakuu odstraní a zbytek se trituruje malým množstvím vody a filtruje se. Sušená, surová nerozpustná pevná látka měla hmotnost 550 mg. Přečistí se rychlou chromatografií na silikagelovém sloupci elucí malým množstvím výchozího triflátu s trifenylofosfátem k získání 25 mg (7%) 9-methylcamptothecinu, 88 mg (20%) výsledné sloučeniny jako volné báze (4% MeOH v CH_2Cl_2) a nějaký trifluormethylsulfonát 10-hydroxycamptothecinu s 10% MeOH v CH_2Cl_2 . Malé množství výsledné sloučeniny se přemění na acétátovou sůl působením zředěné kyseliny octové.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 0,9 (t, 3), 1,8 (m, 2), 2,2 (s, 6), 3,7 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,4 (q, 2), 7,3 (d, 1), 7,5 (d, 1), 7,6 (2,1), 8,0 (d, 1), 3,3 (s, 1).

Hmotové spektrum m/e 406 (MH^{30}).

Analýza pro $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$

vypočteno C 58,81, H 6,12, N 8,23 %

nalezeno C 58,60, H 5,88, N 7,88 %.

Příklad 24

Výroba 10-kyanocamptothecinu

Roztok 444 mg, 1,4 mmol tributylcínkyanidu a 276 mg, 0,6 mmol tetrakis(trifenylofosfin)paladia ve 20 ml 1,2-dichloroethanu se zahřívá pod zpětným chladičem pod argonem 2 hodiny k vytvoření paladiumcín-kyanidového komplexu. Pak se 266 mg, 0,6 mmol trifluormethylsulfonátu 10-hydroxycamptothecinu, připraveného jak popsáno v příkladu 22. Přidá a zahřívá pod zpětným chladičem a zahřívání pod zpětným chladičem pokračuje po 3,5 hodiny. Reakční směs se koncentruje na třetinu svého původního objemu a trituruje se se stejným objemem diethyl-

etheru. Precipitovaná žlutá pevná látka se shromáždí a suší se. Výsledná sloučenina se získá v 82% surovém výtěžku 183 mg. Po přečištění rychlou chromatografií, výsledná sloučenina eluovala s 2% MeOH v CH_2Cl_2 a získá se 115 mg.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 0,9 (t, 3), 1,8 (m, 2), 2,2 (s, 6), 3,7 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,4 (q, 2), 7,3 (d, 1), 7,5 (d, 1), 7,6 (2, 1), 8,0 (d, 1), 3,3 (s, 1).

Hmotové spektrum m/e 406 (MH^{30}).

Analýza pro $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$

vypočteno C 58,81, H 6,12, N 8,23 %

nalezeno C 58,60, H 5,88, N 7,88 %.

Příklad 25

Výroba (20S)-10-formylcamptothecinu

Plamenem vysušená baňka se naplní 100 mg, 0,22 mmol trifluormethylsulfonátu 10-hydroxycamptothecinu, připraveného jak popsáno v příkladu 22, 10 ml čerstvě destilovaného tetrahydrofuranu (THF) a 10 mg, 9 mmol tetrakis(trifenylfosfin)palladia. Oxid uhelnatý (CO) se bublá do reakční směsi 3 minuty a pak se reakční směs uzavře CO balonem a ponoří se v olejové lázni při 50 °C. Za míchání a použití ruční pumpy se po kapkách přidá roztok 0,73 ml Br_3SnH ve 3 ml bezvodého THF v průběhu čtyřhodinového období. Po této době se ve vakuu odstraní rozpouštědlo a zbytek se přečistí rychlou chromatografií (1 až 2% CH_3OH , CH_2Cl_2), následovanou konečnou purifikací s užitím chromatotronu (Harrison Research, Palo Alto, Californie). Výsledná sloučenina eluovaná s 2% MeOH v CH_2Cl_2 měla 20 mg (24 %).

Hmotové spektrum m/e 377 (MH^+).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 9P.9 (t, 3), 1,9 (m, 2), 5,3 (split s, 2), 5,4 (q, 2), 7,7 (d, 1), 7,8 - 8,3 (m, 3), 8,5 (s, 1), 9,9 (s, 1).

Analýza pro $C_{21}H_{16}N_2O_5 \cdot 1 \frac{1}{3} H_2O$
vypočteno C 61,84, H 4,69, N 6,86 %
nalezeno C 61,83, H 4,53, N 6,37 %.

Příklad 26

Výroba acetátové soli (20S)-10-aminomethylcamptothecinu

Na roztok 160 mg, 0,4 mmol 10-kyanocamptothecinu, připraveného jak popsáno v příkladu 24, ve 45 ml ledové kyseliny octové se působí aktivovaným Raneylovým niklem a hydrogenuje se při 0,07 mPa (1785,8 g/cm) po 7 hodin. Katalyzátor se odstraní filtrací přes supercel a filtrát se ve vakuu koncentruje. Pevný zbytek se přečistí chromatografií při středním tlaku na sloupci v reversní fázi elucí produktu 10 % MeOH ve vodě. Po sušení mražením se získá 25 mg (15 %) hygroskopické výsledné sloučeniny.

1H -NMR (D_2O): 1,0 (t, 3), 1,9 (m, 2), 4,3 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,4 (s, 2), 7,5 (s, 1), 7,7 - 8,1 (m, 3), 8,6 (s, 1).

Analýza pro $C_{23}H_{23}N_3O_6 \cdot 6H_2O$
vypočteno C 50,63, H 6,46, N 7,73 %
nalezeno C 50,11, H 6,57, N 7,64 %.

Příklad 27

Výroba acetátové soli (20S)-10-aminomethylcamptothecinu

Na roztok 160 mg, 0,42 mmol 10-kyanocamptothecinu, připraveného jak popsáno v příkladu 24, ve 45 ml ledové kyseliny octové se působí aktivovaným Raneyovým niklem a hydrogenuje se při 0,07 MPa (1785,8 g/cm) po 7 hodin. Katalyzátor se filtruje přes supercel (95% SiO_2), koncentruje se ve vakuu a

purifikuje se na sloupci v reverzní fázi. Produkt eluoval v 10% MeOH H_2O , obsahující 0,02% kyseliny sírové. Po shromáždění frakcí, koncentruje na malý objem a lyofilizací se získá 26 mg (14 %) výsledné sloučeniny.

1H -NMR ($D_2O/MeOD_4$): 1,0 (t, 3), 2,0 (m, 2), 4,3 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,5 (s, 2), 7,5 (s, 1), 8,0 (m, 3), 8,6 (s, 1).

Analýza pro $C_{23}H_{23}N_3O_6$

vypočteno C 50,53, H 6,46, N 7,73 %

nalezeno C 50,11, H 6,57, N 7,64 %.

Příklad 23

Výroba (20S)-9-morfolinomethylcamptothecinu

Na 1 mmol roztoku trifluormethylsulfonátu 10-hydroxy-9-morfolinomethylcamptothecinu, připravený jak popsáno v příkladu 23, ve 25 ml bezvodého DMF se působí 0,4 ml triethylaminu, 8 mg, 0,08 mmol Pd (kyselina octová) $_2$, 20 mg, 0,08 mmol ϕ_3P a 0,08 ml, 2 mmol 99% kyseliny mravenčí. Reakce se zahřívá pod argonem na 60 °C 6 hodin; koncentruje se ve vakuu a působí se na ní vodou. Jak žádaná výhodná sloučenina, tak hlavní vedlejší produkt 9-methylcamptothecin vyprecipituje (300 mg) a shromáždí se filtrací, purifikací silikagelovou rychlou chromatografií. 9-methylcamptothecin se izoluje elucí 1% MeOH v CH_2Cl_2 (45 mg, 13 %). Eluce s 2% MeOH v CH_2Cl_2 poskytně 93 mg (20 %) výsledné sloučeniny.

1H -NMR ($CDCl_3/MeOD_4$): 1,0 (t, 3), 2,0 (m, 2), 2,5 (m, 4), 3,7 (m, 4), 4,0 (s, 2), 5,3 (s, 2), 5,6 (q, 2), 7,5 (d, 1), 7,6 (s, 1), 7,7 (d, 1), 8,2 (d, 1), 9,0 (s, 1).

Hmotové spektrum m/e 448 (MH^+).

Analýza pro $C_{25}H_{25}N_3O_5 \cdot 0,5 H_2O$

vypočteno C 65,78, H 5,74, N 9,20 %

nalezeno C 65,87, H 5,96, N 9,00 %.

Příklad 29

Výroba (20S) 10-hydroxy-9-kyanomethylcamptothecinu

Směs 0,42 g, 0,3 mmol methansulfonátové soli 9-trimethylammoniummethyl-10-hydroxycamptothecinu, připravené jak popsáno v příkladu 8 ve 35 ml 95% EtOH a 1,26 g, 25 mmol kyanidu sodného se zahřívá pod zpětným chladičem pod argonem po 3 hodiny. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu, přidá se 20 ml vody a pH se upraví na pH 1,5 3N HCl. Precipitovaná surová pevná látka se shromáždí a suší. Přechčištění se uskuteční rychlou silikagelovou chromatografií na sloupci. Produkt byl eluován se 4% a 5% MePH v CH_2Cl_2 , čímž poskytl 110 mg (33 %) výsledné sloučeniny.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}_4$): 0,9 (t, 3, 1,8 (m, 2), 4,2 (s, 2), 5,2 (s, 2), 5,3 (q, 2), 7,5 (d, 1), 7,6 (s, 1), 7,9 (d, 1), 8,4 (s, 1).

Analýza pro $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 1 \frac{3}{4} \text{H}_2\text{O}$

vypočteno C 60,75, H 4,58, N 9,66 %

nalezeno C 60,63, H 4,64, N 9,60 %.

Příklad 30

Výroba acetátové soli (20S)-10-hydroxy-9-aminoethylcamptothecinu

Na roztok 60 mg, 0,15 mmol 10-hydroxy-9-kyanomethylcamptothecinu, připraveného jak popsáno v příkladu 29, ve 30 ml ledové kyseliny octové se působí přibližně 1 g (vlhká hmotnost) Raneyova niklu a hydrogenuje se při 0,07 MPa (~~1785,8 g/cm~~) 6 hodin. Katalyzátor se odstraní filtrací a filtrát se koncentruje ve vakuu na pevný zbytek. Koncentrovaný filtrát se pak rozpustí ve vodě a čistí se chromatografií na sloupci v

reversní fázi eluováním produktu 10% MeOH ve vodě (obsahující 0,02 % ledové kyseliny octové). Vhodná frakce se shromáždí, koncentruje se na malý objem a mrazově suší přes noc s výnosem 23 mg (33 %) výsledné sloučeniny.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): 0,9 (t, 3), 1,9 (m, 2), 3,2 (s, 2), 5,0 (3,2), 5,1 (s, 2), 5,4 (s, 2), 7,2 (s, 1), 7,5 (q, 2), 8,4 (s, 1).

III. Příklady farmaceutických přípravků

Příklad A

Parenterální přípravek

K přípravě parenterálního farmaceutického přípravku podle vynálezu vhodného pro aplikaci injekcí se 100 mg ve vodě rozpustné soli sloučeniny vzorce I smísí s 10 ml 0,9 % sterilního roztoku NaCl a směs se naplní do vhodné dávkové jednotkové formy vhodné pro injekční aplikaci.

Příklad B

Orální přípravek

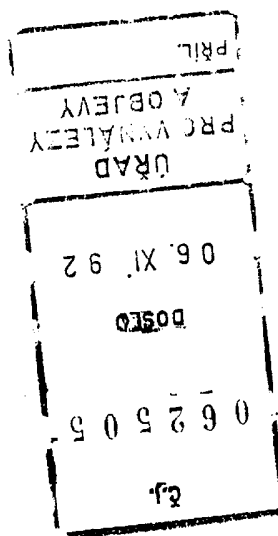
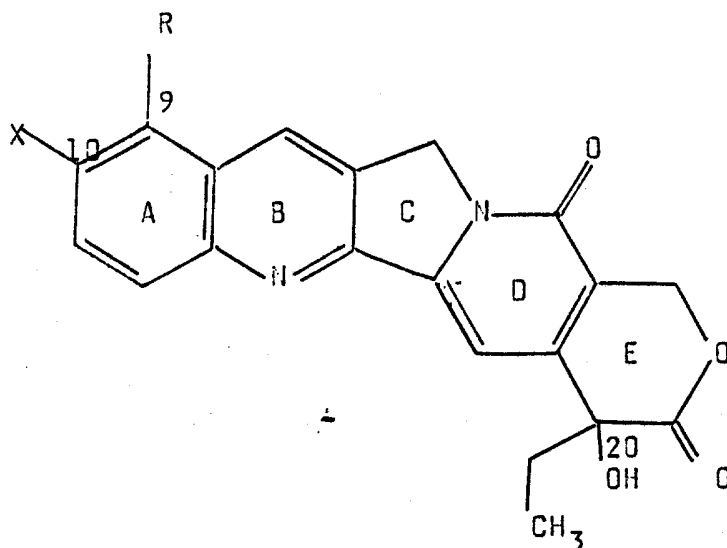
K přípravě orálního farmaceutického přípravku podle vynálezu, 100 mg sloučeniny vzorce I se smísí se 750 mg laktosy a směs se naplní do orální dávkové formy, jako je tvrdá želatinová kapsle, která je vhodná pro perorální aplikaci.

Zastupuje:


Dr. ZDENKA KOREJZOVÁ

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Camptothecinová sloučenina vzorce



kde

X je hydroxyskupina, vodík, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ nebo formyllová skupina,

R je vodík, když X je CH_2NH_2 nebo formyllová skupina, nebo R je $-\text{CHO}$ nebo $-\text{CH}_2\text{R}^1$, když X je vodík nebo hydroxyskupina,

R^1 je $-\text{O}-\text{R}^2$, $-\text{S}-\text{E}^2$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, kyanoskupina, $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$, nebo $\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$ za předpokladu, že když R^1 je $-\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$, sloučenina je spojena s farmaceuticky přijatelným anionem,

R^2 , R^3 a R^4 jsou stejné nebo různé a jsou vybrány z H, alkylu s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, dialkylamino s 1 až 6 atomy uhlíku-alkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, aminoalkylu se 2 až 6 atomy uhlíku nebo 3 až 7členný nesubstituovaný karbocyclický kruh, a

když R^1 je $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$, R^2 a R^3 skupiny se mohou spolu spojit s atomem dusíku, ke kterému jsou vázány k vytvoření heterocyklického kruhu za předpokladu, že takový kruh je vybrán z morfolinového, N-methylpiperazinylového nebo 4'-p-piperidino-piperidinového,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, hydrát nebo solvát.

2. Sloučenina podle nároku 1, ve kterém X je hydroxy-skupina a R je dimethylaminomethylová, N-morfolinomethylová, N-methylpiperazinylnomethylová, (4'-piperidin)-N-piperidinylnomethylová, (2'-hydroxyethyl)aminomethylová, trimethylamonium-methylová, cyklohexylaminomethylová, N-methylanilinomethylová, ethoxymethylová, cyklopropylaminomethylová, N,N-dimethylamino-ethyloxymethylová, N,N-dimethylaminoethylthiomethylová, N,N-dimethylaminoethylaminomethylová, kyanomethylová, aminoethyl-ová nebo formylová skupina, nebo kde R je vodík a X je formylová nebo aminomethylová skupina, nebo kde X je vodík a R je dimethylaminomethylová nebo N-morfolinomethylová skupina.

3. Sloučenina podle nároku 1, která je S-isomerem.

4. Sloučenina podle nároku 1, která je racemátovou směsí.

5. Sloučenina podle nároku 3, ve které X je hydroxyskupina a R je dimethylaminomethylová skupina.

6. Sloučenina podle nároku 5, která je acetátovou solí.

7. Sloučenina podle nároku 5, která je monohydrochlorid, dihydrochlorid nebo sodná sůl.

8. Sloučenina podle nároku 3, ve které X je hydroxyskupina, a R je trimethylammoniummethylová skupina

9. Sloučenina podle nároku 3, ve které X je hydroxyskupina a R je N-methylpiperazinylnomethylová skupina.

10. Sloučenina podle nároku 3, ve které X je hydroxyskupina a R je N-methylanilinomethylová skupina.

11. Sloučenina podle nároku 3, ve které C je hydroxyskupina a R je cyklohexylaminomethylová skupina.

12. Sloučenina podle nároku 3, ve které X je hydroxyskupina a R je N,N-dimethylaminoethyloxymethylová skupina.

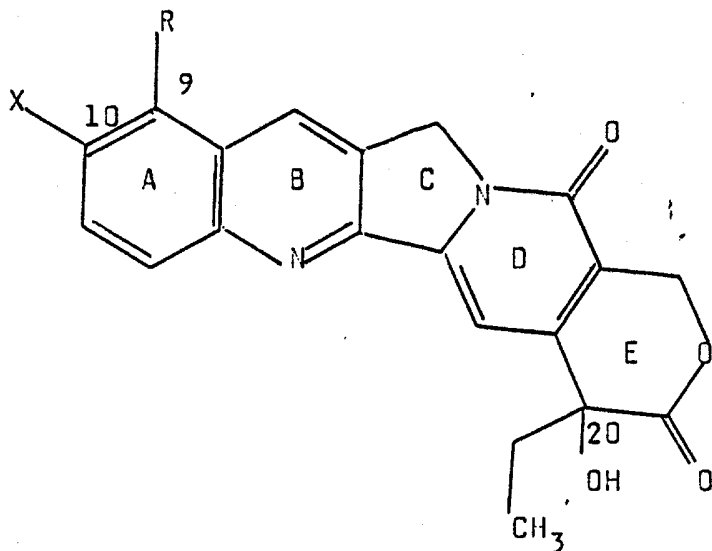
13. Sloučenina podle nároku 3, ve které X je hydroxyskupina a R je kyanomethylová skupina.

14. Sloučenina podle nároku 3, v které X je hydroxyskupina a R je morfolinomethylová skupina.

15. Sloučenina podle nároku 3, ve které X je hydroxyskupina a R je aminomethylová skupina.

16. Sloučenina podle nároku 3, ve které X je hydroxyskupina a R je cyklopropylaminomethylová skupina.

17. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako svou účinnou složku obsahuje účinný růst nádorových buněk inhibující množství aktivní složky a inertního farmaceuticky přijatelného nosiče nebo ředidla, přičemž zmíněný přípravek je užitečný k inhibici růstu zvířecích nádorových buněk citlivých na aktivní složku a ve kterém aktivní složka je sloučenina vzorce



kde

X je hydroxyskupina, vodík, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, nebo formylóvá skupina,

R je vodík, když X je CH_2NH_2 nebo formylóvá skupina, nebo R je $-\text{CHO}$ nebo $-\text{CH}_2\text{R}^1$, když X je vodík nebo hydroxyskupina,

R^1 je $-\text{O}-\text{R}^2$, $-\text{S}-\text{R}^2$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, kyanoskupina, $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$ nebo $-\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$ za předpokladu, že když R^1 je $\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$, sloučenina je spojena s farmaceuticky přijatelným anionem, R^2, R^3 a R^4 jsou stejné nebo různé a jsou vybrány z H, alkylu s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, dialkylamino s 1 až 6 atomy uhlíku alkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, alkylamino s 1 až 6 atomy uhlíku alkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, aminoalkylu se 2 až 6 atomy uhlíku nebo 3 až 7členného nesubstituovaného karbocyklického kruhu, a

když R^1 je $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$, R^2 a R^3 skupiny se mohou spolu spojit s atomem dusíku, ke kterému jsou vázány k vytvoření heterocyklického kruhu za předpokladu, že takový heterocyklický kruh je vybrán z morfolinového, N-methylpiperazinylového nebo 4'-piperidinopiperidinylového kruhu,

nebo její farmatherapeuticky přijatelná sůl, hydrát nebo solvát.

18. Příprava podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m , že X je hydroxyskupina a R je dimethylaminomethylóvá, N-morfolinomethylóvá, N-methylpirazinylmethylóvá, (4'-piperidin)-N-piperidinylmethylóvá, (2'-hydroxyethyl)aminomethylóvá, trimethylammoniummethylóvá, cyklohexylaminomethylóvá, N-methylanilinomethylóvá, ethoxymethylóvá, cyklopropylaminomethylóvá, N,N-dimethylaminoethoxymethylóvá, N,N-dimethylaminoethylthiomethylóvá, N,N-dimethylaminoethylaminomethylóvá, kyanomethylóvá, aminoethylóvá nebo formylóvá skupina, nebo ve které X je vodík a R je dimethylaminomethylóvá nebo N-morfolinomethylóvá skupina.

19. Přípravek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je S-isomerem.

20. Přípravek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je racemickou směsí.

21. Přípravek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že X je hydroxyskupina a R je dimethylamino-methylová skupina.

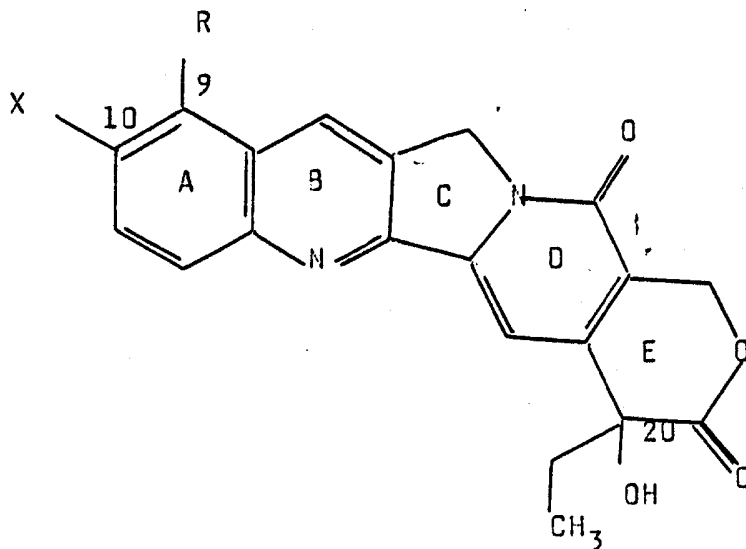
22. Přípravek podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je acetátovou solí.

23. Přípravek podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je monohydrochloridovou, dihydrochloridovou nebo sodnou solí.

24. Přípravek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že he v orální dávkové formě.

25. přípravek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v parenterální dávkové formě.

26. Způsob inhibice růstu zvířecích nádorových buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jsou citlivé na sloučeninu vzorce



kde

X je hydroxyskupina, vodík, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ nebo formylová skupina,

R je vodík, když X je CH_2NH_2 nebo formylová skupina, nebo R je $-\text{CHO}$ nebo $-\text{CH}_2\text{R}^1$, když X je vodík nebo hydroxyskupina,

R^1 je $-\text{O}-\text{R}^2$, $-\text{S}-\text{R}^2$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, kyanoskupina, $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$ nebo $-\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$ za předpokladu, že když R^1 je $-\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$, sloučenina je spojena s farmaceuticky přijatelným anionem,

R^2 , R^3 a R^4 jsou stejné nebo různé a jsou vybrány z H, alkylu s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, dialkylamiño s 1 až 6 atomy uhlíku alkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, aminoalkylu se 2 až 6 atomy uhlíku nebo 3 až 7členného nesubstituovaného karboxyklického kruhu, a

když R^1 je $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$, R^2 a R^3 skupiny mohou být spojeny spolu s atomem dusíku, ke kterému jsou vázány k vytvoření heterocyklického kruhu za předpokladu, že takový heterocyklický kruh je vybrán z morfolinového, N-methylpiperazinylového nebo 4'-piperidinopiperidinového kruhu,

nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, hydrát nebo solvát, přičemž takový způsob tvoří aplikace zvířatům ovlivněným zmíněnými nádorovými buňkami, účinného, růst tumorových buněk inhibujícího množství takové sloučeniny.

27. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že X je hydroxyskupina a R je dimethylaminomethylová, N-morfolinomethylová, N-methylpiperazinylmethylová, (4'-piperidinylmethylová, (2'-hydroxyethyl)aminomethylová, trimethylammoniummethylová, cyklohexylaminomethylová, N-methylanilinomethylová, ethoxymethylová, cyklopropylaminomethylová, N,N-dimethylaminoethoxymethylová, N,N-dimethylaminoethylthiomethylová, N,N-dimethylaminoethylaminomethylová, kyanomethylová,

kde

X je hydroxyskupina, vodík, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ nebo formylová skupina,

R je vodík, když X je CH_2NH_2 nebo formylová skupina, nebo R je $-\text{CHO}$ nebo $-\text{CH}_2\text{R}^1$, když X je vodík nebo hydroxyskupina,

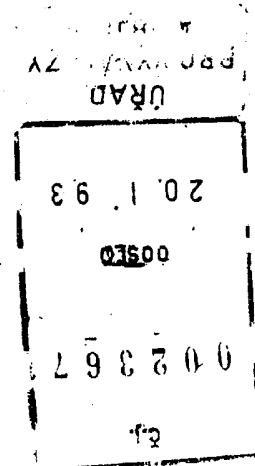
R^1 je $-\text{O}-\text{R}^2$, $-\text{S}-\text{R}^2$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, kyanoskupina, $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$ nebo $-\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$ za předpokladu, že když R^1 je $-\text{N}^+-\text{R}^2(\text{R}^3)(\text{R}^4)$, sloučenina je spojena s farmaceuticky přijatelným anionem,

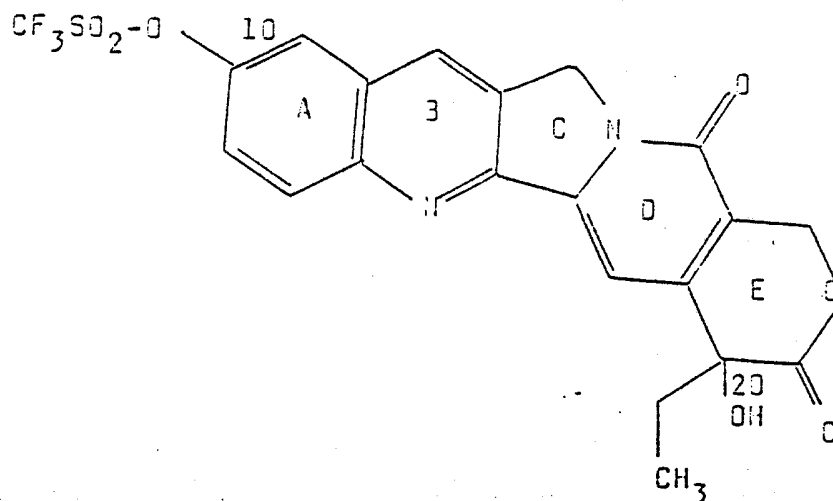
R^2 , R^3 a R^4 jsou stejné nebo různé a jsou vybrány z H, alkylu s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxyalkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, dialkylamiño s 1 až 6 atomy uhlíku alkylu se 2 až 6 atomy uhlíku, aminoalkylu se 2 až 6 atomy uhlíku nebo 3 až 7členného nesubstituovaného karbocyklického kruhu, a

když R^1 je $-\text{N}-\text{R}^2(\text{R}^3)$, R^2 a R^3 skupiny mohou být spojeny spolu s atomem dusíku, ke kterému jsou vázány k vytvoření heterocyklického kruhu za předpokladu, že takový heterocyklický kruh je vybrán z morfolinového, N-methylpiperazinylového nebo 4'-piperidinopiperidinového kruhu,

nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, hydrát nebo solvát, přičemž takový způsob tvoří aplikace zvířatům ovlivněným zmíněnými nádorovými buňkami, účinného, růst tumorových buněk inhibujícího množství takové sloučeniny.

27. Sloučenina vzorce II





(II)

Zastupuje:

Dr. Zdenka Korejzová
Dr. ZDENKA KOREJZOVÁ

PRIL.
PRO VYNALEZY A OBJEVY
URAD
20. 1. 93
DOŠLO
002367
2.