



P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DAUNOMICINA, 4'-EPI-DAUNOMICINA Y BETA-ANOMEROS RESPECTIVOS" a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA, S.p.A., residente en MILAN (Italia)

- 0 -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un nuevo procedimiento para la síntesis química de daunomicina y su beta-anómero, de la mezcla de alfa- y beta-anómero de 4'-epi-daunomicina, de cada anómero independiente y a los nuevos productos así obtenidos.

La daunomicina y la daumocinona se describen y reivindican en la patente británica de la peticionaria nº 1.033.383.

El nombre químico completo del alfa-anómero de 4'-epi-daunomicina es 7-O-(3'-amino-2', 3', 6'-tri



deoxi-alfa-L-arabinohexopiranosil)-daunomicinona.

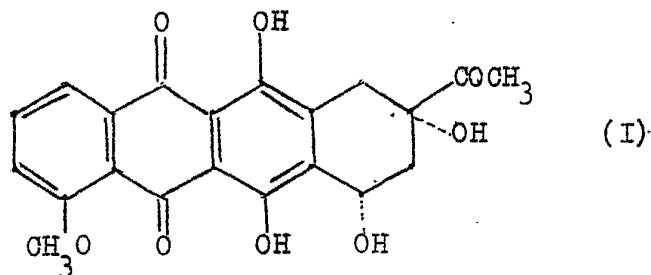
El nombre químico completo del beta-anómero de 4'-epi-daunomicina es 7-O-(3'-amino-2',3',6'-trideoxi-beta-L-arabinohexopiranosil)-daunomicinona.

5. El procedimiento de este invento comprende la condensación de daunomicinona (I) (descrita y reivindicada también en la patente de la peticionaria nº 1.003.383) con un derivado de daunosamina (3-amino-2,3,6-trideoxi-L-lixohexosa, II) ó de 4'-epidaunosamina (3-amino-2,3,6-trideoxi-L-arabinohexosa, III) para obtener los glicósidos IV farmacológicamente activos (daunomicina), V, VI y VII. En la práctica, la hexosa II ó III ha de protegerse y convertirse en un 1-derivado, tal como un haluro, apto para condensación con daunomicinona.
- 10.
- 15.

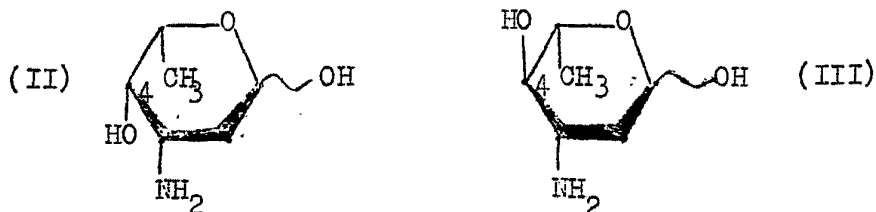
Después de la condensación, se separan los grupos protectores.

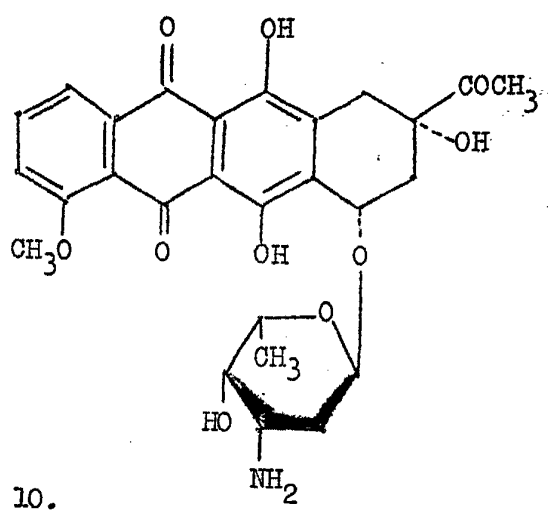
Las fórmulas de los compuestos a que se hace aquí referencia son las siguientes:

20.

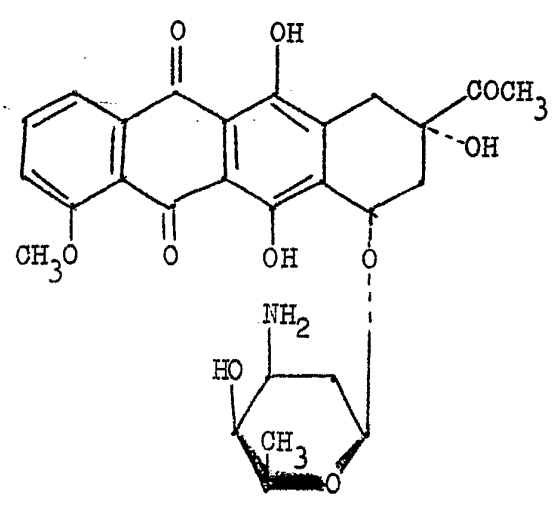


25.

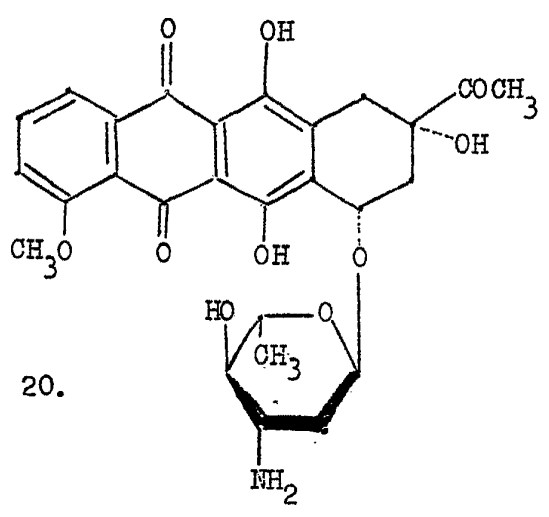




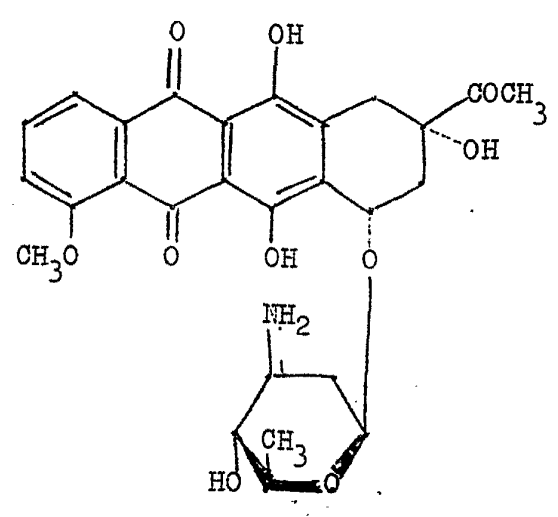
(IV)



(V)



(VI)



(VII)

25. Los grupos 3-aminicos en la hexosa II y III deben protegerse con grupos cuya separación puede llevarse a cabo sin ulterior descomposición de los productos que contienen diferentes grupos químicamente sensibles. El grupo N-trifluoroacético puede separarse



setisfactoriamente mediante tratamiento alcalino suave.

5. Las hexosas II y III han de convertirse en derivados dotados de suficiente estabilidad para ser utilizados en la síntesis. Está bien documentada la inestabilidad de los 1-halogen-derivados de 2-deoxiazúcares (W.W. Zorbach y col., *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 1966, 21, 273).

10. Los derivados de tri-trifluoroacetilo de las hexosas II y III se hacen reaccionar, según este invento, con cloruro de hidrógeno seco para obtener las 1-cloro-hexosas respectivas. Estas son compuestos sólidos que pueden almacenarse durante varios días bajo condiciones anhidras.

15. Por lo que respecta a las condiciones apropiadas de la reacción para la síntesis del enlace glicosídico, la bien conocida reacción de Koenigs-Knorr (J. Conchie, G.A. Lewy y G.A. Marsh, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 1957, 12, 157) permite una gama de condiciones diferentes que incluye modificaciones del disolvente, temperatura, catalizador, y aceptor de cloruro de hidrógeno o bromuro de hidrógeno. La importancia de las modificaciones es tal que, normalmente, es necesaria una serie de condiciones óptimas para obtener una velocidad apreciable de la reacción.
- 20.

25. La aplicación de condiciones corrientes a los 1-halogen-derivados de 2-deoxi-azúcares conduce a los glicales correspondientes (Zorbach y col., antes indicado). El procedimiento según este invento comprende un tratamiento suave de daunomicinona (I) con el derivado



de 1-cloro-N,O-di-trifluoroacetilo de la hexosa II o III en un disolvente orgánico tal como cloroformo o dicloruro de metileno, en presencia de un catalizador que comprende un haluro de mercurio (por ejemplo bromuro de mercurio) y un aceptor de cloruro de hidrógeno (por ejemplo óxido mercúrico). Los productos finales pueden obtenerse separando el N-trifluoroacetilo con álcali diluido.

El invento se ilustra con los ejemplos siguientes, en donde las temperaturas se expresan en grados centígrados.

#### EJEMPLO 1

Se suspende clorhidrato de daunosamina (II) (1 g) en éter dietílico anhidro y se trata a 0° con anhídrido trifluoroacético (8 cc). Después de permanecer durante dos horas a 0° y una hora a la temperatura del ambiente, se separa el disolvente a presión reducida y se cristaliza el residuo en diclorometano para obtener 1,1 g de tri-trifluoroacetildaunosamida, punto de fusión 132-34°, espectro de la masa m/e 391 (M-44), 322 (M-113). Esta (0,5 g) se trata en éter dietílico anhidro a 0° con cloruro de hidrógeno gaseoso. Después de permanecer a +5° durante una noche, se separa el disolvente en vacío, lo que da 1-cloro-N,O-di-trifluoroacetil-daunosamina en forma de un producto oleoso, llamado también 1-cloro-2,3,6-trideoxi-3-trifluoroacetamido-4-trifluoroacetoxi-L-lixohexopiranosas:

FMN (CDCl<sub>3</sub>) : 1,22 delta (d, J = 6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>),  
2,05-2,70 delta (m, 2H, C(2)H<sub>2</sub>)



- 4,46 delta (dq,  $J = 6,5 \text{ Hz}$  y  $J < 1 \text{ Hz}$ , 1H, C(5)H),
- 4,60-5,10 delta (m, 1H, C(3)H),
- 5,37 delta (c,  $W_H = 6,0 \text{ Hz}$ , 1H, C(4)H),
- 6,29 delta (m,  $W_H = 6,5 \text{ Hz}$ , 1H, C(1)H), y
- 5. 6,37 delta (s ancho, 1H, NH).

La daunomicinona finamente pulverizada (I, 300 mg, 0,75 mM) se disuelve en cloroformo anhidro (75 cc) y se trata con óxido mercúrico (600 mg), bromuro mercúrico (150 mg) y tamiz molecular (3Å, Merck).

- 10. Se agita la suspensión durante una hora y luego se adicionan 600 mg de 1-cloro-N,O-trifluoroacetil-daunosamina. Se agita la mezcla a la temperatura del ambiente durante 64 horas y luego se filtra. Se evapora la solución en vacío. Se recoge el residuo en
- 15. metanol (200 cc) y se somete a reflujo durante 15 minutos. El residuo que queda después de la separación del disolvente se cromatografía en una columna de ácido silícico utilizando, en calidad de agente eluyente, una mezcla de cloroformo: benceno:metanol 100:20:3 (por volumen).
- 20.

- Además de la daunomicinona sin reacción se obtienen 220 mg de N-trifluoroacetil-daunomicina, punto de fusión 169-171° (después de recristalización en tetrahydrofurano y hexano) y 20 mg de N-trifluoroacetil-daunomicina (beta-isómero), punto de fusión 138-140°  $\alpha_D^{23} + 440^\circ$  (c 0,1 cloroformo). Se disuelve la N-trifluoroacetil-daunomicina (0,20 g) en hidróxido sódico acuoso 0,1 N (20 cc). Se trata la solución resultante, después de permanecer 30 minutos a la temperatu-
- 25.



ra del ambiente, con cloruro de hidrógeno acuoso 0,1 N para llevar el pH a 8,6 y se extrae repetidamente con cloroformo.

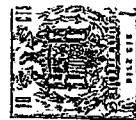
5. Se secan los extractos sobre sulfato sódico anhidro, se concentran hasta volumen reducido y se acidifican hasta pH 4,5 con cloruro de hidrógeno metanólico 0,1 N para permitir la cristalización del clorhidrato de daunomicina. Este es idéntico, en todos los aspectos, el producto obtenido mediante fermentación
10. (véase F. Arcamone y col., Gazzetta Chimica Italiana, 1970, 100, 949). El rendimiento es prácticamente cuantitativo.

#### EJEMPLO 2

15. Se suspende 2,3,6-trideoxi-3-trifluoroacetamido-L-arabinohexosa (1 g) en éter dietílico anhidro (20 cc) y se trata a 0° con anhídrido trifluoroacético. Luego se trata la mezcla como en el ejemplo 1 para obtener un rendimiento cuantitativo de cloruro de 2,3,6-trideoxi-N,0-di-trifluoroacetil-L-arabinohexopiranosilo.

20. RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 1,30 delta (d, J=6, 0 Hz 3H, CH<sub>3</sub>),  
2,25-2,80 delta (m, 2H, C(2)H<sub>2</sub>),  
4,20-4,65 delta (m, 1H, C(5)H),  
4,65-5,15,15 delta (m, 2H, C(3)H y C(4)H),  
6,25 delta (m, W<sub>H</sub>=6,0 Hz, 1H, C(1)H), y
25. 6,45 delta (s ancho, 1H, NH).

Se trata una solución de daunomicinona (0,5 g) en cloroformo anhidro con óxido mercuríco (1,0 g), bromuro mercuríco (0,25 g), tamiz molecular (3Å, Merck, 10 g), y cloruro de 2,3,6-trideoxi-N,0-di-trifluoroace-



- til-L-arabinohexopiranosilo (0,5 g). Se agita la mezcla durante 24 horas, se libera de sólidos mediante filtración y se evapora bajo vacío. Se recoge el residuo en metanol, se somete a reflujo durante 15 minutos, se
5. evapora hasta sequedad y se cromatografía sobre una columna de gel de sílice utilizando una mezcla de cloroformo:benceno:metanol 10:20:3 en calidad de agente eluyente. El producto principal que se obtiene es una mezcla, en la relación 70:30, de alfa y beta 7-O-(N-tri
10. fluoroacetil-4'-epi-daunosaminil)-daunomicinona (rendimiento después de cristalización en cloroformo, 0,3 g). Este material, después de tratamiento con hidróxido sódico 0,1 N tal como se ha indicado antes, se convierte cuantitativamente en una mezcla de los alfa y beta glicósidos correspondientes en forma de bases libres. Se
15. separa el producto en los alfa y beta anómeros mediante cromatografía de gel de sílice utilizando un sistema disolvente de cloroformo:metanol:agua 135:20:2 (por volumen) en calidad de agente eluyente. Se obtiene alfa-
20. anómero (4'-epidaunomicina, VI),  $[\alpha]_D^{23} + 320^\circ$  (c = 0,045, metanol), punto de fusión 199-201°, rendimiento 0,16 g; beta-anómero (VII), punto de fusión 182-184°, rendimiento 0,06 g.

25. Actividad biológica de los compuestos VI (4'-epidaunomicina) y VII (4'-epidaunomicina, beta-anómero).

Los compuestos VI y VII exhiben propiedades biológicas relevantes como potentes inhibidores de mitosis celular y actividad proliferativa en células de cultivo in vitro. Presentan también una sustancial activi-



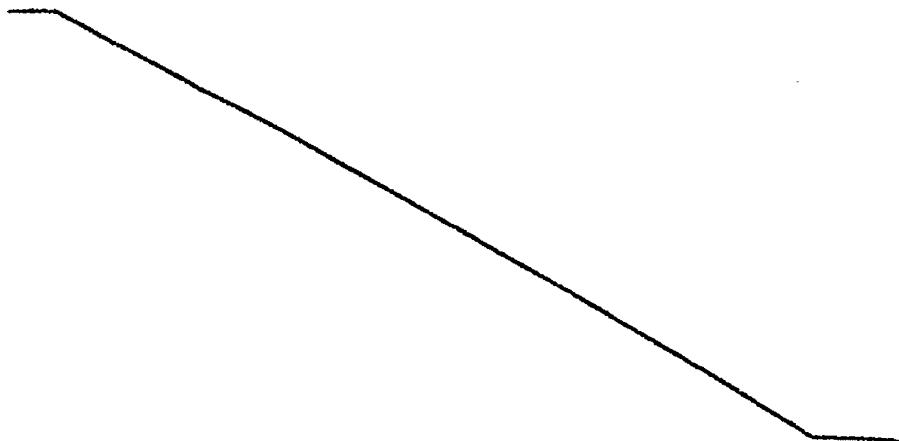
- dad sobre la transformación celular inducida por virus oncogénicos. Poseen actividad antitumoral en los ratones, que se desprende de un incremento del tiempo medio de supervivencia con dosis no tóxicas en animales que tienen una serie de tumores experimentales (Tablas 1 a 4).

La actividad cardiotóxica "in vitro" del compuesto VI es muy baja (inferior a la daunomicina), según se desprende del experimento siguiente.

10. El método consiste en el cultivo de células cardíacas simples aisladas mediante tripsinización del corazón de ratones recién nacidos. Al cabo de 3-4 días, los cultivos, que muestran racimos de células latentes, pueden estudiarse desde el punto de vista de frecuencia y ritmo (Necco A., Dasdia T. IRCS, 2 : 1293, 1974).

15. TABLA 1: Efecto de los compuestos VI y VII sobre el índice micótico y actividad proliferativa de células HeLa cultivadas a diferentes tiempos de exposición.

20. Los resultados se expresan en forma de porcentaje de los testigos sin tratar.





5.

Compuesto	Dosis (µg/ml)	Indice micótico			Número de la colonia		
		2 h.	4 h.	8 h.	2 h.	8 h.	24 h.
VI	0,025	226±	100	117	113	88	48
	0,05	189±	103	122	115	56	23
	0,1	79	140	0	77	23	3
	DI <sub>50</sub>				0,16	0,056	0,027
VII	0,25	137	103	85	108	86	70
	0,5	95	67	88	101	37	18
	1	52	40	0	98	17	6
	DI <sub>50</sub>				>1	0,47	0,33
Daunomicina	DI <sub>50</sub>				0,098	0,036	0,021

10.

± - Bloque metafásico

15.

TABLA 2: Efecto de los compuestos VI y VII sobre la formación de foci y sobre la proliferación de células en fibroblastos de ratones infectados con virus de sarcoma Moloney (3 días de tratamiento)

20.

Compuesto	Dosis (µg/ml)	Formación de Foci		Proliferación de células		B/A
		(% de controles)	DI <sub>50</sub> (µg/ml)(A)	(% de controles)	DI <sub>50</sub> (µg/ml)(B)	
VI	0,0062	51		75		2,1
	0,025	0	0,006	23	0,013	
	0,1	0		14		
	0,4	0		1		
VII	0,0062	48		87		6,4
	0,025	44	0,01	80	0,064	
	0,1	5		28		
	0,4	0		14		
Daunomicina			0,006		0,0086	1,4

25.



TABLA 3: Efecto de los compuestos VI y VII sobre el tiempo medio de supervivencia y sobre el número de supervivientes en ratones hembra (Swiss CDI) inoculados intraperitonealmente con Sarcoma 180 ascites ( $1 \times 10^6$  células/ratón). Los compuestos se administraron al día siguiente del trasplante del tumor.

5.

10.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Tiempo medio de supervivencia (% de controles)	Número de supervivientes al cabo de 60 días
VI	0,22	111,1	1/10
	1,1	120,8	1/10
	5,7	174,5	0/10
VII	0,26	96,6	0/10
	1,3	114,8	1/10
	6,7	118,6	1/10

15.

Murieron 6 de cada 10 animales como consecuencia de la toxicidad del farmaco.

20.

TABLA 4: Efecto de los compuestos VI y VII sobre leucemia de Gross Trasplantable. Tiempo medio de supervivencia de ratones hembra C<sub>3</sub>H inoculados por vía intravenosa con una suspensión de limfonodos leucémicos y bazo ( $2,5 \times 10^6$  células/ratón). Los compuestos se administraron una vez al día durante cinco días a partir del día siguiente al del trasplante del tumor.

25.





435739

- 12 - 18

5.

10.

Compuesto	Dosis diaria (mg/kg)	Tiempo medio de supervivencia (% de controles).
VI	1,5	115
	2,25	143
	3	162
	3,75	122
	4,5	120
VII	1,5	106
	2,25	102
	3	121

#### REIVINDICACIONES

15. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente inglesa nº 12254/74 del 20 de Marzo de 1974.

20. 1.- Un procedimiento para la preparación de daunomicina, 4'-epidaunomicina, y beta-anómeros respectivos caracterizado porque comprende hacer reaccionar daunomicina con una 1-cloro-2,3,6-trideoxi-3-trifluoro-acetamido-4-trifluoroacetoxi-hexosa, que tiene una configuración L-lixo o L-arabino, en un disolvente orgánico apropiado en presencia de una sal mercúrica como catalizador y de 25. acceptor apropiado de cloruro de hidrógeno y separar a continuación los grupos de trifluoroacetilo protectores de los compuestos glicosídicos formados y separación de los alfa y beta anómeros.

435739



- 13 -

2.- Un procedimiento para la preparación de daunomicina, 4'-epidaunomicina y beta-anómeros respectivos.

5. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 13 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 18 de Marzo de 1975

P.a.

JAVIER BERN  
P. P.  
Firmado: JOSE L. MCRA