

11 JUN 1951



Case G 334

Int. Cl. C.07H//A.61K

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

3437

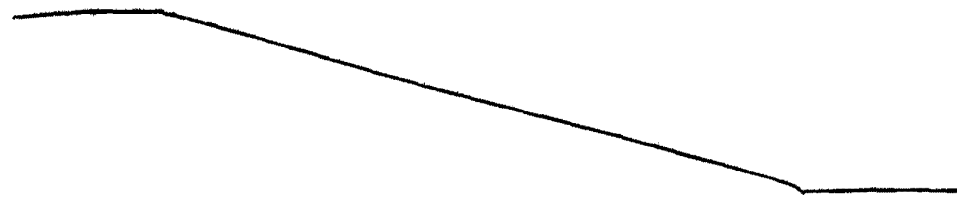
por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN ANALOGO DE DAU
NOMICINA", a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACEUTICI
ITALIA S.p.A., residente en MILAN(Italia).

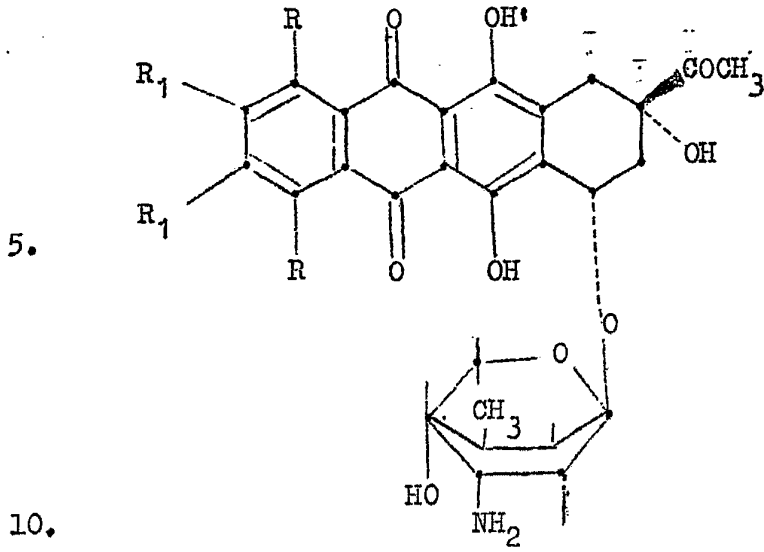
= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento para la preparaci3n de an3logos de daunomicina (que se describe y reivindica en la patente brit3nica de la peticionaria 1.003.383).

5. Los an3logos de este invento tienen un anillo D modificado y la estructura:





en la que

- 15.
- R₁ representa, cada uno, un átomo de hidrógeno y
 - R representa, cada uno, un átomo de hidrógeno, cloro o bromo o un grupo metílico o metoxílico, o
 - R₁ representa, cada uno, un átomo de cloro o bromo o un grupo metílico y
 - R representa, cada uno, un átomo de hidrógeno.

20.

Este invento incluye un procedimiento para la preparación de estos análogos de daunomicina que comprende la condensación de cloruro de 2,3,6-trideoxi-3-trifluoro-acetamido-4-O-trifluoroacetil-alfa-L-lixo-piranosilo con una antraciclina de fórmula apropiada según la solicitud de patente española nº 435.739 en un disolvente anhidro en presencia de óxido y/o bromuro mercúrico y un tamiz molecular para obtener un derivado protegido que con el tratamiento con metanol y luego con álcali, tal como hidróxido sódico, se convierte en el

25.



compuesto deseado. Las antraciclínonas racémicas, por ejemplo 4--demetoxidaunomicinona ($R = R_1 = H$), proporcionan dos compuestos: (-)daunosaminil(-)4--demetoxi--daunomicinona (anómeros alfa+beta) y (-)daunosa--minil(+) 4--demetoxi--daunomicinona (anómeros alfa+beta) que pueden separarse de forma usual. Alternativamente la mezcla puede utilizarse en la terapia de enfermedades neoplásticas.

Los nuevos compuestos de conformidad con este invento incluyen (-)daunosaminil(-)1,4--dimetil--4--demetoxi--daunomicinona; (-)daunosaminil(+)1,4--dimetil--4--demetoxi--daunomicinona; (-)daunosaminil(-)1--metoxidaunomicinona; (-)daunosaminil(+)1--metoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(-)1,4--dicloro--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(+)1,4--dicloro--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(-)1,4--dibromo--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(+)1,4--dibromo--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(-)2,3--dimetil--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(+)2,3--dimetil--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(-)2,3--dicloro--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(+)2,3--dicloro--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(-)2,3--dibromo--4--demetoxidaunomicinona; (-)daunosa--minil(+)2,3--dibromo--4--demetoxidaunomicinona. Debe entenderse que cada compuesto, que tiene la configuración antraciclínónica (7 S : 9 S) o (7 R : 9 R), es una mezcla de alfa y beta anómeros.

Este invento se ilustra por medio del ejemplo siguiente:

EJEMPLO



(-)-daunosaminil(-)-4-demetoxydaunomicinona (anómeros alfa+beta) y (-)-daunosaminil(+)-4-demetoxydaunomicinona (anómeros alfa+beta).

- Se disuelven 1,2 g de éter 4-demetoxydaunomicinona-7-metilico (preparado según C.M. Wong, Canadian Journal of Chemistry, 1971, 49, 2712) en 22 cc de ácido trifluoroacético y se deja durante una noche a la temperatura del ambiente. Se evapora la solución en vacío. Se recoge el residuo en 50 cc de acetona
5. y se adicionan 10 cc de bicarbonato sódico acuoso al 5%. Al cabo de 30 minutos se separa el disolvente por evaporación en vacío y se recoge el residuo en cloroformo y se lava con agua. La evaporación del cloroformo deja un residuo que se cromatografía sobre gel de sílice,
10. lo que da 0,475 g de (+)-4-demetoxydaunomicinona, punto de fusión 152-155°C, mancha única en cromatografía de capa delgada (gel de sílice; cloroformo:acetona: 80:20; Rf = 0,44).
- 15.

- Se disuelven 0,3 g de este compuesto en 75 cc de cloroformo anhidro y se adicionan con agitación 0,6 g de óxido mercurico, 0,15 g de bromuro mercurico y 5 g de un tamiz molecular de 5 Å. Al cabo de una hora se adicionan 0,7 g de cloruro de 2,3,6-tridesoxi-3-trifluoroacetamido-4-O-trifluoroacetyl-alfa-L-lixopiranosilo y se agita la suspensión a la temperatura del ambiente durante 16 horas. Después de filtración se concentra la solución en vacío, se disuelve el residuo en 200 cc de metanol y se somete a reflujo durante 15
- 20.
- 25.



minutos. Después de la evaporación del disolvente se cromatografía el residuo sobre gel de sílice.

Mediante elución con cloroformo : benceno : metanol : 100 : 20 : 3, se obtienen 0,270 g de una mezcla de

5. (-)daunosaminil(-)4-demetoxidaunomicinona y (-)daunosaminil(+)-4-demetoxidaunomicinona (anómeros de alfa-glicosilo en forma de derivados N-trifluoroacetilicos (mancha única sobre placas de gel de sílice; cloroformo:acetona 80:20; $R_f = 0,34$), y 0,150 g de una mezcla de (-)daunosaminil(-)-4-demetoxidaunomicinona y (-)daunosaminil(+)-4-demetoxidaunomicinona (anómeros beta-glicosilicos) en forma de derivados N-trifluoroacetilicos.

- Se disuelven 0,170 gramos de los derivados N-trifluoroacetilicos de (-)daunosaminil(-)4-demetoxidaunomicinona y (-)daunosaminil(+)-4-demetoxidaunomicinona (anómeros de alfa-glicosilo) en NaOH 0,1N (15 cc) y se deja durante 30 minutos a la temperatura del ambiente: el pH se ajusta a 8,6 con HCl y se extrae repetidamente la solución con cloroformo. Se concentra la solución clorofórmica en vacío, se recoge el residuo en metanol (5 cc), se acidifica a pH 4,5 con HCl 0,1 N en metanol y se adiciona éter etílico para producir la precipitación de los clorhidratos de (-)daunosaminil(-)4-demetoxidaunomicinona y (-)daunosaminil(+)-4-demetoxidaunomicinona (anómeros de alfa-glicosilo) (mancha única sobre placas de gel de sílice; diclorometano : metanol : agua 100:20:2; $R_f = 0,16$).

Operando como se ha indicado antes los derivados N-trifluoroacetilicos de (-)daunosaminil(-)4-demetoxi-



daunomicinona y (-)daunosaminil(+)-4-demetoxidaunomicinona (anómeros de beta-glicosilo) dan (-)daunosaminil(-)-4-demetoxidaunomicinona y (-)daunosaminil(+)-4-demetoxidaunomicinona (anómeros de beta-glicosilo) (mancha única sobre placas de gel de sílice; diclorometano : metanol : agua 100:20:2; Rf = 0,14).

5. En la evaluación farmacológica, que se expondrá a continuación, para abreviar se ha utilizado el código de laboratorio "IMI 22" para designar la (-)daunosaminil-4-demetoxi-daunomicinona como una mezcla de alfa-enómeros (7 S : 9 S) y (7 R : 9 R).

Los símbolos "R" Rectus y "S" Sinister se han tomado de la literatura (según la nomenclatura de Cahn, Ingold, Prelog, *Experientia*, 1956, 12, 81).

15. FARMACOLOGIA

Efecto del IMI 22 sobre la viabilidad de células HeLa

20. Se llevaron a cabo estudios in vitro sobre células HeLa, mantenidas en medio Eagle suplementado con suero de ternero al 10%. Las células se trataron con los compuestos bajo investigación durante diferentes tiempos. La viabilidad de las células se determinó mediante células y sembrando de 200 a 300 células/placa. Se evaluó el número de colonias 6 días después. Los resultados, expuestos en la Tabla 1, indican que el

25. compuesto IMI 22 es tan activo como la adriamicina después de 2 horas de tratamiento; al cabo de 8 horas de tratamiento la inhibición de la viabilidad de las células con IMI 22 es superior a la inhibición con adriamicina y daunomicina.

11 JUN 1964

Tabla 1

Farmacos	DI 50 (ug/ml)	
	2 hrs	8 hrs
5. Daunomicina	0,095	0,023
Adriamicina	(0,2)	0,039
IMI 22	(0,2)	0,002

10. Pruebas "in vitro" sobre la formación de "foci" mediante Moloney Sarcoma Virus (MSV).

El compuesto IMI 22 se probó en comparación con la adriamicina sobre cultivos de fibroblastos de embriones de ratón infectados o no con MSV.

15. Después de un tratamiento de 3 días se evaluó la inhibición porcentual frente a los testigos sobre la proliferación de células en cultivos sin infectar (actividad citotóxica) y sobre la formación de foci de MSV en cultivos infectados (actividad antivírica).

20. Los resultados expuestos en la tabla 2, muestran una menor actividad antivírica y la misma actividad citotóxica del IMI 22 frente a la adriamicina.

Compuesto	Dosis (γ/cc)	% Foci (testigos = 100)	% células (testigos = 100)
25. Adriamicina	0,0250	0	29
	0,0125	0	30
	0,0 6	26	53



Compuesto	Dosis (μ /cc)	% Foci (testigos = 100)	% celulosa (testigos = 100)
5. IMI 22	0,6	0	0
	0,1	0	4,6
	0,0250	12	38
	0,006	54	46

10. Estudio de la actividad antitumoral del compuesto IMI 22 in vivo.

El estudio de la actividad antitumoral del compuesto IMI 22 se llevó a cabo sobre algunos tumores de ratones tanto en la forma sólida como ascítica.

1) Tumores ascíticos

15. Las pruebas de actividad se llevaron a cabo sobre ratones suizos GDI inoculados intraperitonealmente con $1,10^6$ de células ascites sarcoma 180/animal. Los animales se trataron intraperitonealmente con diferentes concentraciones de los compuestos una vez al día después de la implantación del tumor.

20. Los resultados, expuestos en la tabla 1, demuestran que el compuesto tiene un notable efecto sobre el desarrollo del tumor ascítico; aumenta considerablemente el tiempo medio de supervivencia de los animales tratados.

25. Tabla 1. El compuesto es activo con dosis menores de que la adriamicina.



Compuesto	Dosis mg/kg/día	% T/C del tiempo medio de supervivencia (L.T.S.)		
5. IMI 22	0,12			115 (0/10)
	0,2		146(0/10)	
	0,25			188(1/10)
	0,5			181(0/10)
	1	185(0/10)	107(0/10)	223(1/10)
	1,5		79(0/10)	
	10. 2		61(1/10)	
5		38(0/10)		
15. Adria- micina	0,1			100 (0/10)
	0,2		107(0/10)	
	1	146(1/9)	143(1/10)	169(1/9)
	2	400(5/10)		
	5	311(4/10)	225(1/10)	
	10		193(0/10)	

2) Tumores sólidos

20. La prueba de actividad sobre tumores sólidos se llevó a cabo sobre ratones suizos CD 1 injertados con fragmento de tejido neoplástico por vía subcutánea y tratados por vía intravenosa durante cinco días a partir del día siguientes a la implantación del tumor.

25. Al 10º día se sacrificaron todos los animales y se extrajeron y pesaron los tumores. Los resultados expuestos en la Tabla 2 muestran que la dosis máxima atóxica probada (1 mg/kg) produce una inhibición del



crecimiento del tumor del 50%. El índice terapéutico (I.T.) calculado como = dosis máxima tolerada (DL 10)/dosis mínima efectiva (T/C 0,10) es de 3,7 para IMI 22 y de 1,8 para la adriamicina, respectivamente.

5. Tabla 2

Compuesto	Dosis mg/kg	Peso del tumor	% T/C	Toxicidad
Toxicidad	-	3,036		
10. IMI 22	0,5	2,295	76%	0/10
	1	1,550	51	0/10
	2	0,485	16	3/10
Adriamicina	2,5	1,465	48%	0/10
	3,5	0,364	12	7/10

15. Leucemia

La actividad del compuesto IMI 22 se probó sobre ratones BDF 1 inoculados intraperitonealmente con células leucémicas L 1210.

20. Los animales se trataron una vez el día siguiente a la implantación del tumor. Los resultados expuestos en la tabla 3 muestran que las dosis atóxicas probadas aumentan considerablemente el tiempo medio de supervivencia de los grupos ensayados.

25. El compuesto IMI 22 es activo con dosis inferiores que la adriamicina.



10 JUN 1973

Tabla 3

Compuesto	Dosis mg/kg	Tiempo medio de supervivencia	% T/C	Toxicidad
5. Testigos	-	8		
IMI 22	0,75	12,5	156	0/10
	1,5	13	162	1/10
	3	7	87	7/10
10. Adriamicina	2,5	12,5	156	0/10
	5	14	175	0/10
	10	16	200	4/10

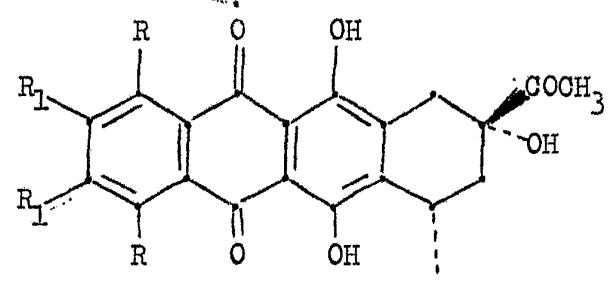
= . =

N O T A

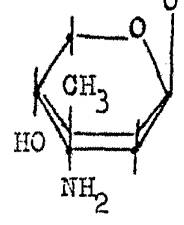
15. Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente británica nº 26083/74 del 12 Junio 1974.

1. Un procedimiento para la preparación de un análogo de daunomicina de la estructura:

20.



25.



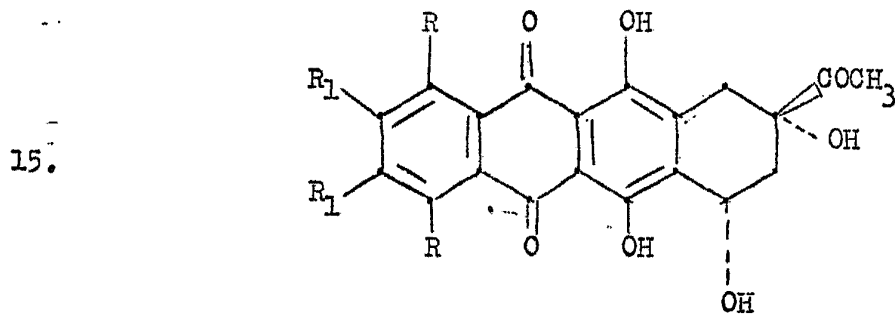


que comprende anómeros alfa y beta,

en donde

5. R_1 representa, cada uno, un átomo de hidrógeno, y
R representa, cada uno, un átomo de hidrógeno,
cloro y bromo o un grupo metílico o metoxílico, o
 R_1 representa, cada uno, un átomo de cloro o bromo
o un grupo metílico y
R representa, cada uno, un átomo de hidrógeno,

10. caracterizado por hacerse reaccionar un derivado de
daunomicinona de la estructura:



en la que

20. R_1 representa, cada uno, un átomo de hidrógeno y
R representa, cada uno, un átomo de hidrógeno, cloro
o bromo o un grupo metílico o metoxílico, o
 R_1 representa, cada uno, un átomo de cloro o bromo o
un grupo metílico y
R representa, cada uno, un átomo de hidrógeno.

25. con una 1-cloro-2,3,6-trideoxi-3-trifluoroacetamido-4-
-trifluoroacetoxi-alfa-L-lixo-piranosas, en un disolvente
orgánico apropiado, en presencia de una sal mercurica
como catalizador y de un aceptor apropiado de cloruro
de hidrógeno, separar los anómeros racémicos de alfa glico-

11 Jun. 1975



silo de los anómeros racémicos de beta glicosilo y separar a continuación los grupos trifluoroacetilicos protectores para obtener los compuestos deseados.

5. 2. Un procedimiento para la preparación de un análogo de daunomicina.

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 11 de Junio de 1975

p.a.

~~JOSE E. ISERN~~

~~(p. p.)~~

~~JOSE F. NIETO~~

