

Int. Cl.: C07H/A61K

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 4'-EPI-6'-HIDROXIDAUNOMICINA", a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA S.p.A., residente en MILAN (Italia).

= . =

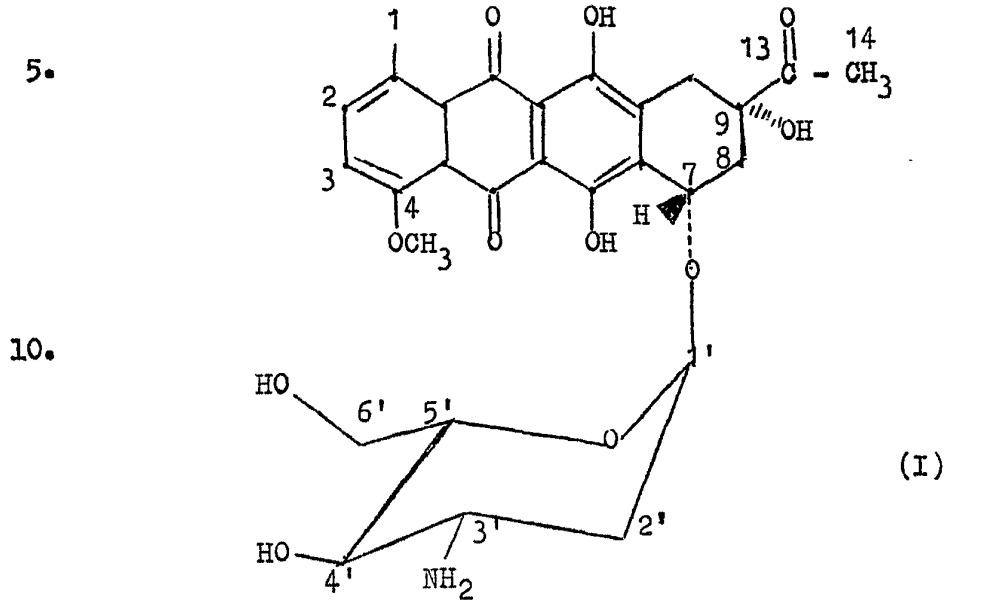
MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere al procedimiento para la preparación de nuevos glicósidos antitumorales, 4'-epi-6'-hidroxidaunomicina y 4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina.

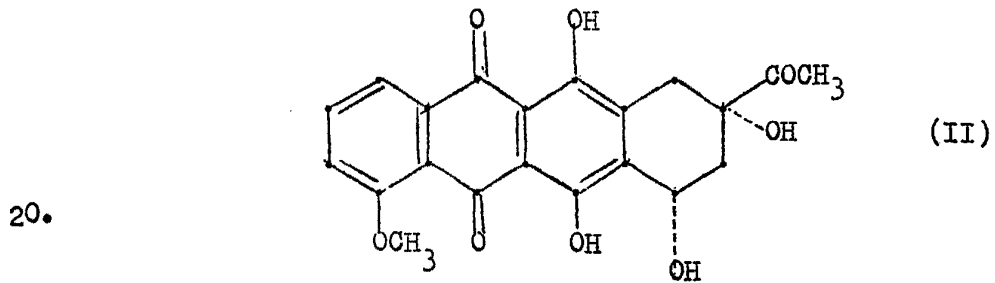
5. Este procedimiento comprende la preparación y empleo de ciertos nuevos intermediarios que se incluyen también en el invento.

10. Los nuevos compuestos del invento exhiben actividad antimetabólica tanto "in vivo" como "in vitro" y son agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de enfermedades tumorales y virales en los humanos.

Más concretamente, el invento proporciona un procedimiento que se utiliza para la preparación de 4'-epi-6'-hidroxidaunomicina (I)



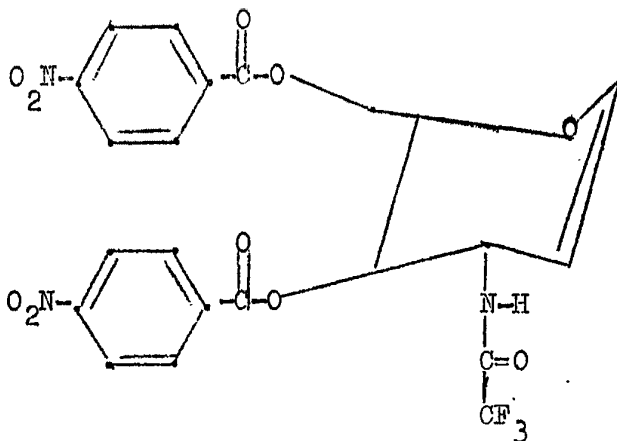
15. condensando daunomicinona (II)



con 1,2,3-trideoxi-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoroacetamido-L-arabino-hex-1-enepiranosa (III)

25.

5.



(III)

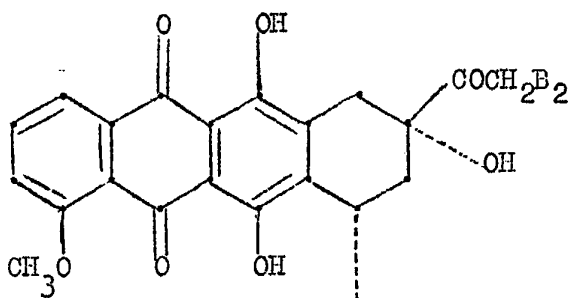
10.

para formar el enlace glicosídico. La separación de los grupos protectores en la fracción de azúcar proporciona el compuesto (I) biológicamente activo, que se aísla en forma del clorhidrato. Resulta muy importante el hecho de que prácticamente solo en alfa-glicósido se forma bajo las condiciones de este procedimiento, estando presente el beta-anómero en cantidad muy reducida en la mezcla reaccional.

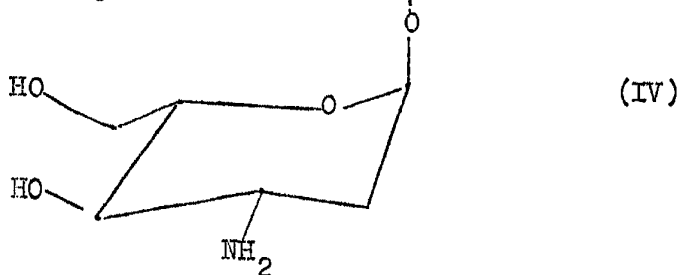
15.

El tratamiento subsiguiente del compuesto (I) con una solución de bromo en cloroformo proporciona la 14-bromo-4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina (IV)

20.

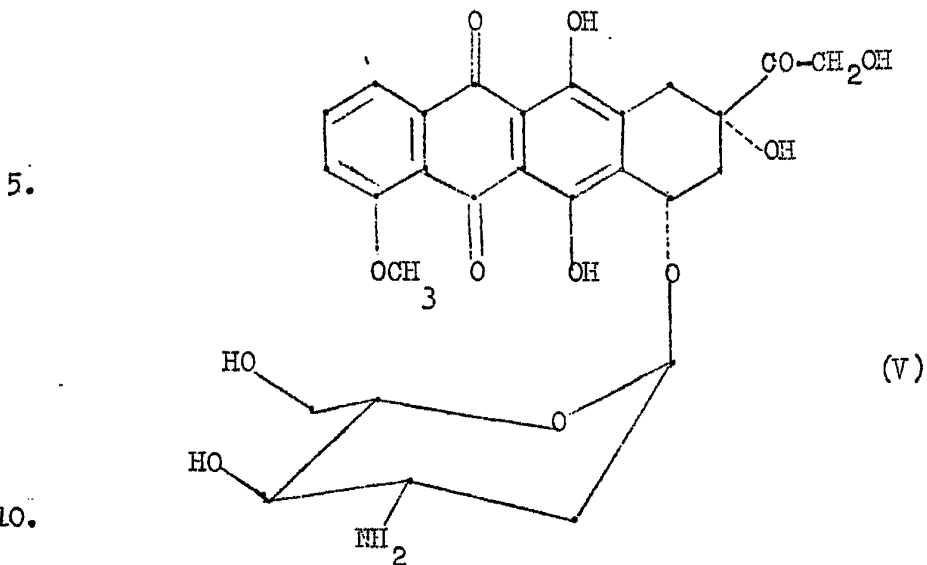


25.



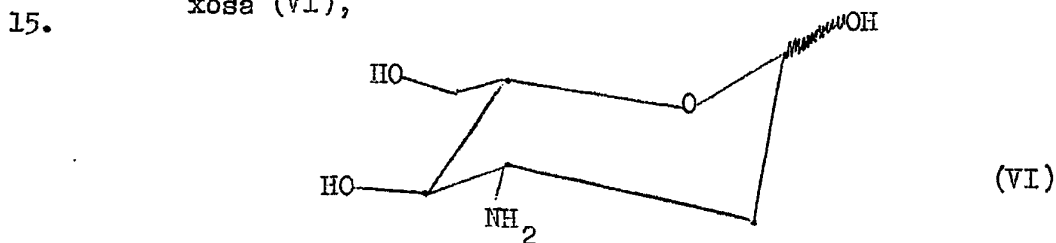
(IV)

La hidrólisis controlada del compuesto (IV) proporciona la nueva 4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina (V),



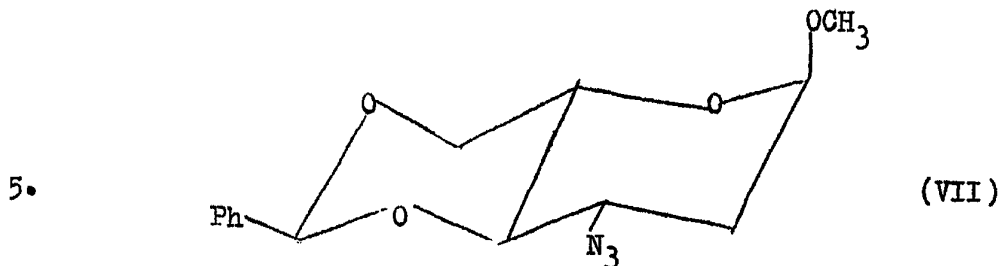
que se aísla por último en forma del clorhidrato.

El compuesto protegido reactivo (III), que se condensa con la daunomicinona (II), es un nuevo intermediario que se deriva de la 3-amino-2,3-dideoxi-L-arabino-hexosa (VI),



Esta amino-azúcar se desconocía anteriormente en la serie I y se ha obtenido por la peticionaria, por primera vez, según el procedimiento siguiente: La D-glucosa se ha convertido en el metil-3-azido-4,6-O-benciliden-2,3-di-

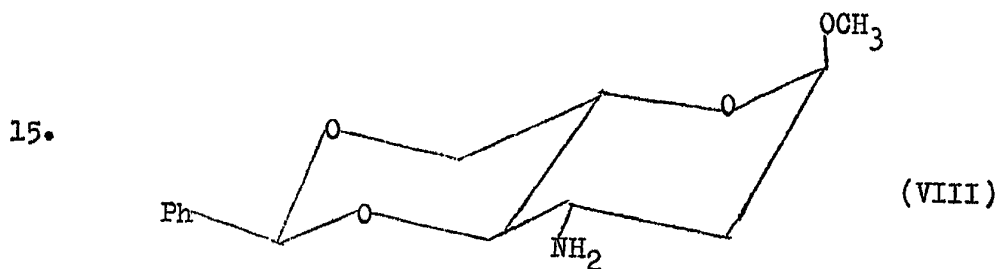
deoxi-alfa-L-arabino-hexapiranosido (VII)



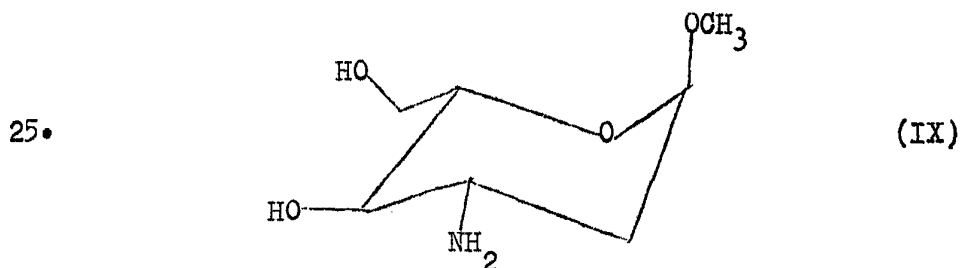
según procedimientos conocidos en la literatura para el D-isómero (G.N. Bollenback: "Methods in carbohydrate chemistry" II, 326, 1963. Acad. Press. L.F. Wiggins, *ibid*, II, 188,

10. 1963. A.C. Richardson: Carbohydrate Research, 4, 422 (1967)).

Este compuesto se convierte, mediante hidrogenación catalítica, en el derivado 3-amínico (VIII),

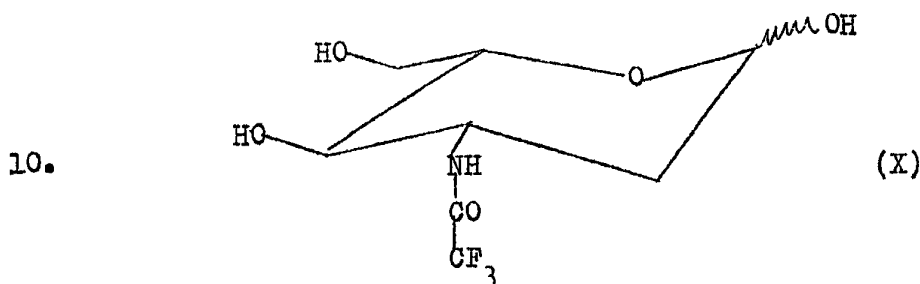


20. Después de la separación del sustituyente bencilidénico con el empleo de cloruro de hidrógeno metanólico se obtiene un metil-3-amino-2,3-dideoxi-alfa-L-arabino-hexopiranosido (IX),



desconocido también anteriormente en la serie D, que se convierte, mediante tratamiento ácido, en el compuesto(VI) deseado, aislado en forma del clorhidrato.

5. El compuesto (VI) se trata con anhídrido trifluoroacético, seguido de tratamiento con un alcohol alifático inferior para obtener el derivado N-trifluoroacético(X),



15. que se hace reaccionar por último con cloruro de p-nitrobenzoilo en piridina, seguido de un suave tratamiento alcalino, para obtener la 1,2,3-trideoxi-4,6-di-O-(p-nitrobenzoil)-3-trifluoroacetamido-L-arabino-hex-1-enepiranososa (III) con buenos rendimientos.

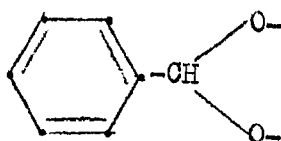
20. Preparación del intermediario 1,2,3-trideoxi-4,6-di-O-(p-nitrobenzoil)-3-trifluoroacetamido-L-arabino-hex-1-enepiranososa (III)

25. Se disuelven 2,85 g de metil-3-azido-4,6-O-benciliden-2,3-dideoxi-alfa-L-arabino-hexopiranosida (VII) en 40 cc de metanol anhidro y se hidrogena a 60 p.s.t.a la temperatura del ambiente en presencia de níquel Raney durante 3 horas. Se separa por filtración el catalizador y se evapora el filtrado hasta sequedad en vacío.

El residuo se cristaliza en acetato de etilo para obtener 2,17 g de metil-3-amino-4,6,0-benciliden-2,3-dideoxi-alfa-L-arabino-hexopiranosida (VIII). P.f. 95-96°C;

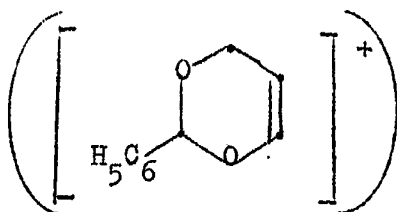
$[\alpha]_D^{20} = -86^{\circ}$ ($c = 0,5 \text{ CHCl}_3$). Rendimiento del 84%; r.p.m. (CDCl_3): 1,3-2,3 δ (m, 2H, C(2)H₂), 1,4 δ (s ancho, 2H, NH₂), 3,2-4,4 δ (multipletes, 5H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(6)H₂), 3,37 δ (s, 3H, CH₃O), 4,76 δ (dd, $J=3,5 \text{ Hz}$ y $J < 1 \text{ Hz}$, 1H, C(1)H), 5,57 δ (s, 1H),

5.



7,2 - 7,7 (m, 5H, C₆H₅); espectro de masas: m/e 265 (M⁺), m/e 234 (M-OCH₃), m/e 162

10.



15. m/e 149 (C₆H₅-CH=O⁺-CH₂-CHO) m/e 105 (C₆H₅-CO⁺).

Se disuelven 2,15 g del compuesto (VIII) en 40 cc de cloruro de hidrógeno metanólico 0,5N y se agita la mezcla a la temperatura del ambiente durante una hora. Se evapora la solución hasta la mitad de su volumen, se adi-

20.

ciona éter anhidro y se recogen los cristales resultantes mediante succión y se lavan con un poco de éter seco para obtener 1,5 g de metil-3-amino-2,3-dideoxi-alfa-L-arabino-

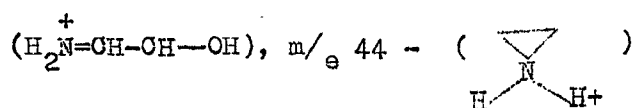
hexopiranosida (IX), p.f. 120°C desc.; $[\alpha]_D^{20} = -92^{\circ}$

($c = 0,4 \text{ H}_2\text{O}$). Rendimiento del 87%, r.p.m. (D_2O) = 1,5-2,5 δ (m, 2H, C(2)H₂), 3,2-4,0 δ (multipletes, 5H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(6)H₂), 3,41 δ (s, 3H, CH₃O-), 4,98 δ (dd, $J=3 \text{ Hz}$ y $J=1,5 \text{ Hz}$, 1H, C(1)H); espectro de masas; m/e 178 (M+1),

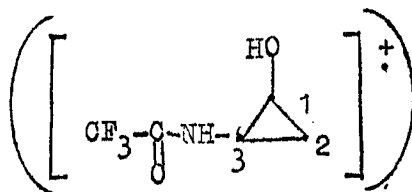
25.

m/e 146 (M-31), m/e 86

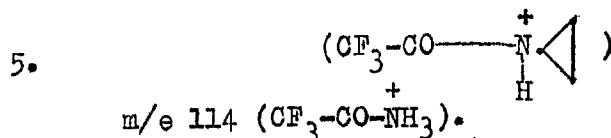
(H₂N⁺-CH³-CH²-CH¹-OCH₃), m/e 72 (H₂N⁺-CH-CH₂-CHO), m/e 59



- Se somete a reflujo 1,5 g del amino-glicosido(IX) en ácido clorhídrico N durante 5 horas. Se sacude la solución a la temperatura del ambiente con resina Amberlite IR 45 (OH⁻) hasta que el pH es 5. Se separa por filtración la resina y se evapora el filtrado en vacío hasta la mitad del volumen y luego se liofiliza. Se cristaliza el residuo en metanol-acetato de etilo para obtener 1,33 g, de 3-amino-2,3-dideoxi-L-arabino-hexosa (VI) en forma de clorhidrato, p.f. 155-157° C desc. $[\alpha]_D^{20} = -55^{\circ}$ (c = 0,5 H₂O). Rendimiento del 95%, r.m.p. (D₂O): 1,7-2,7 (m, 2H, C(2)H₂), 3,3-4,1 δ (multipletes, 5H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(6)H₂), 5,06 δ (dd, J=10 Hz y J=2Hz, 0,4H, C(1)H_{ax}), 5,46 δ (s ancho, W_{1/2} H= 7 Hz, 0,6 H, C(1)H_{eq}).
- Se adicionan, con enfriamiento y agitación 7,6 cc de anhídrido trifluoroacético a una suspensión de 1,25 g de compuesto (VI) en éter seco. Se agita la mezcla a la temperatura del ambiente durante 20 horas y se evapora la solución límpida resultante en vacío. Se disuelve el residuo sólido en 120 cc de metanol anhidro y se mantiene a la temperatura del ambiente durante 20 horas. Después de separar el disolvente se cristaliza el residuo en acetona-cloroformo para obtener 1,72 g de 2,3-dideoxi-3-trifluoroacetamido-L-arabino-hexosa (X), p.f. 177°C $[\alpha]_D^{20} = -58^{\circ}$ (c = 0,5 dioxano). Rendimiento del 90 %.
- Espectro de masa: m/e 242 (M-OH), m/e 169



m/e 155 (HO-CH-CH=NH-CO-CF₃), m/e 140 -



10. Se adiciona, en pequeñas porciones, 1,1 g de compuesto (X), durante 30 minutos, bajo agitación y a la temperatura del ambiente, a una solución de 3,17 g de cloruro de p-nitro-benzoilo en 30 cc de piridina seca y se prosigue la agitación a la temperatura del ambiente durante 20 horas. A la solución enfriada a 0°C se adiciona una solución enfriada por hielo de 1,44 g de bicarbonato sódico en 20 cc de agua y por último se vierte la mezcla en 350 cc de agua helada.
- 15.

- Se separa el precipitado por filtración, se lava con agua y se seca sobre pentóxido de fósforo. Por último se cristaliza el producto seco en dicloro-metano-éter, lo que da 2,3 g de la 1,2,3-trideoxi-4,6-di-O-(p-nitrobenzoil)-3-trifluoroacetamido-L-arabino-hex-1-enepiranososa (III), deseada, p.f. 214-215°C, $[\alpha]_D^{20} = -117^\circ$ (c = 0,5 CHCl₃). Rendimiento del 95% - r.m.p. (CDCl₃ - DMSO - d₆ 3:1): 4,3-5,6 δ (multipletes, 4H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(2)H, 4,52 δ (s ancho, W_{1/2}H, 2H, C(6)H₂), 6,57 δ (s ancho, W_{1/2}H = 5H₂, 1H, C(1)H), 8,21 δ (s, 4H aromático), 8,35 δ (s, 4H aromático), 9,27 δ (s, 1H, NH).
- 20.
- 25.

EJEMPLO 1

Preparación de 4'-epi-6'-hidroxidaunomicina (I) (IMI 23)

Se disuelven 200 mg de daunomicinona (II) en 100

cc de benceno anhidro y se adiciona a la solución 540 mg de 1,2,3-trideoxi-4,6-di-O-(p-nitrobenzoil)-3-trifluoroacetamido-L-arabino-hex-1-enepiranososa (III) y 20 mg de ácido p-toluensulfónico.

5. Se agita la mezcla reaccional a 55° C durante 20 horas y después de enfriarse a la temperatura del ambiente se filtra el precipitado formado y se cristaliza en etanol, lo que da 340 mg de 7-O-[4',6'-di-O-(p-nitrobenzoil)-3'-trifluoroacetamido-alfa-L-arabino]-daunomicinona protegida;
10. p.f. 282°C, $[\alpha]_D^{20} = +260 \pm 5$ (c = 0,05 CHCl₃).

- Se disuelve el glicósido protegido en 20 cc de dioxano y, después de enfriamiento a 0°C, se trata con hidróxido sódico acuoso 0,2 N. Después de una hora a 0°C se ajusta el pH de la solución a 4,5 con ácido clorhídrico 1N
15. y se separa el dioxano mediante evaporación en vacío. La solución acuosa resultante, después de lavado con cloroformo, se ajusta a pH 8,5 con hidróxido sódico acuoso 0,2 N y luego se extrae con cloroformo. Se seca el extracto sobre sulfato sódico anhidro y se concentra hasta pequeño volumen.
20. Se

adiciona un equivalente de cloruro de hidrógeno metanólico, lo que da 160 mg de 4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina en forma del clorhidrato, p.f. 199-201°C, $[\alpha]_D^{20} = +388 \pm 5$ (c = 0,05 CH₃OH); rendimiento del 56%.

25.

EJEMPLO 2

Preparación de 4'-epi-6'-hidroxiadriamicina (V) (IMI 31)

Se disuelven 0,25 g de 4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina (I) en una mezcla de 3,5 cc de alcohol metílico y 10 cc de dioxano anhidro y se trata, bajo agitación, con 0,9

- cc de una solución de 0,88 g de bromo en 10 cc de cloroformo. Se vierte la mezcla reaccional, con agitación, después de una hora a la temperatura del ambiente, en 75 cc de éter etílico. Se separa por filtración la 14-bromo-4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina y se disuelve en una mezcla de 5 cc de acetona y 5 cc de ácido bromhídrico 0,25 N. Después de 12 horas a la temperatura del ambiente se extrae primero la solución ácido con cloroformo, para eliminar las agliconas, y luego se extrae con n-butanol. Se efectúan varias extracciones hasta que todo el material coloreado ha pasado a la fase orgánica. Después de concentración de n-butanol bajo vacío, se obtienen 0,27 g del derivado 14-bromo. Se disuelve este producto en 10 cc de agua y se trata con 0,5 g de formato sódico.
15. Después de 48 horas a la temperatura del ambiente se evapora la mezcla reaccional hasta sequedad bajo vacío y el residuo, disuelto en 30 cc de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 por volumen), se lava con 10 cc de una solución acuosa al 1% de NaHCO_3 .
20. Se extrae la fase acuosa con cloroformo muchas veces hasta que todo el material coloreado ha pasado al disolvente orgánico. Se secan los extractos clorofórmicos combinados sobre sulfato sódico anhidro, se concentran bajo presión reducida hasta pequeño volumen y se tratan con un equivalente de ácido clorhídrico 1N en metanol anhidro. Con la adición de 10 volúmenes de éter etílico se obtienen 0,125 g de 4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina (V) en forma del clorhidrato.

P.f. 180°C desc., $[\alpha]_D^{20} = +216^\circ$ (c = 0,01 CH_3OH),

Rf cromatográfica sobre placas del gel de sílice HF (Merk) utilizando el sistema disolvente cloroformo-metanol-agua (130:60:10 por volumen) : 0,5.

Actividad biológica.

5. Materiales y métodos.

Estudios in vitro.

- Se expusieron células HeLa a los fármacos durante 2-8-24 horas, luego se separaron los fármacos y se sembraron las células en cubetas de plástico Falcon de 5 mm (200 células/placa) en medio de cultivo. Al cabo de 5 días se evaluó microscópicamente el número de colonias. Se dispusieron en cubetas de plástico Falcon de 35 mm fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), se infectaron 24 horas después con virus Moloney Sarcoma (MSV) y se trataron durante 3 días con diferentes concentraciones de los compuestos. Se evaluó microscópicamente el número de foci de células transformadas 5 días después de la infección. Se trataron de modo análogo MDF sin infectar; al final del experimento se contaron las células en un hemocitómetro. En todos los experimentos se incubaron las células en un incubador de CO₂ al 5% a 37°C.
- 10.
- 15.
- 20.

Se disolvieron los fármacos en agua destilada y luego se diluyeron en medio de cultivo.

- Los resultados se exponen como DI₅₀ (dosis de inhibición al 50%), calculado sobre líneas dosis-efectos.
- 25.

Estudios in vivo

Se probó la actividad antitumoral de los derivados bajo examen sobre ascites Sarcoma 180. Se utilizaron ratones CD 1 de 3 meses de edad. Se inocularon intraperitoneal

mente células de sarcoma 180 ascites (10^6 células/ratón).

Se disolvieron los fármacos en agua destilada, luego se diluyeron en solución Ringer y se administró intraperitonealmente 1 día después de la implantación del tumor (10 cc/kg de peso corporal).

5.

La toxicidad se evaluó mediante los hallazgos eutóxicos macroscópicos, principalmente como reducción del tamaño del bazo. La comparación de la efectividad del fármaco se basó en el aumento máximo durante el tiempo de supervivencia media, en comparación con los testigos no tratados, sobre la dosis utilizada. El número de supervivientes de vida prolongada (LTS) se refiere a ratones exentos de tumor al término del experimento (60 días).

10.

Resultados:

15.

En la Tabla 1 se expone la actividad de los compuestos investigados en comparación con los compuestos afines respectivos, daunomicina y adriamicina, sobre los sistemas "in vitro", ensayados. Ambos compuestos mostraron una menor actividad que el compuesto afin sobre células

20.

HeLa, sobre foci MSV y sobre proliferación de MEF. La disminución de la actividad fué superior para la 4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina, en comparación con la daunomicina, que para la 4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina, en comparación con la adriamicina.

25.

El efecto observado sobre ascites Sarcoma 180 se expone en la Tabla 2. La dosis antitumoral óptima (o sea la dosis con la que se halló en máximo efecto antitumoral) fué de 10 mg/kg para los dos nuevos derivados probados.

En la dosis óptima, la actividad antitumoral, considerada según el aumento de la duración de la vida de los ratones tratados en comparación con los testigos, resultó inferior a la observada después del tratamiento de daunomicina o adriamicina.

5. Con respecto a la toxicidad, un elemento importante y frecuentemente determinativo que debe ser tenido en consideración después de un tratamiento prolongado con elevadas dosis acumulativas de antibióticos antitumorales, puede observarse que los nuevos derivados probados son definitivamente menos tóxicos que los compuestos afines.

TABLA 1

Actividad "in vitro" de 4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina y 4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina. DI_{50} ng/cc)

15. .

Código de Laboratorio	Compuesto	Eficacia clónica de células HeLa			Formación de focis MSV	Proliferación de MEF
		2	8	24		
	daunomicina ***	30	13	3	5,5	9
IMI 23	4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina	I*	I*	1300	100	250
	adriamicina ***	280	110	18	2,5	7
IMI 31	4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina	900	1000	1000	25	50

20.

25.

* carece de actividad a la dosis máxima probada ($10 \mu\text{g}/\text{cc}$)
 *** datos medios sobre diversos experimentos.

TABLA 2

Actividad de 4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina y 4'-epi-6'-
-hidroxi-adriamicina sobre ascites sarcoma 180*

	Código de laborat ^o	Compuesto	Dosis (mg/kg)	T/C ^{***} %	LTS ^{****}	Tox ^{*****}
5.		daunomicina ^{*****}	0,5	146	3/20	
	1		172	8/55		
	<u>2</u>		<u>192</u>	11/68		
10.			5	176		14/50
			8	78		7/10
	IMI 23	4'-epi-6'-hidroxi- -daunomicina	2	100		
			<u>10</u>	<u>167</u>		
15.			50	137		1/10
		adriamicina ^{*****}	0,5	142	1/10	
			1	183	25/159	
			<u>2</u>	<u>210</u>	30/125	
20.			5	243	27/125	7/125
			10	212	18/139	18/139
	IMI 31	4'-epi-6'-hidroxi- -adriamicina	7,5	143	1/10	
			<u>10</u>	<u>162</u>	2/10	
25.			15	134	2/10	atóxico con do- sis de 15 mg/kg

* 1 tratamiento i.p. en el día 1.
 ** tiempo medio de supervivencia en % sobre los testigos.
 *** supervivientes de larga vida en 60 días.
 **** ratones que fallecieron por efectos tóxicos, sobre el to-
 ***** datos medios de una serie de experimentos. /tal.

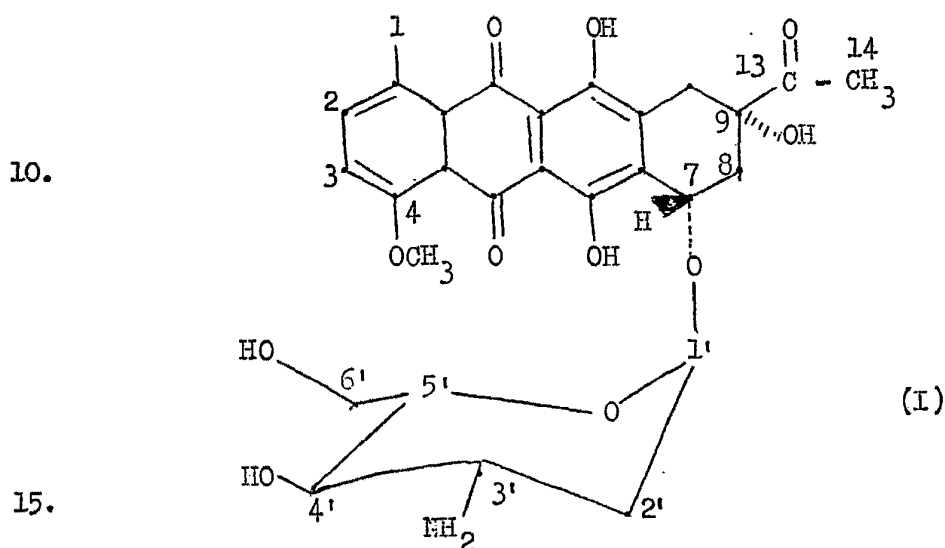
Las dosis óptimas están subrayadas.

REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente italiana nº 46644/74 del 29 de Octubre de 1974.

5.

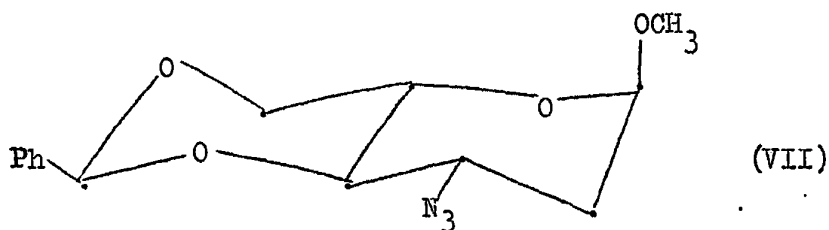
1.-Un procedimiento para la preparación de 4'-epi-6'-hidroxidaunomicina, de la fórmula



15.

caracterizado porque en su realización comprende, una primera etapa en la que se somete a una reducción catalítica el metil-3-azido-4,6-O-bencilideno-2,3-dideoxi-alfa-L-arabino-hexopiranosido de la fórmula

20.

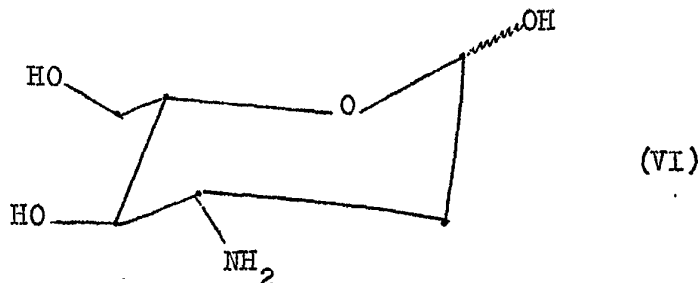


25.

en donde resulta después de la separación del sustituyente bencilidénico e hidrólisis del glicósido de metilo resul-

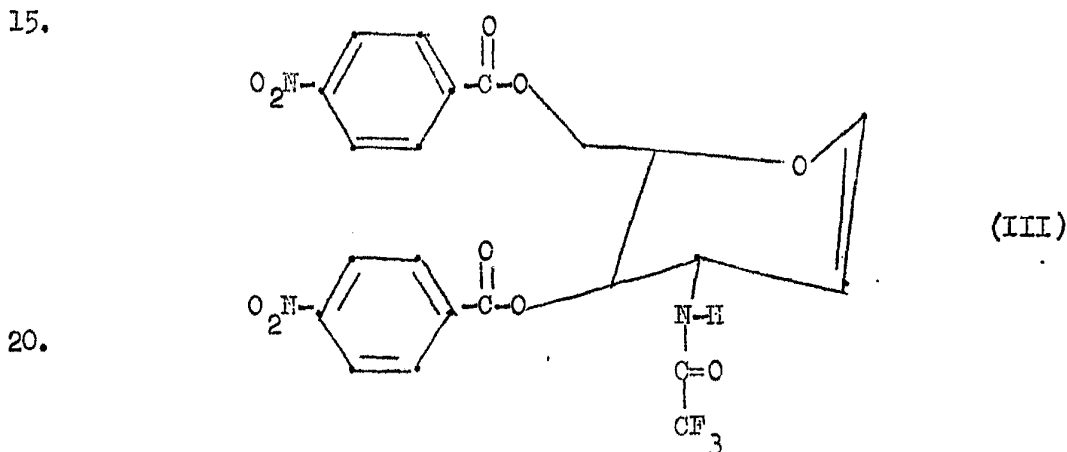
442144

tante, 3-amino-2,3-dideoxi-L-arabino-hexosa de fórmula

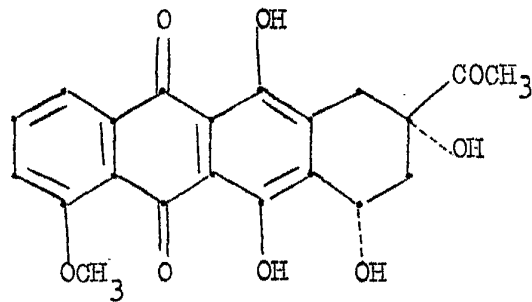


10.

en su forma de clorhidrato; cuyo compuesto intermedio, de fórmula (VI), se hace reaccionar, en una segunda etapa con anhídrido trifluoroacético, seguido de tratamiento con un alcohol alifático inferior, para obtener su derivado N-trifluoroacético que se hace reaccionar, por último, con cloruro de p-nitrobenzilo en piridina, seguido de un suave tratamiento alcalino, para constituirse la 1,2,3-trideoxi-4,6-di-O-(p-nitrobenzilo)-3-trifluoroacetamido-L-arabino-hex-1-enepiranosa, de fórmula



que, en una etapa ulterior del proceso se hace reaccionar con daunomicinona, de fórmula



(II)

5.

en un disolvente orgánico apropiado y en presencia de un catalizador de ácido de donde resulta la 7-O-[4',6'-di-O-(p-nitrobenzoil)-3'-trifluoroacetamido-alfa-L-arabino]-daubomicinona glicosídica protegida de la que, después de un tratamiento alcalino para separar los grupos protectores, se obtiene el producto descado en forma del clorhidrato.

10.

2.-Un procedimiento para la preparación de 4'-epi-6'-hidroxidaunomicina.

15.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 18 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 28 de Octubre de 1975.

p. a.

JAIME ISERN

p. p.


Jaime Isern