



**NORGE**

**[NO]**

**STYRET  
FOR DET INDUSTRIELLE  
RETTSVERN**

**[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 147953**

(51) Int. cl.<sup>3</sup> C 07 H 15/24

(21) Patentsøknad nr. 781949

(22) Inngitt 05.06.78

(24) Løpedag 30.09.77

(62) Avdelt fra søknad nr. 773353

(41) Alment tilgjengelig fra 06.04.78

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 05.04.83

(30) Prioritet begjært 05.10.76, 24.05.77, Japan nr. SH051-120237,  
SHO 52-60908

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte ved fremstilling av  
terapeutisk aktive antracyklinglukosider.

(71)(73) Søker/Patenthaver ZAIDANHOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI,  
14-23, Kamiosaki 3-chome,  
Shinagawa-ku, Tokyo,  
Japan.

(72) Oppfinner HAMAO UMEZAWA, Nerima-ku, Tokyo,  
TOMIO TAKEUCHI, Shinagawa-ku, Tokyo,  
TOSHIKAZU OKI, Yokohama-shi, Kanagawa-ken,  
TAIJI INUI, Chigasaki-shi, Kanagawa-ken,  
Japan.

(74) Fullmektig A/S Oslo Patentkontor Dr. ing. K. O. Berg, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Ingen

Foreliggende oppfinnelse vedrører en analogifremgangsmåte ved fremstilling av nye terapeutisk aktive antracyklinglukosider med den generelle formel II som angitt i kravets  
5 ingress.

Forskjellige typer antracyklinglykosider er blitt funnet i vekstmedia for mikroorganismer, hvilket er beskrevet i litte-  
10 raturen. Blant disse har daunomycin og adriamycin allerede funnet klinisk anvendelse ved behandling av kreft hos mennesker, og aclacinomycin A, carminomycin og rubidazone er under klinisk utprøving og har vakt stor interesse innen feltet kreft-kjemoterapi.

15 Ved undersøkelse av kulturer av streptomyces med hensyn til metabolitter med antitumor-aktivitet er det funnet nye forbindelser, og etter rensning og karakterisering basert på deres fysiokjemiske egenskaper er det nå underbygget at de nye  
20 antibiotika som er betegnet MA 144-S1 og -S2 er nye forbindelser med potent antitumor-aktivitet og som utviser lav toksisitet.

Fremstilling av adriamycin ved kultivering av *S. neuceticus* var caesius er vist i US-patent nr. 3.590.028. Kjemisk  
25 omdannelse av daunomycin til adriamycin er vist i US patent nr. 3.803.124.

Daunomycin (fremstilt ved dyrkning av *S. peuceticus* i U.K. 1.003.383) kan være den samme som Rhône-Poulenc's 13.057 R.P. (tidligere betegnet med rubidomycin og nå betegnet med daunori-  
30 bicin, (se de engelske patenter nr. 985.598, 1.188.262 og 1.241.750 og US-patent nr. 3.616.242) og er sannsynligvis identisk med Ciba's danubomycin som er vist i US-patent nr. 3.092.550 og UK-patent nr. 901.830. Se også US-patent nr. 3.686.163 vedrørende dihydrodaunomycin.  
35

Antracyklin-antibiotika inneholdende aklavinon-aglykongru-  
per er åpenbart i

- 5 (a) aclacinomycin A og B i US patent nr. 3.988.315 og Oki'et  
al. i J, Antibiotics 28: 830 (1975).  
(b) Aklavin i J. Bacteriol. 72:90 (1956).

Antracyklin-antibiotika med  $\epsilon$ -pyrromycinon-aglykongru-  
per er beskrevet i litteraturen som følger:

- 10 (c) musettamycin og marcellomycin fra bohem-syrekompleks i  
J, Antibiotics 30:525 (1977).  
(d) pyrromycin i Chem.Ber. 92:1904 (1959)  
(e) cinerubin A og B i UK 846.130 (se også US patent nr.  
15 3.864.480 og Keller-Schierlein et al, Antimicrobial Agents  
and Chemotherapy, side 68 (1970).

Andre antracyklin-antibiotika med aglykongru-  
per fra aklavinon og  $\epsilon$ -pyrromycinon er beskrevet i

- 20 f) Nogalamycin i J.Amer.Chem. Soc.99:542 (1977)  
g) Steffimycin i J. Antibiotics 27:805,809 (1974).  
h) Carminomycin i J. Antibiotics 27:254 (1974) i vesttysk  
patent nr. 2.362.707 og i J.Amer. Chem.Soc. 97:5955 (1975).  
i) Trypanomycin i Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1:385  
25 (1972).  
j) Requinomycin i J. Antibiotics 25:393 (1972).  
k) Galirubin A og B i Naturwiss. 52:539 (1965) og Chem.  
Abst. 67:90573z(1967).

- 30 For ytterligere opplysninger og sammendrag vedrørende antra-  
cyklinantibiotika, se Index of Antibiotics from Actinomycetes,  
Hamao Umezawa, Editor-in-Chief, University Park Press, State  
College, Pennsylvania, USA (1967) som følger:

	<u>Antibiotikum</u>	<u>Sidetall</u>
	Aklavin	111
5	Cinerubin A	220
	Cinerubin B	221
	Danubomycin	242
	Daunomycin	243
	Pyrromycin	524
10	Rhodomycin A, B	561
	Rubidomycin	574

I boken Antibiotics, bind I, Mechanism of Action, redigert av David Gottlieb og Paul D. Shaw, Springer-Verlag New York Inc., N.Y., N.Y (1967) er det på sidene 190-210 gitt en  
 15 oversikt av A. DiMarco under overskriften Daunomycin and Related Antibiotics. Information Bulletin, Nr. 10, International Center of Information of Antibiotics, i samarbeide med WHO, desember 1972, Belgia, gir en oversikt over antracykliner og deres derivater.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremstilling av nye antracyklin-glykosidantibiotika. Disse antibiotika er nyttige ved behandling av bakterieinfeksjoner og for inhibering av tumorer hos pattedyr. Mere spesielt vedrører oppfinnelsen fremstilling av nye antracyklinglykosid-antibiotika, betegnet  
 25 MA144, -S1 og -S2. De nye forbindelsene fremstilles ved sur hydrolyse av forbindelsen med den generelle formel III, angitt i kravets karakteriserende del. Fremstilling av forbindelsene med formel III er vist i norsk patentsøknad 77.3353. Disse antibiotika fremstilles fra utgangsmaterialer erholdt ved  
 30 dyrkning av MA144-produserende stammer av streptomyces eller ved kjemisk eller enzymatisk omdannelse av aclacinomycin A eller cinerubin A eller MA144-M2 eller MA144-M1 eller MA144-N1 eller rhodirubin A, MA144-Y, MA144-G1, MA144-G2, MA144-U1, MA144-U2 eller materialer som inneholder disse.

35

5

10 Oppfinnelsen tilveiebringer således de følgende antibiotika med antitumor-virkning, nemlig MA144, -S1 og -S2 som

- a) utviser antimikrobiell aktivitet mot grampositive bakterier,
- 15 b) er effektive ved inhibering av vekst av ondartede svulster hos pattedyr, og
- c) utviser høy cytotoxicitet og således inhiberer vekst og dannelse av RNA i pattedyr-tumorceller i kultur.

20 Fysio-kjemiske egenskaper for disse MA144 komponenter er som følger:

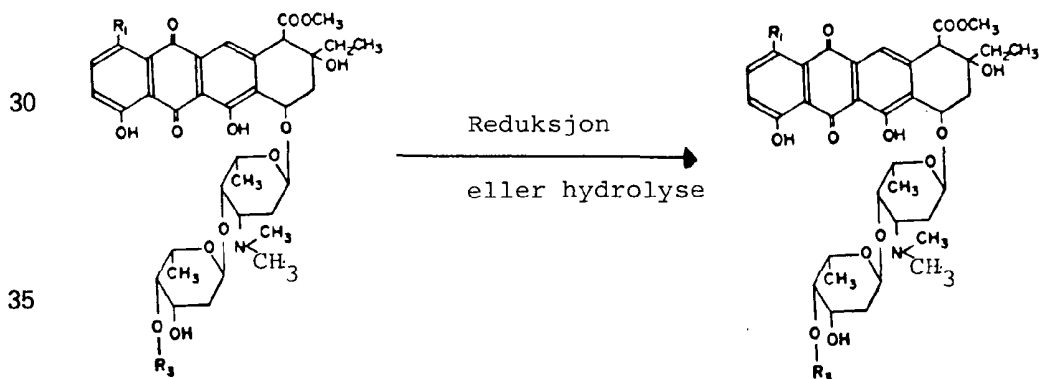
MA144-S1 kan isoleres som et gult amorft pulver med et smeltepunkt i området 144-147°C og er optisk aktivt med  $[\alpha]_D^{20} + 77^\circ$  (c=I.O.CHCl<sub>3</sub>; og er svakt basisk antracyklinglykosid, 25  
2-deoksy-L-fukosyl-L-rhodosaminyl-aklavinon med den empiriske formel C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>O<sub>13</sub>N.

30 MA144-S2 kan isoleres som et rødt amorft pulver med et smeltepunkt i området 154-158°C, og er svakt basisk antracyklinglykosid, 2-deoksy-L-fukosyl-L-rhodosaminyl-ξ-pyrromycinon, med den empiriske formel C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>O<sub>14</sub>N.

35 Fig. 1 viser infrarødt absorpsjonsspektrum for MA144-S1 i kaliumbromid.

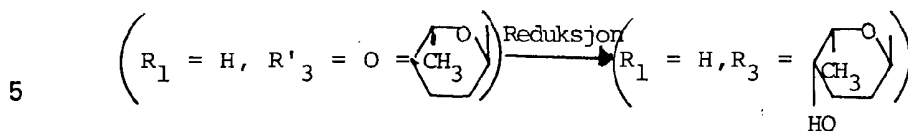
Fig. 2 viser infrarødt absorpsjonsspektrum for MA144-S2 i kaliumbromid.

- Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer to nye antracyklin-antibiotika; MA144 -S1 og -S2 som er funnet å utvise antibakteriell og antitumor aktivitet. Mere spesielt utviser forbindelsene i henhold til oppfinnelsen aktivitet mot gram-positive bakterier, inhiberer veksten av forskjellige pattedyrtumorer såsom LL210 og P 388 leukemi hos mus samt utviser lav toksisitet.
- 5
- 10 Følgelig er forbindelsene ifølge oppfinnelsen nyttige som antibakterielle og antitumor-midler. Som brukt i det etterfølgende betegner MA144 bestanddeler et antibiotikum omfattende minst én av MA144-S1 eller -S2.
- 15 I henhold til fremgangsmåten omdannes forbindelsene fremstilt i henhold til norsk søknad nr. 77.3353, nemlig aclacinomycin A, cinerubin A rhodirubin A, MA144-M1, MA144-M2, MA144-N1, MA144-G1, MA144-G2, MA144-U1, MA144-U2, MA144-Y eller blandinger av disse, kjemisk til MA144-S1, -S, -N1 eller blandinger derav. Utgangsmaterialene kan anvendes i ren form, som et salt eller i uren form, dvs. en form hvor materialene som inneholder antracyklinbestanddelene er et fermenteringsmedium eller et råekstrakt fra et slikt medium.
- 20
- 25 Den kjemiske omdannelse kan lettere sees fra det følgende reaksjonsskjema:



i) Aclacinomycin A

MA144-N1



ii) Aclacinomycin A

10

MA144-N1

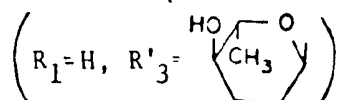
MA144-G1

MA144-U1

MA144-Y

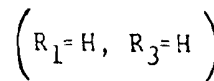
15

MA144-M1



Hydrolyse

MA144-S1

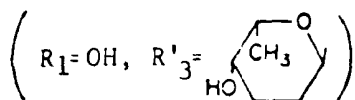


20

MA144-G2

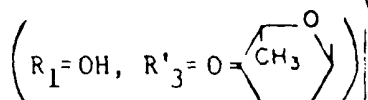
MA144-U2

Rhodirubin A



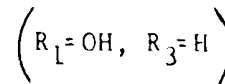
25

Cinerubin A



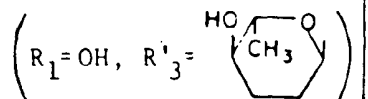
Hydrolyse

MA144-S2



30

MA144-M2



35

Dvs. at MA144-S1 og -S2 kan fremstilles ved sur hydrolyse av  
aclacinomycin A (japansk patentsøknad Sho 51-15690), MA144-  
M1 (japansk patentsøknad Sho 51-39688), MA144-N1, MA144-  
5 M2 (japansk patentsøknad Sho 51-39688), cinerubin A, MA144-  
G1, MA144-U1, MA144-U2, MA144-Y eller rhodirubin A (japansk  
patentsøknad Sho 51-98113).

10

15

20

25

30

35



147953

8

Fysiokjemiske egenskaper for MA144 komponenter

De fysiokjemiske egenskapene for MA144-S1 og -S2 er som følger:

MA144	S1	S2
Utseende	Svakt basiskt amorft gult pulver	Svakt basiskt amorft rødt pulver
Elementæranalyse	C    H    N    O	C    H    N    O
Funnet	61.37 6.45 1.97 29.36	60.09 6.13 1.88 30.94
Beregnet	61.79 6.84 2.00 29.72	60.41 6.34 1.96 31.13
Empirisk formel	$C_{36}H_{45}O_{13}N$	$C_{36}H_{45}O_{14}N$
Molekylvekt	699.8	715.8
Smeltepunkt (°C.)	144-147	154-158
Spesifikk rotasjon $[\alpha]_D^{20}$	+77° (C=1.0, CHCl <sub>3</sub> )	-
Oppløselighet	Samme som MA144-G1	Samme som MA144-G1
R <sub>f</sub> verdier ** * C:M = 20:1	0.14	0.14
Reaksjon	Samme som MA144-G1	Samme som MA144-G2

MA144	S1	S2
UV og synlig absorpsjonsspektrum og maks. ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) (heltrukket linje)	Fig. 5 230 (638), 258.5 (371), 289.5 (160), 432 (177)	Fig. 6 234.5 (607), 258.5 (306), 293 (110), 491 (189)
i 0.1N HCl-MeOH (stiplet linje)	229.5 (652), 258.5 (380), 289.5 (163), 431 (192)	234.5 (629), 258.5 (318), 293 (114), 491 (197)
i 0.1N NaOH-MeOH (-.-.- line)	237.5 (553), 286 (141), 320 (90), 524 (161)	242 (606), 566 (244), 606 (210)
Infrarødt absorpsjonsspektrum (KBr)	Fig. 1	Fig. 2
NMR sepktum (PMR)	Fig. 3	Fig. 4

147953

10

Strukturen av MA144-S1 og -S2 fremstilt i henhold til oppfinnelsen ble bestemt på følgende måte:

- 5 Ved sur hydrolyse med 0,1N saltstyre i 30 min. ved 85°C stemte de fysiokjemiske egenskaper, så som absorpsjonsspektra for ultraviolett, synlig og infrarøde områder, masse- og kjernemagnetisk resonans, smeltepunkt, elementæranalyse og R<sub>f</sub>-verdier for silika-gel-tynnsljikt av aglycon-delen
- 10 erholdt fra MA144-SL fullstendig med de for aklavinon (Tetrahedron Lett. nr. 8, 28-34, 1960), og de erholdt fra aglycon-delen erholdt fra MA144-G2, -S2 og -U2 fullstendig med de for  $\xi$ -pyrromycinon (Chem.Ber. 92, 1880-1903, 1959). På den annen side ble sukkerenhetene som eksisterte i den
- 15 vannoppløslige fraksjon av de ovenfor nevnte hydrolysater bestemt ved silikagel-tynnsljikt-kromatografi (Merck Co. "60F<sub>254</sub>" silikagelplate, n-butanol:eddiksyre:vann = 4:1:1) ved å sammenligne deres R<sub>f</sub>-verdier, etternøytralisering og konsentrasjon, med de for autentiske sukre, erholdt fra
- 20 aklacinomycin A (J.Antibiotics, 28, 830-834, 1975) og streptolydizin (J. Amer. Chem. Soc. 86, 3592-3594, 1972).

R<sub>f</sub>-verdier for sukkerenhetene erholdt fra MA144 komponentene er vist i den etterfølgende tabell, og det finnes 2 typer

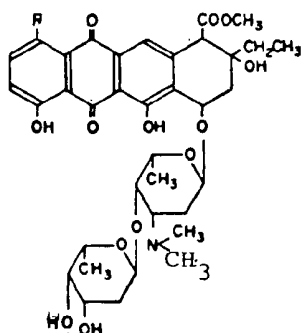
25 sukre i MA144-S1 og -S2.

R<sub>f</sub>-verdier for sukkerenhetene av  
MA 144-komponenter

30	Forbindelse	R <sub>f</sub> -verdi					
		<u>0,16</u>	<u>0,20</u>	<u>0,60</u>	<u>0,72</u>	<u>0,83</u>	<u>0,78</u>
	MA144-S1	+	-	+	-	-	-
	MA144-S2	+	-	+	-	-	-

Fra en sammenligning med R<sub>f</sub>-verdier, forskjellige fargereaksjoner og optisk rotasjon for autentiske sukre, ble en sukkerenhet tilsvarende R<sub>f</sub> = 0,16 identifisert som L-rhodosamin, R<sub>f</sub> = 0,60 var 2-deoksy-L-fukose, R<sub>f</sub> = 0,72 var L-rhodinose og R<sub>f</sub> = 83 var L-cinerulose, mens sukrene med R<sub>f</sub> = 0,20 og 0,78 var ukjente.

MA144-S1 og -S2 inneholder to typer sukkerenheter, nemlig L-rhodosamin og 2-deoksy-L-fukose. Metyl-2-deoksy-L-fukosid og 1-deoksy-pyrromycin eller pyrromycin ble dannet ved metanolyse og følgelig ble den følgende struktur for 2-deoksy-L-fukosyl-L-rhodosaminyl-aklavinon eller  $\epsilon$ -pyrromycinon påvist for MA144-S1 og -S2.



MA144-S1 : R = H

MA144-S2 : R = OH

#### Antimikrobiell aktivitet for MA144 bestanddelene

MA 144-S1 og -S2 utviser antimikrobiell aktivitet overfor forskjellige typer mikroorganismer. Den minimale inhiberende konsentrasjon av det foreliggende antibiotika ble bestemt ved buljongfortynningsmetoden og er vist i den etterfølgende tabell:

147953

12

Antimikrobielt spektrum  
for MA144 bestanddeler

5	Undersøkt mikroorganisme	Minimal inhiberende konsentrasjon	
		(µg/ml )	
		S1	S2
	Staph. aureus FDA 209 P	6,25	6,25
	Staph. aureus Smith	3,1	0,78
10	Bac. subtilis ATCC 6633	3,1	3,1
	Bac. cereus ATCC 9634	1,56	0,78
	Bac. megaterium NRRL B-938	3,1	3,1
	Sar. lutea ATCC 9341	1,56	1,56
	Mic. flavus	1,56	0,78
15	Cerv. bovis 1810	0,78	0,78
	Ps. fluorescens NTHJB-254	>100	>100
	Pr. morgani	>100	>100
	Mycobact. smegmatis ATCC 607	>100	>100
	Can. albicans IAM 4905	>100	>100
20	Can. tropicalis IAM 4942	>100	>100

25 Som vist foran utviser MA144 komponentene ifølge oppfinnelsen antimikrobiell aktivitet, spesielt mot gram-positive bakterier, og de er derfor terapeutisk nyttige ved behandling av difteri, tuberkulose, lungebetennelse, tetanus og andre infeksjonssykdommer forårsaket av gram-positive bakterier.

30 Antitumor aktivitet og akutt toksisitet for MA144 bestanddelene

35 MA144 komponentene fremstilt ifølge oppfinnelsen utviser markert antitumor-aktivitet og lav toksisitet i eksperimentelle dyreforsøk og er således terapeutisk nyttige ved inhibering av vekst av pattedyrstumorer. Spesielt viste forbindelser ifølge oppfinnelsen er markant inhiberende effekt mot museleukemi L1210. F.eks. ble BDF<sub>1</sub> med vekt 19-22 g inokulert introperitonealt med  $1 \times 10^6$  L1210 celler/mus og 24 h etter onokulering ble forbindelsen fremstilt i henhold til oppfinnelsen injisert intraperitonealt én gang daglig i 9 på hver-

- andre følgende dager. På den 30. dag ble den prosentvise forlengelse av overlevelsestiden i forhold til kontrollmus og fremgår av den etterfølgende tabell sammen med de respektive LD<sub>50</sub>-verdier for en enkelt intraperitoneal injeksjon i mus.

Terapeutisk effektivitet mot museleukemi  
L1210 og toksisitet for MA144 bestanddeler

10	Forbindelse	Forlengelse av overlevelsestiden		
		(% T/C) MA144	S1	S2
	Anti-L1210 aktivitet (Dose mg/kg/dag)			
	20	-	-	
15	10	98	-	
	5	140	85	
	2,5	168	110	
	1,25	133	145	
	0,6	114	130	
20	0,3	96	118	
	0,15	-	97	
	Toksisitet (mus)		LD <sub>50</sub>	
25	Intraperitoneal administrering (mg/kg)	24,4	12,5	

Cytotoksisitet av MA144 komponentene overfor kultiverte L1210 celler

- Forbindelsene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse inhiberer vekst pattedyrtumorceller i en kultur, spesielt ved lav konsentrasjon, og inhiberer fullstendig RNA syntese. Ved dette forsøk ble L1210 celler inokulert i RPMI 1640 medium (Nissui, Rosewell Park Memorial Institute 1640) inneholdende 20% kalveserum og kultivert ved 37°C i 3 døgn i en CO<sub>2</sub>inkubator. På den første dag ble forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse tilsatt i en konsentrasjon på 0,1 µg/ml. I forsøket hvor C<sup>14</sup> ble innarbeidet, ble forbindelsene ifølge oppfinnelsen tilsatt ved en konsentrasjon på 0,5 µg/ml for RNA syntese og 0,1 µg/ml for DNA syntese, og ytterligere ble

147953

14

5 C<sup>14</sup>-thymidin eller -uridin tilsatt mediet i 60 min. ved 37°C. Effektene på vekst og syntese av DNA og RNA ble indikert som prosent inhibering i forhold til kontroll i den etterfølgende tabell. Fra resultatene fremgår det at MA144 komponentene markant inhiberer veksten og RNA syntesen for kultiverte L1210 celler ved lav konsentrasjon. Disse resultater understøttes av den terapeutiske effektivitet på eksperimentelle tumorer hos dyr.

10

Effekt av MA 144-S1 og -S2 på vekst og makromolekylær syntese i kultiverte L1210 celler.

15	Forbindelser	Vekst (andre dag)	% inhibering	
			Syntese RNA	DNA
	MA144-S1	86,0	74,1	76,5
	MA144-S2	88,1	65,6	48,8

20 Terapeutisk anvendelse av  
MA144 komponenter

25 Som ovenfor er MA144-S1 og -S2 nye antibiotika som er nyttige både som human og veterinær medisin, og som ytterligere utviser en markant inhiberende virkning mot ondartede tumorer hos dyr og mot gram-positive bakterier.

30 Forbindelsene fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse danner ikke-toksiske syreaddisjonssalter med et antall organiske og uorganiske saltdannende forbindelser og danner ikke-toksiske komplekser med deoksyribonukleinsyre. Således kan syreaddisjonssalter dannet med slike farmasøytisk aksepterbare syrer, som svovelsyre, fosforsyre, saltsyre, eddiksyrer, propionsyre, oleinsyre, palmitinsyre, sitronsyre, ravsyrer, vinsyre, glutaminsyre, pantotensyre etc.

35

E K S E M P E L

400 g MA144-M1 erholdt i henhold til eksempel 7 i norsk  
5 søknad 77.3353 ble oppløst i 100 ml 0,5%ig saltsyre og hydro-  
lysert ved 20°C i 15 min. Etter nøytralisering med fortynnet  
alkali til pH 7,0 ble MA144-S1 ekstrahert 2 ganger med  
200 ml kloroform og kloroformlagene slått sammen og inndam-  
pet under nedsatt trykk. Aktive fraksjoner inneholdende  
10 MA144-S1 som ble erholdt under kolonnnekromatografi over  
silikagel (3 x 25 cm kolonne) under anvendelse av metanol-  
toluenblandingen (5 : 100) ble slått sammen, konsentrert og  
satt til n-heksan. Det ble erholdt 237 mg gult pulver av  
MA144-S1.

15

20

25

30

35



147953

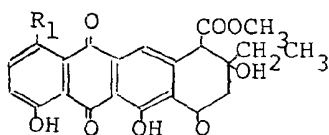
16

P a t e n t k r a v

5

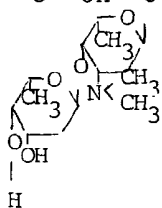
Analogifremgangsmåte ved fremstilling av terapeutisk aktive antracyklin-  
glykosider med den generelle formel II

10



----- (II)

15

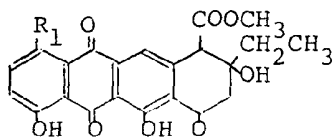


eller ikke toksisk syreaddisjonssalt derav, hvori

20

R<sub>1</sub> er hydrogen eller en hydroksylgruppe, k a r a k t e r i -  
s e r t v e d at en forbindelse av den generelle formel

III



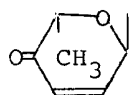
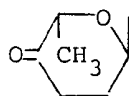
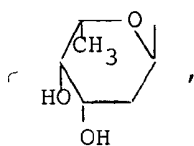
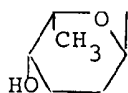
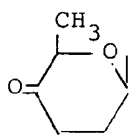
25

----- (III)

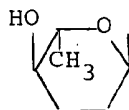
30

hvori R<sub>1</sub> har den ovenfor angitte betydning og R<sub>3</sub> er

35



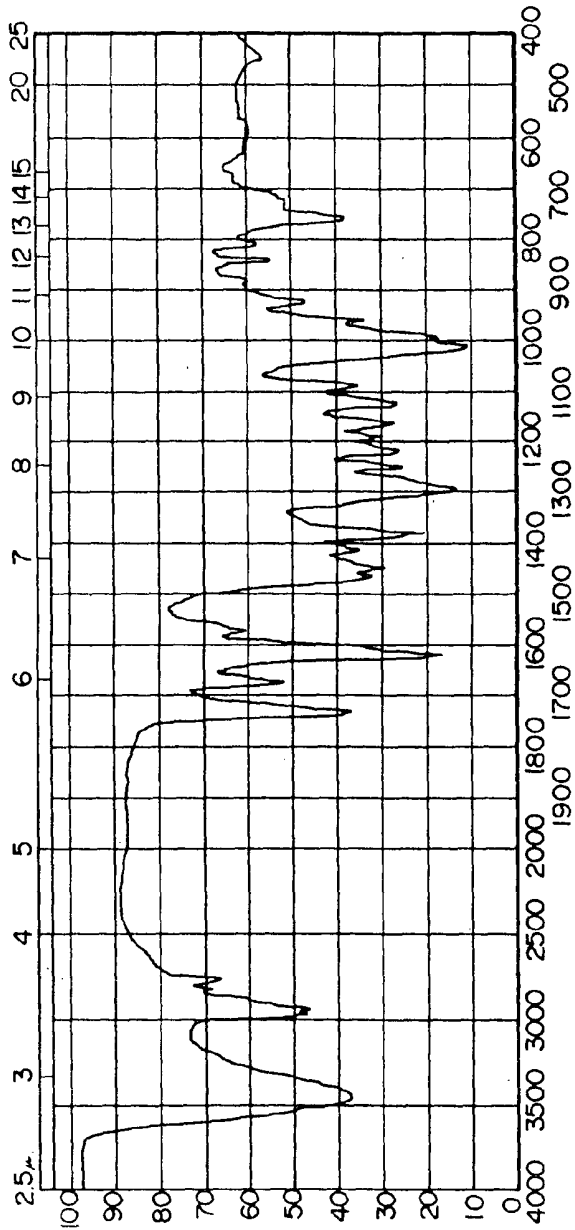
eller



hydrolyseres med en mineralsyre.

147953

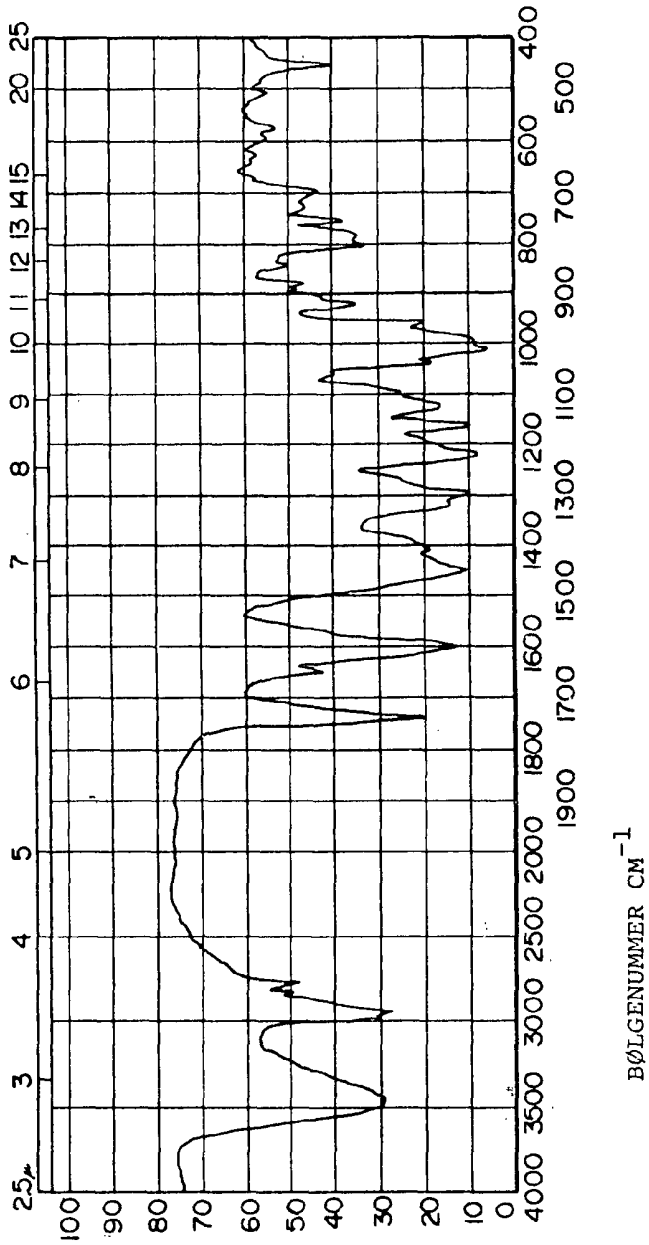
FIG. 1



BØLGENUMMER CM<sup>-1</sup>

147953

FIG. 2



147953

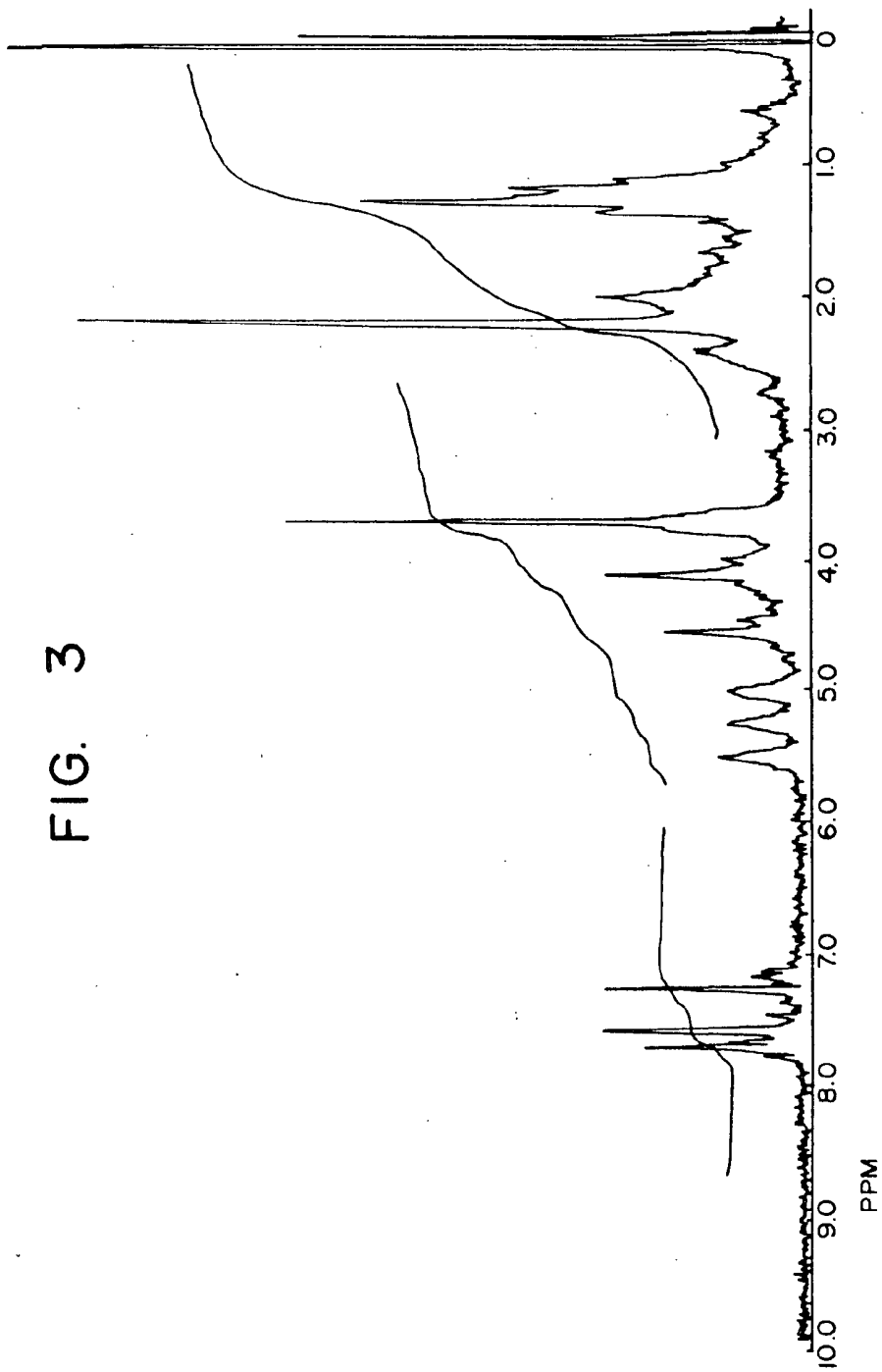


FIG. 3

147953

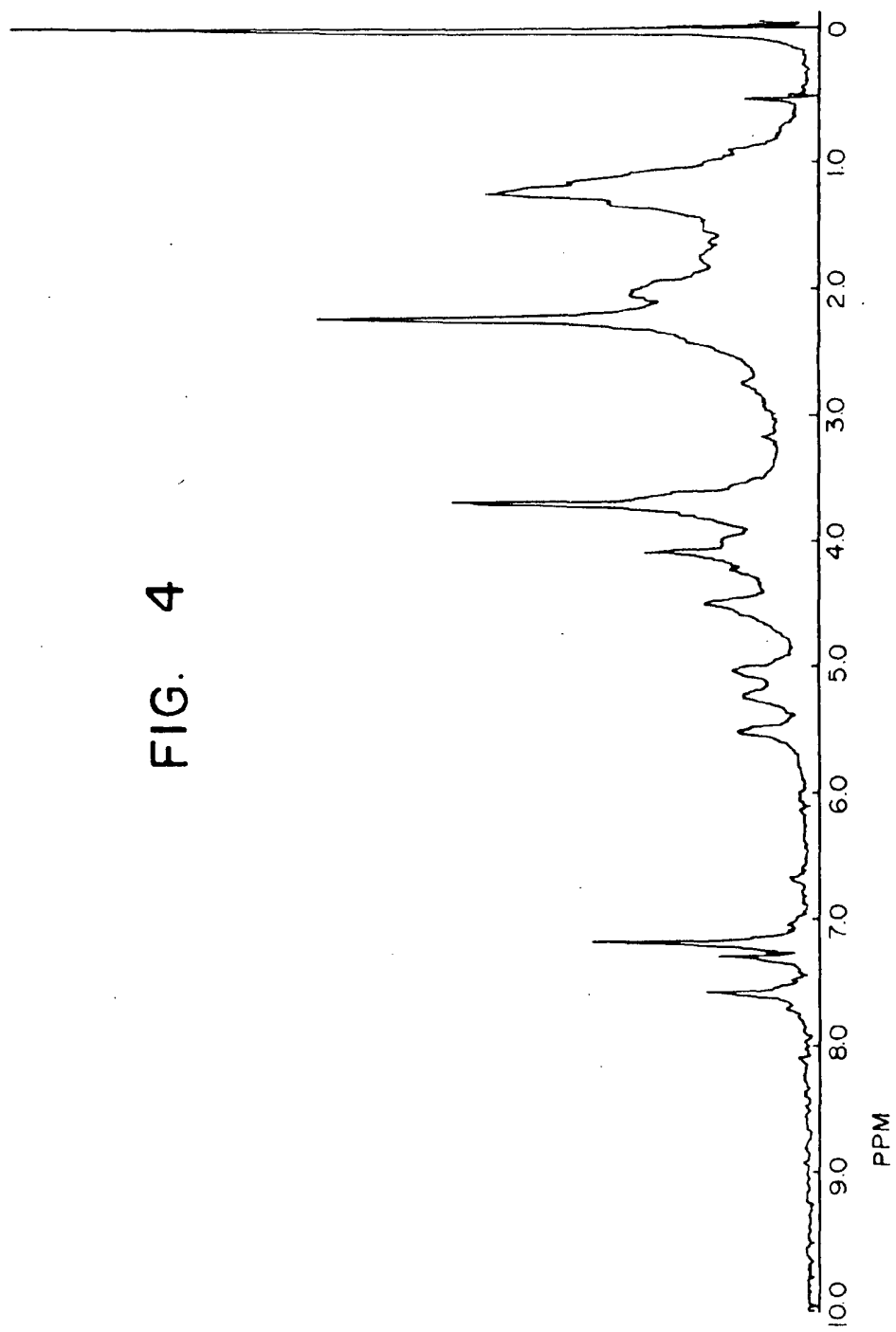
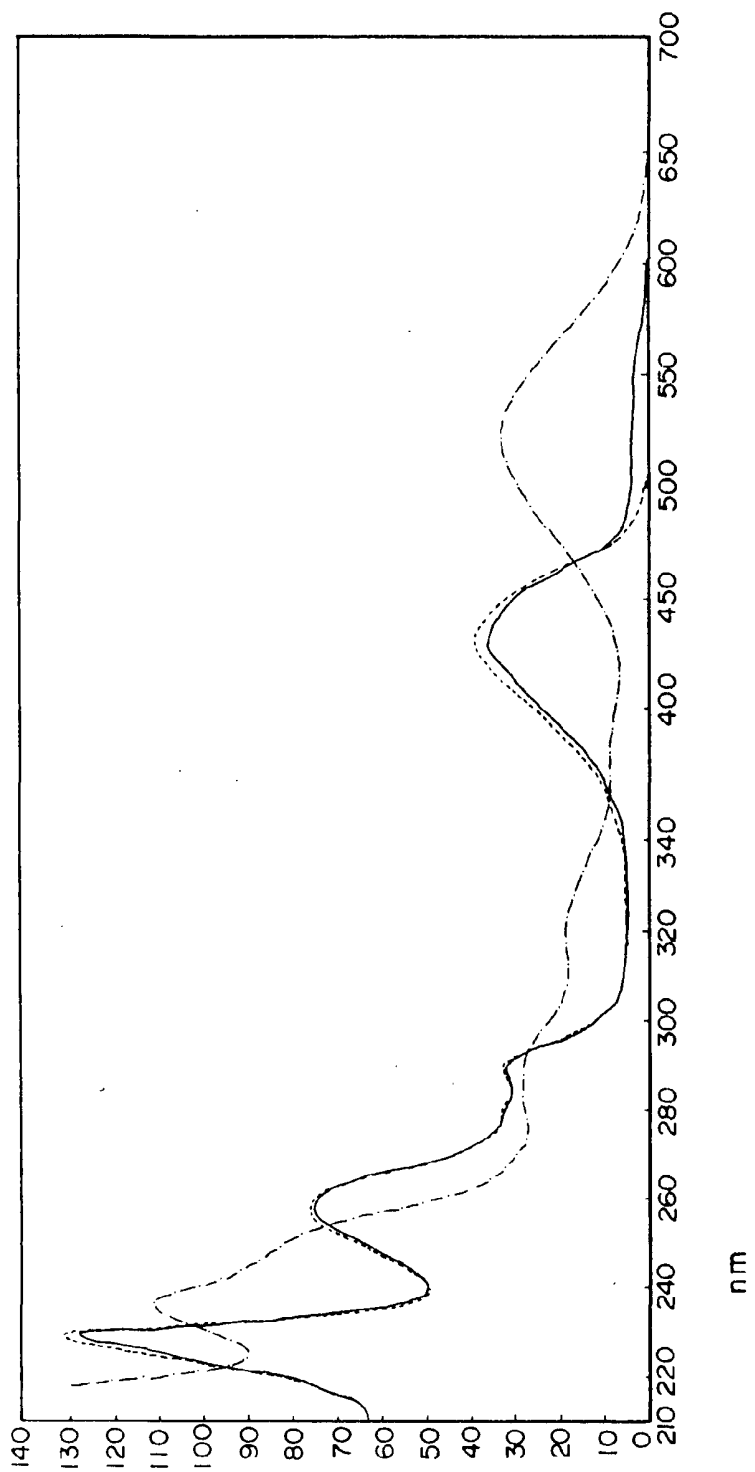


FIG. 4

FIG. 5



147953

FIG. 6

