



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl.³: C 07 H 19/16

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



PATENT A5

629 220

① Gesuchsnummer: 15924/76

② Anmeldungsdatum: 17.12.1976

③ Priorität(en): 18.12.1975 GB 51967/75

④ Patent erteilt: 15.04.1982

⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.04.1982

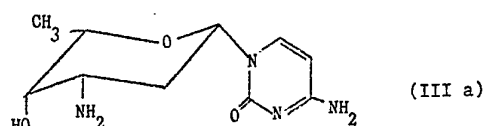
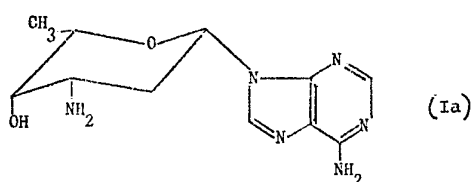
⑥ Inhaber:
Società Farmaceutici Italia S.p.A., Milano (IT)

⑦ Erfinder:
Ettore Lazzari, Milano (IT)
Federico Arcamone, Nerviano/Milano (IT)
Aurelia di Marco, Milano (IT)

⑧ Vertreter:
Bovard & Cie., Bern

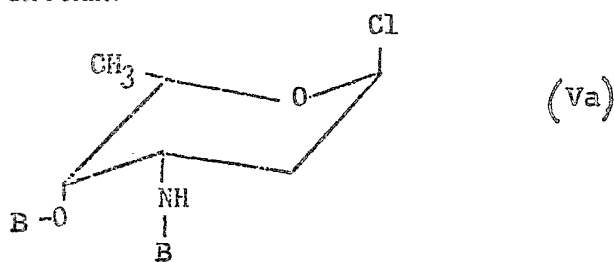
⑨ Verfahren zur Herstellung von Daunosaminnucleosiden.

⑩ Die neuen Verbindungen der Formeln Ia und IIIa werden erhalten durch Umsetzen von N, O-geschützten Derivaten von 3-Amino-2,3,6-trideoxy-L-lyxo-hexopyranose mit 6-Benzoyladenin, bzw. mit 4-Benzoyl-2,4-bis-trimethylsilylcytosin und anschliessendem Abspalten der Schutzgruppen aus dem erhaltenen Nukleosid. Der Zuckerteil dieser Nukleoside entspricht demjenigen der Antitumorantibiotika Daunorubicin und Doxorubicin, wobei letzteres ein vielversprechendes Heilmittel zur klinischen Behandlung von Krebsgeschwüren darstellt.



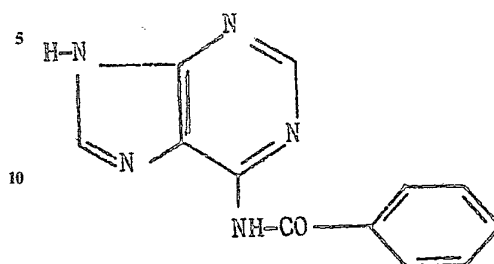
PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines neuen Daunosamin-nucleosides, dadurch gekennzeichnet, dass ein geschütztes Derivat von 3-Amino-2,3,6-trideoxy-L-lyxohexopyranose der Formel

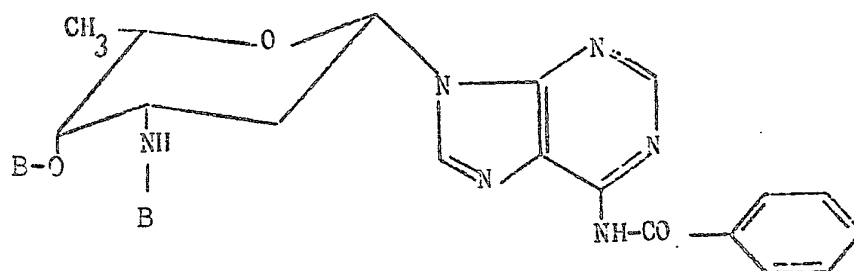


worin B eine Schutzgruppe ist, gelöst in trockenem Methy-

lendichlorid und in Anwesenheit von Dehydratisierungsmitteln, mit 6-Benzoyladenin der Formel

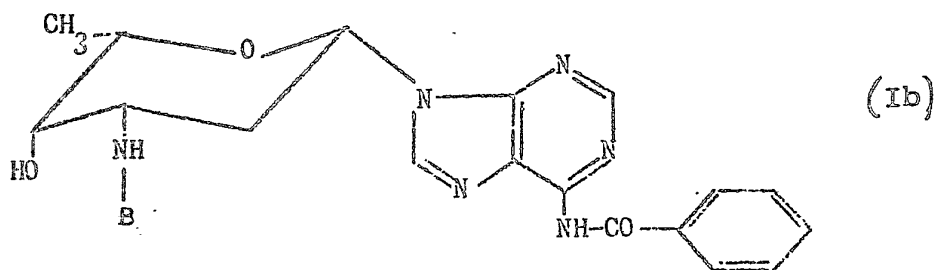


15 bei Raumtemperatur umgesetzt wird, wobei ein N,O-geschütztes Nucleosid der Formel



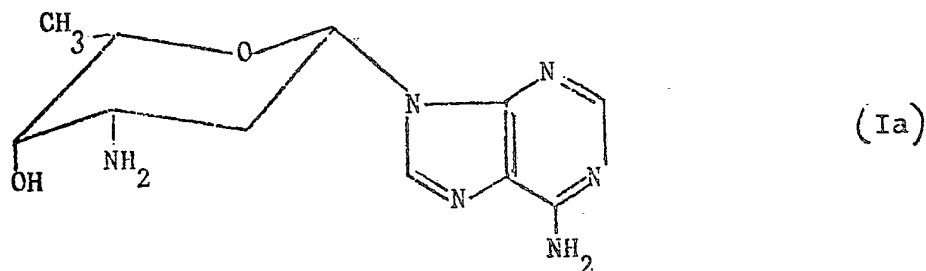
erhalten wird, die so erhaltene Verbindung mit siedendem Methanol behandelt, wobei die O-Schutzgruppe am Zucker-

teil abgespalten wird, das erhaltene N-geschützte Nucleosid der Formel



mit einer Base behandelt, wobei die N-Schutzgruppe am Zuckerteil und die Schutzgruppe am Adeninteil entfernt wird,

und so das freie und pharmakologisch β -anomere Daunosaminynucleosid der Formel



erhalten wird.

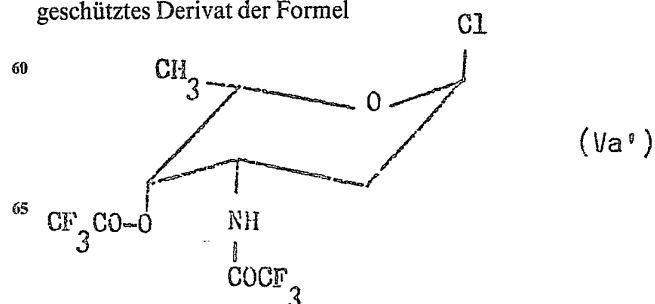
2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man vom 3,4-Ditrifluoroacetyl-daunosaminylchlorid der Formel Va ausgeht.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Dehydratisierungsmittel ein Molekularsieb verwendet.

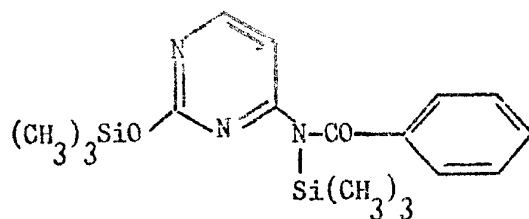
4. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Base methanolisches Ammoniak verwendet.

5. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das erhaltene N-geschützte Nucleosid der Formel Ib vor Behandlung mit einer Base isoliert.

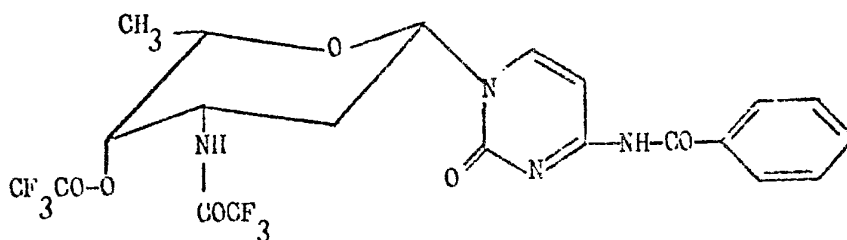
6. Verfahren zur Herstellung eines neuen Daunosamin-nucleosides, dadurch gekennzeichnet, dass man ein geschütztes Derivat der Formel



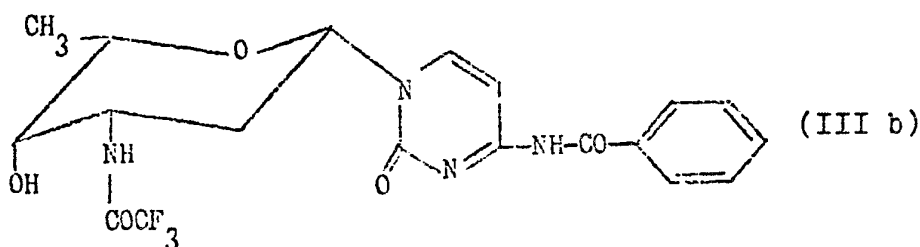
mit 4-Benzoyl-2,4-bis-trimethylsilylcytosin der Formel



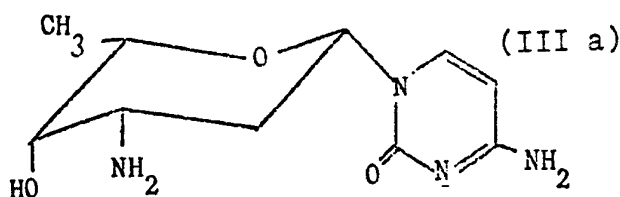
auf 150°C erhitzt, wobei ein N,O-geschütztes Nucleosid der Formel



erhalten wird, dieses mit siedendem Methanol behandelt zwecks Entfernung der O-Trifluoroacetylenschutzgruppe am Zuckerteil, das N-geschützte Nucleosid der Formel



mit einer Base behandelt, um die N-Trifluoroacetylenschutzgruppe am Zuckerteil und die Benzoylschutzgruppe am Cytosinteil zu entfernen, wobei man schliesslich das gewünschte freie und pharmakologisch β -anomere Daunosa-
minylnucleosid der Formel



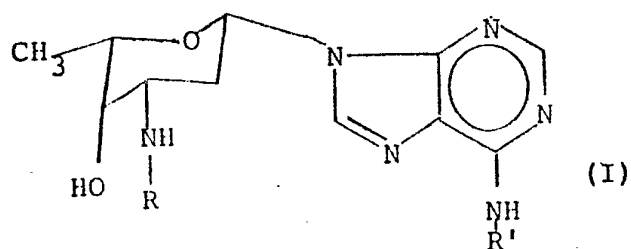
erhält.

7. Verfahren nach Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man das N-geschützte Nucleosid der Formel IIIb vor der Behandlung mit einer Base isoliert.

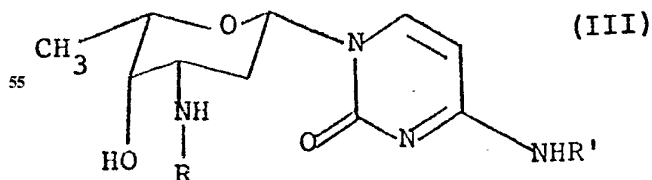
8. Verfahren nach Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Base zur Behandlung des N-geschützten Nucleosids methanolisches Ammoniak verwendet.

lichen Krebsgeschwüren darstellt.

Die vorliegende Erfindung schafft als neue Verbindungen



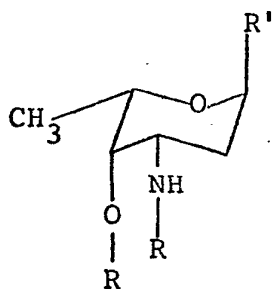
50 Ia: R=R'=H 9-(β -Daunosaminyl)-adenin



60 IIIa: R=R'=H 1-(β -Daunosaminyl)-cytosin

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Nucleosiden von Daunosamin (3-Amino-2,3,6-trideoxy-L-lyxo-hexopyranose), die den Zuckerteil der Antitumorantibiotika Daunorubicin und Doxorubicin darstellt, welches letzteres eines der vielversprechendsten Heilmittel zur klinischen Behandlung von mensch-

Verwendbare Ausgangsprodukte zur Synthese dieser neuen Verbindungen sind 3,4-Ditrifluoroacetyl- α -daunosaminylchlorid (Va'), hergestellt wie von Arcamone et al. in einer
65 in «Adriamycin, New Drug Symposium», San Francisco, 15.-16. Januar 1975, veröffentlichten Mitteilung, beschrieben.



Va: R = COCF₃ R' = Cl

Die erfindungsgemäss hergestellten neuen Nucleoside sowie die entsprechenden geschützten Zwischenprodukte zeigen hervorragende pharmakologische Eigenschaften. Es wurde gefunden, dass sie bei Tierversuchen mit der Antitumorwirksamkeit von Daunorubicin und Doxorubicin Synergismus zeigen. Demgemäss können sie zweckmässig bei der Behandlung von menschlichen Tumoren angewendet werden.

Die Herstellung dieser Nucleoside erfolgt erfindungsgemäss durch Kondensieren eines geschützten Derivats von 3-Amino-2,3,6-trideoxy-L-lyxohexopyranose, beispielsweise eines 3,4-Diacyldaunosaminylchlorids, in Anwesenheit eines Dehydratisierungsmittels mit einer geschützten heterocyclischen Base bei Raumtemperatur oder 150°C durch Schmelzen oder in Anwesenheit von trockenem Methylenchlorid. Die Kondensation kann in Anwesenheit eines Katalysators, beispielsweise eines anorganischen Salzes, wie Quecksilberchlorid, Quecksilberbromid, Silbercarbonat, oder einer organischen Säure, wie Chloressigsäure, Chlorpropionsäure oder p-Toluolsulfonsäure, erfolgen. Die so erhaltenen geschützten Nucleoside werden anschliessend mit siedendem Methanol behandelt um die O-Schutzgruppe abzuspalten und nachher mit einer Base, wie Natrium-, Kalium- oder Bariumhydroxyd oder Ammoniak umgesetzt, um die N-Schutzgruppen zu entfernen und das pharmakologisch aktive freie Nucleosid zu erhalten.

Durch das obige Verfahren werden stereospezifisch lediglich die β -Anomeren erhalten.

9-(β -Daunosaminyl)-adenin wurde hergestellt, indem eine Verbindung der Formel (Va), gelöst in trockenem Methylenchlorid, bei Raumtemperatur mit N-Benzoyladenin in Anwesenheit eines Molekularsiebes umgesetzt wurde. Das nach Entfernen der O-Schutzgruppe als Zwischenprodukt erhaltene geschützte Nucleosid der Formel (Ib) wurde mit methanolischem Ammoniak als Beispiel einer Base hydrolysiert, wobei das freie Nucleosid der Formel (Ia) erhalten wurde.

1-(β -Daunosaminyl)-cytosin der Formel IIIa wurde durch Schmelzen von 3,4-Ditrifluoracetyl-daunosaminylchlorid der Formel Va' im Vakuum mit bis-Trimethylsilyl-N-benzoylcytosin und darauffolgende Entfernung der N-Schutzgruppen des nach Entfernen der O-Schutzgruppe als Zwischenprodukt erhaltenen geschützten Nucleosids IIIb durch Hydrolyse mit methanolischem Ammoniak als Beispiel einer Base hergestellt.

Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1

9-(β -Daunosaminyl)-adenin (Ia)

Zu 1,22 g 3,4-Ditrifluoracetyl-daunosaminylchlorid, gelöst in 50 ml trockenem Methylenchlorid, wurden 1,33 g Benzoyladenin und 4,3 g Molekularsieb (4 Å) nacheinander zugegeben und die erhaltene Suspension 5 Tage lang bei Raum-

temperatur gerührt. Das nicht umgesetzte Benzoyladenin und das Molekularsieb wurden abfiltriert und das Methylenchlorid abgedampft, wobei ein heller Sirup verblieb. Dieser wurde 1 Stunde lang mit 50 ml Methanol am Rückfluss

(V) 5 erhitzt. Durch Abdampfen des Lösungsmittels wurde ein öliger Rückstand erhalten, der auf einer Silikagelsäule unter Verwendung einer Mischung aus Aceton und Benzol (5:1, bezogen auf das Volumen) als Eluierungsmittel gereinigt wurde. 0,49 g 9-[(3'-Trifluoracetyl)- β -daunosaminyl]-benzoyladenin (Ib) wurden erhalten, Fp. 143–145°C, Ausbeute 31%.

NMR (CDCl₃): 1,33 δ (d, J = 6,5 Hz, CH₃-C(5')), 5,94 δ (dd, J_{aa} = 10 Hz, J_{ae} = 4 Hz, C(1')H), 7,30–8,10 δ (m, C₆H₅), 8,30 und 8,76 δ (zwei s, C(2)H und C(8)H). Massenspektrum m/e 15 464 (M⁺).

0,38 g dieser Verbindung (Ib) wurden in 25 ml Methanol gelöst und die Lösung bei 0°C mit Ammoniak in einem Glas Kolben mit rundem Boden gesättigt, der verschlossen und 1 Woche lang bei Raumtemperatur gehalten wurde. Die 20 Lösung wurde im Vakuum eingengt, bis Kristallisation begann, und über Nacht in einem Kühlschrank gelagert. 0,2 g reines 9-(β -Daunosaminyl)-adenin wurden nach Kristallisation aus Isopropanol erhalten. Fp. 243–246°C, [α]_D = -8° (c = 1,24 in Methanol), Ausbeute 92,5%. NMR (DMSO-d₆): 25 1,10 δ (d, J = 6,5 Hz, CH₃-C(5')), 3,72 δ (dq, J = 6,5 Hz, J' ~ 1 Hz, C(5')H), 5,66 δ (dd, C(1')H, J_{aa} = 10,5 Hz, J_{ae} ~ 3 Hz), 8,15 und 8,28 δ (zwei s, C(2)H und C(8)H).

Analyse für C₁₁H₁₆N₆O₂:

Ber.: C 49,99; H 6,10%

Gef.: C 49,65; H 6,18%.

Beispiel 2

1-(β -Daunosaminyl)-cytosin (IIIa)

Eine Mischung von 0,5 g 3,4-Ditrifluoracetyl-daunosaminylchlorid und 0,75 g 4-Benzoyl-2,4-bis-trimethylsilylcytosin wurde 1 Stunde lang in einem Glaskolben mit rundem 40 Boden, der mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung stand, auf 150°C erhitzt. Die geschmolzene Mischung wurde abgekühlt, 30 ml 80%iges wässriges Methanol wurden zuge-
setzt und die erhaltene Suspension 30 Minuten lang am Rückfluss gehalten. Das nicht umgesetzte Benzoylcytosin 45 wurde abfiltriert und die methanolische Lösung im Vakuum eingedampft, wobei ein weisser Rückstand erhalten wurde, der aus Methanol kristallisiert wurde; dabei wurden 0,13 g 1-[(3'-Trifluoracetyl-daunosaminyl)]-4-benzoylcytosin (IIIb) erhalten, Ausbeute 21%, Fp. 259–261°C, [α]_D = -64° (c 50 = 1 in Methanol).

NMR (DMSO-d₆) bei 15°C: 1,22 δ (d, J = 6,5 Hz, CH₃-C(5')), 5,85 δ (dd, J_{aa} = 8,5 Hz, J_{ae} = 3,5 Hz, C(1')H), 7,3–7,7 δ und 7,9–8,3 δ (m, C(5)H, C(6)H und aromatische Protonen).

0,2 g dieses geschützten Nucleosids (IIIb) wurden in 60 ml 55 Methanol, das vorher mit Ammoniak bei 0°C gesättigt worden war, gelöst. Die Lösung wurde 1 Woche lang bei Raumtemperatur in einem Druckkolben gehalten. Dann wurde das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand 60 durch Chromatographie über einer Silikagelsäule unter Verwendung von 80%igem wässrigem Methanol als Eluierungsmittel gereinigt. Es wurden 0,105 g 1-(β -Daunosaminyl)-cytosin erhalten, das nach Kristallisation aus Isopropanol einen Fp. von 152 bis 155°C aufwies; Ausbeute 96%, [α]_D = 65 -88° (c = 1 in Methanol).

NMR (DMSO-d₆): 1,08 δ (d, J = 6,5 Hz, CH₃-C(5')), 1,3–1,8 δ (m, C(2')H), 5,56 δ (breites t, C(1')H), 5,72 und 7,60 δ (zwei d, J = 7,5 Hz, C(5)H und C(6)H).

Analyse für $C_{10}H_{16}N_4O_3$:

Ber.: C 49,99; H 6,71; N 23,2%

Gef.: C 49,79; H 6,78; N 23,1%.

Synergismus zwischen Adriamycin und 9-(β -Daunosaminyl)-adenin (IMI-21) und 9-(β -Daunosaminyl)-cytosin (IMI-24)

Es wurden Versuche mit weiblichen CD 1-Mäusen durchgeführt, welchen am Tag 0 5×10^6 Zellen/Maus Ascites-sarkom 180 i.p. injiziert wurde. Am Tag 1 wurden die Mäuse i.p. mit Adriamycin allein oder mit Adriamycin in Mischung mit den Verbindungen IMI-21 und IMI-24 behandelt. Alle

Verbindungen wurden unmittelbar vor der Verwendung in destilliertem Wasser gelöst. Die Dosen und Ergebnisse sind in Tabelle I angegeben.

Die Daten zeigen, dass die Verbindungen IMI-21 und IMI-24 eine Zunahme der Antitumorwirksamkeit von Adriamycin bewirkten. Insbesondere bewirkte die Mischung von Adriamycin (1 Teil) plus IMI-21 (9 Teile) bei einer Adriamycindosis von 8 mg/kg eine Zunahme der Lebensdauer von behandelten Mäusen, die höher war als jene, welche nach Behandlung mit der optimalen Dosis Adriamycin allein (4 mg/kg) festgestellt worden war. Ähnliche Daten wurden durch Behandlung mit 2 mg/kg einer Mischung von Adriamycin (1 Teil) plus IMI-24 (5,8 Teile) erhalten.

Tabelle I

Verbindung	Dosis ⁽⁵⁾ mg/kg	MST ⁽¹⁾ Tage	TC ⁽²⁾ %	LTS ⁽³⁾	Tod zufolge Toxizität/Gesamtzahl Mäuse ⁽⁴⁾
-		13		0/18	
Adriamycin	1	20	153	2/9	
	2	20	153	2/9	
	4	56	430	3/9	1/9
	8	49	377	3/9	1/9
Adriamycin (1 Teil)	1	22	169	1/9	
+ IMI-21 (9 Teile)	2	20	153	1/9	
	4	23	176	4/9	
	8	74	569	4/9	
Adriamycin (1 Teil)	1	18,5	142	1/10	
+ IMI-24 (5,8 Teile)	2	>70	>583	6/10	
	4	23	176	4/10	
	8	44	338	3/9	1/9

(1) mittlere Überlebenszeit

(2) mittlere Überlebenszeit behandelter Mäuse/mittlere Überlebenszeit Kontrollmäuse $\times 100$

(3) lange Zeit Überlebende (> 60)

(4) berechnet auf Basis von zooptischen Prüfungen, die an allen toten Mäusen durchgeführt wurden

(5) Adriamycindosis