

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147260 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **5489/82**

(51) Int.Cl.³: **C 07 D 309/14**

(22) Indleveringsdag: **10 dec 1982**

(24) Løbedag: **22 sep 1976**

(41) Alm. tilgængelig: **10 dec 1982**

(44) Fremlagt: **28 maj 1984**

(86) International ansøgning nr.: –

(62) Stamansøgning nr.: **4260/76**

(30) Prioritet: **26 sep 1975 GB 39471/75**

(71) Ansøger: ***FARMITALIA CARLO ERBA S.P.A.; Milano, IT.**

(72) Opfinder: **Sergio *Penco; IT, Federico *Arcamone; IT, Aurelio di *Marco; IT.**

(74) Fuldmægtig: **Nørrejysk Patentbureau ApS**

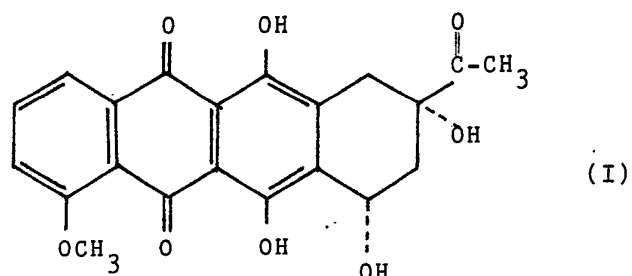
(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af
4'-deoxyadriamycin**

UK 147260 B

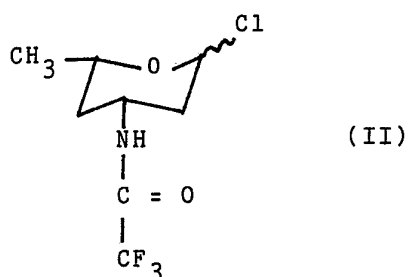
Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af 4'-deoxyadriamycin, der har den i kravets indledning angivne formel og er et hidtil ukendt antitumorglycosid af anthracyclinrækken.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte.

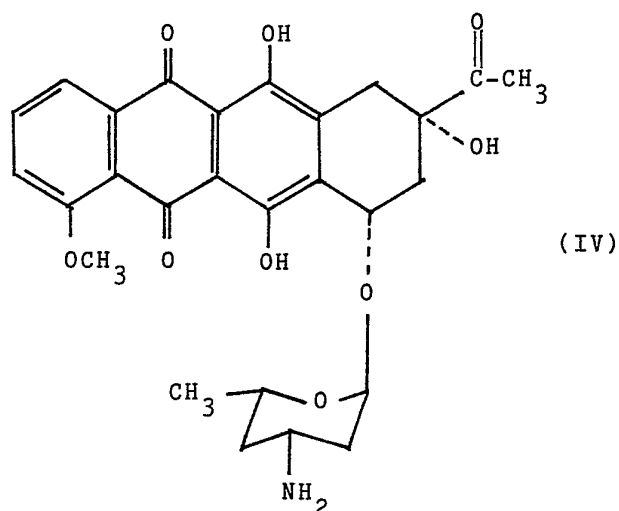
Ved kondensation af den tetracykliske aglycon daunomycinon med formelen:



medhalogensukkeret 2,3,4,6-tetradeoxy-3-trifluoracetamido-L-threo-hexopyranosylchlorid med formelen:

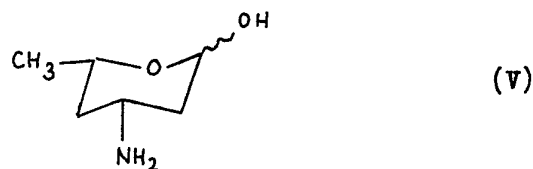


og efterfølgende fjernelse af beskyttelsesgruppen under alkaliske betingelser, opnås udgangsforbindelsen med formelen:

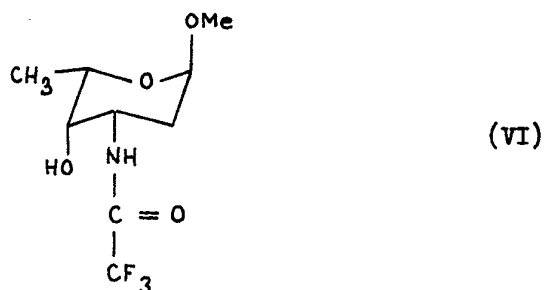


Kondensationen kan gennemføres i et organisk opløsningsmiddel såsom chloroform, methylendichlorid, diethylether, tetrahydrofuran, acetonitril eller dimethylformamid under tilstedeværelse af et opløseligt sølvsalt som katalysator. I reaktionsblandingen skal der fortrinsvis være et dehydratiseringsmiddel såsom en molekylsi til stede.

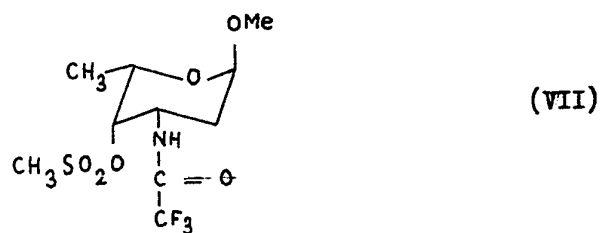
Den som udgangsmateriale for fremstilling af den anvendte halogensukker med formelen (II) kan være 3-amino-2,3,4,6-tetradecoxy-L-threo-hexose:



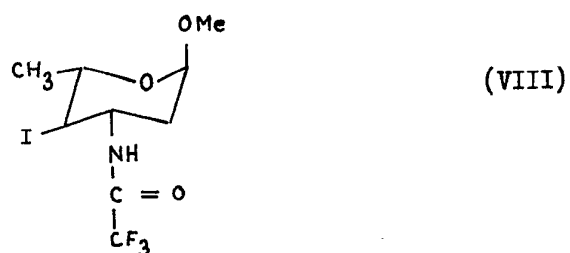
Denne aminosukker er hidtil ukendt og kan fås af methyl-N-trifluoracetyldaunosamid



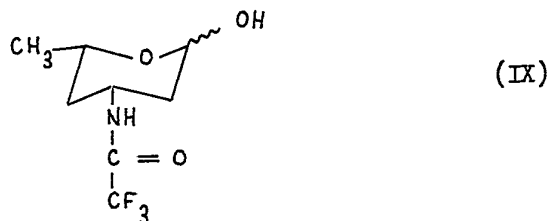
Denne forbindelse omsættes i tør pyridin med methansulfonylchlorid og overføres på denne måde i kvantitativt udbytte i 4-O-mesylderivatet:



Ved behandling med natriumjodid i methylethylketon fås 4-jodderivatet:



Ved katalytisk hydrogenering af denne forbindelse og syrehydrolyse af det dannede methylglycosid fås 2,3,4,6-tetra-deoxy-3-trifluoracetamido-L-threohexopyranose:



Ved behandling heraf med p-nitrobenzoylchlorid i tør pyridin fås det tilsvarende l-p-nitrobenzoat.

Dette kan behandles ved 0°C med tør hydrogenchlorid i vandfrit methylenchlorid, hvorved der opnås det ønskede 2,3,4,6-tetradeoxy-3-trifluoracetamido-L-threo-hexopyranosylchlorid (II).

Ved omsætning af (II) med daunomycinon (I) fås til slut 4'-deoxydaunomycin, der isoleres som hydrochlorid.

Den efterfølgende behandling efter fremgangsmåden ifølge opfindelsen, jvf. også GB-PS nr. 1 217 133, giver 4'-deoxyadriamycin, der isoleres som hydrochlorid.

Det omhandlede 4'-deoxyadriamycin udviser en gunstigere antimitotisk virkning end det nærbeslægtede adriamycin og er velegnet som terapeutisk middel til behandling af tumorsygdomme.

Fremstilling af mellemproduktet 2,3,4,6-tetradeoxy-3-trifluoracetamido-L-threo-hexopyranosylchlorid (II)

5,2 g Methyl-N-trifluoracetyl-daunosamid (VI), opløst i 40 ml vandfrit pyridin blev ved -5°C behandlet med 8 ml methansulfonylchlorid. Reaktionsblandingen blev natten over holdt ved 4°C og derefter indampet til tørhed i vacuum. Remanensen blev opløst i 300 ml chloroform og vasket med vand til neutralitet. Den organiske opløsning blev tørret over vandfrit natriumsulfat og indampet og gav 4,2 g kry-

stallinsk 4-0-mesylderivat (VII), smp. 169-170° C; $[\alpha]_D$
 = -160° (c = 0,1 i CHCl₃); m/e 304 (M-OCH₃); NMR
 (CDCl₃-DMSO-d₆ 4:1) : 1,26 δ (d, J = 6,5 Hz, CH₃-C-5),
 3,18 δ (s, CH₃OSO₂), 3,38 δ (s, CH₃O), 4,80 δ (bred s, W_H =
 5,5 Hz, C-1H).

8,7 g af den tørrede forbindelse VII blev opløst i
 150 ml methylethylketon, behandlet med 5 g natriumjodid
 og i 24 timer opvarmet til tilbagesvalingstemperatur.
 Reaktionsblandingen blev indampet til tørhed og remanen-
 sen suspenderet i 200 ml chloroform. Det uopløselige mate-
 riale blev filtreret fra og den organiske opløsning blev
 vasket med 3% vandig natriumthiosulfat og derefter med
 vand, og indampet i vacuum til tørhed. Råproduktet blev
 rensat ved kromatografi på en kiselsyresøjle under anven-
 delse af benzen/acetone (20:1) som elueringsmiddel. Derved
 fremkom 2,3 g af den krystallinske forbindelse (VIII), smp.
 194-195° C; $[\alpha]_D$ = -100° (c = 0,1 i CHCl₃); m/e 367 (M⁺);
 NMR (CDCl₃-DMSO-d₆ 2:1) : 1,46 δ (d, J = 6,0 Hz, CH₃-C-5),
 3,38 δ (s, CH₃O) og 4,83 δ (dd, J = 2,5 Hz, C-1H).

2,3 g af forbindelsen (VIII) blev opløst i 80 ml metha-
 nol og blev hydrogenet ved et tryk på 15 atm. ved stue-
 temperatur i 62 timer under tilstedeværelse af 4 g barium-
 carbonat og 4 g 10% palladium på aktivt kul. Katalysatoren
 blev filtreret fra og den organiske opløsning indampet til
 tørhed. Remanensen (1 g) blev suspenderet i 100 ml chloro-
 form, det uopløselige materiale filtreret fra og opløsningen
 indampet. Den fremkomne remanens blev opløst i 20 ml vand
 og der blev tilsat 5 ml iseddike. Opløsningen blev, for at
 afdampe opløsningsmidlet, opvarmet til 90° C i 3 timer, hvor-
 ved den krystallinske forbindelse (IX) fremkom i kvantitativt
 udbytte, smp. 159-160° C; i ligevægt $[\alpha]_D^{20}$ = -80° (c = 0,1 i
 CHCl₃); m/e 210 (M-OH); NMR (DMSO-d₆) : 1,03 δ (d, J = 6,0 Hz,
 CH₃-C-5 α-anomer), 1,09 δ (d, J = 6,0 Hz, CH₃-C-5 β-anomer),
 1,2-1,9 δ (m, C-2H₂ og C-4H₂), 4,60 δ (dd, J = 2,0 Hz, J' =
 9 Hz, C-1 Hax), 5,17 δ (bred s, W_H 6 Hz, C-1 Heq.).

Til en opløsning af 1 g af forbindelsen (IX) i 10 ml vandfrit pyridin blev der sat 2 g p-nitrobenzoylchlorid. Efter 12 timer ved stuetemperatur blev reaktionsblandingen hældt på is og bundfaldet vasket neutralt med vand. Det opnåede rå 1-p-nitrobenzoat (blanding af α - og β -anomer) blev tørret i flere timer i vacuum på phosphorpentoxid, derpå opløst i tørt methyldichlorid, og mættet med tørt hydrogenchlorid ved 0°C. Den udfældede p-nitro-benzoesyre blev filtreret fra under vandfri betingelser og 1-chlorderivatet (II) fremkom i kvantitativt udbytte ved afdampning af opløsningsmidlet; det kan uden yderligere rensning anvendes til kondensationen.

Fremstilling af 4'-deoxydaunomycin:

En opløsning af 1,5 g daunomycinon (I) i 150 ml vandfrit methyldichlorid, indeholdende 0,75 g 2,3,4,6-tetradecoxy-3-trifluoracetamido-L-threo-hexopyranosylchlorid (II), blev under tilstedeværelse af 10 g molekylsi (4 Å Merck) omrørt kraftigt med 0,77 g AgSO_3CF_3 i 20 ml vandfri diethylether. Efter 2 timer ved stuetemperatur blev reaktionsblandingen neutraliseret med en mættet vandig natriumhydrogencarbonat-opløsning og den fraskilte organiske fase inddampet i vacuum. Remanensen blev opløst i 50 ml 0,1 N vandig natriumhydroxid, og efter 30 minutter ved 0°C blev opløsningen indstillet til en pH-værdi på 3,5 og ekstraheret gentagne gange med chloroform for at fjerne aglyconen. Derefter blev opløsningen indstillet til en pH-værdi på 8,3 og ekstraheret med chloroform indtil ekstrakterne ikke mere var farvede. De samlede organiske ekstrakter blev tørret over vandfrit natriumsulfat, inddampet til et lille volumen, som blev gjort sur med 0,1 N hydrogenchlorid i methanol til en pH-værdi på 4,5. Tilsætningen af et overskud diethylether gav 4'-deoxydaunomycin, smp. 160-164°C (dekomponering); tyndtlagskromatografi på Merck silicagel F₂₅₄ -plade under anvendelse af chloroform-methanol-vand (150 : 42 : 6 v/v) som opløsningsmiddelsystem : R_f 0,47; $[\alpha]_D^{20} = +296^\circ$ (c = 0,05 i MeOH).

Det følgende eksempel skal belyse fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse nærmere.

Eksempel: 4'-deoxyadriamycin

0,35 g 4'-deoxydaunomycinhydrochlorid blev opløst i 20 ml af en blanding af vandfri methanol og dioxan (1:3 v/v) og 0,35 ml ethylorthoformiat. Til denne opløsning tilsattes 1,4 ml af en opløsning af 0,93 g brom i 10 ml chloroform. Efter 30 minutter ved stuetemperatur hældtes reaktionsblandingen i 100 ml blanding af ethylether-petroleum (2:1 v/v). Efter filtrering og vask med ethylether opløstes det resulterende røde præcipitat i en blanding af 6 ml acetone og 6 ml 0,25 N vandig hydrogenbromid.

Efter 12-15 timer ved stuetemperatur blev blandingen ospædet med vand og ekstraheret med chloroform.

Den vandige fase ekstraheres gentagne gange med n-butanol, og de samlede ekstrakter blev inddampet under vacuum til et lille volumen for at opnå 14-bromoglycosidderivatet, som derefter blev opløst i 6,7 ml af 0,25N vandig hydrogenbromid og behandlet med 0,5 g natriumformiat i 5 ml vand.

Reaktionsblandingen blev opbevaret ved stuetemperatur under omrøring i 90-110 timer og blev derefter inddampet til tørhed under vacuum.

Den resulterende remanens, opløst i en blanding af chloroform-methanol (2:1 v/v), blev vasket to gange med en 2,5% opløsning NaHCO_3 og dernæst gentagne gange ekstraheret med chloroform.

Det samlede chloroformekstrakt blev tørret med Na_2SO_4 og inddampet til et lille volumen under vacuum.

Den resulterende røde opløsning blev indstillet til 3,5pH med vandfri methanolisk hydrogenchlorid. Tilsætning af et overskud af ethylether gav 0,17g 4'-deoxyadriamycin som hydrochlorid, smp. 163°C (dekomponering) $[\alpha]_D^{20} = +320^\circ$ (C = 0,05MeOH); tyndtlagskromatografi på Merck kieselgel HF ved pH 7, med phosphat M/15, som puffer under anvendelse af methylenchlorid-methanol-vand (10:2:0,2 v/v) som opløsningssystem: $R_f = 0,13$. NMR (DMSO-d_6): 1,17 δ (d, $\text{CH}_3\text{-C-5'}$), 3,96 (s, CH_3O), 4,61 (s, C-14-H_2), 4,88 (bred s, C-7-H), 5,35 (bred s, W_H -8Hz, C-1'-H), 7,4-8,0 (m, aromatisk proton), 13,10 og 13,90 (2s, Phenolisk hydroxyl).

Biologisk virkning

Antitumorstyrkningen af den omhandlede ny antibiotiske forbindelse, 4'-deoxyadriamycin, blev fastslået på flere hos mus tranplanterede tumorer i sammenligning med et kendt antitumormiddel adriamycin.

Resultaterne er angivet i de følgende tabeller.

L₁₂₁₀-leukæmi

BDF₁-mus blev inokuleret intraperitonealt med 10^5 leukæmiceller/mus og derefter (intraperitonealt) 1 dag efter tumorindpodningen behandlet med varierende doser af forbindelserne, som skulle afprøves. Middeloverlevelsestiden i % og antallet af langtidsoverlevende er angivet i tabel I.

Tabel I

Forbindelse	Virkning på L ₁₂₁₀ -leukæmi			
	Dosis mg/kg	Middelover- levelsestid %	Langtidsover- levende (ef- ter 60 dage)	Toksis- ke døds- fald
Adriamycin	2,5	145	-	-
	5	155	2/20	-
	10	163	2/20	3/18
4'-deoxy- adriamycin	1	155	-	-
	2	162	-	-
	4	177	2/10	-
	5	133	1/10	6/10
	10	66	-	10/10

Transplanteret Gross-leukæmi

Hun-C₃-mus blev intravenøst inokuleret med en suspension af leukæmi-lymfonoder og miltceller (2×10^6 leukæmiceller/mus) og første-, anden- og tredjedagen efter inokuleringen behandlet intravenøst med forbindelserne, som skulle afprøves. Middeloverlevelsestiden i % er angivet i tabel II.

Tabel II

Forbindelse	Virkning på transplanteret Gross-leukæmi			
	Dosis mg/kg	Middelover- levelsestid %	Langtidsover- levende (ef- ter 45 dage)	Toksis- ke døds- fald
Adriamycin	3,5	183	-	-
	4,5	200	-	-
	5,5	216	3/10	-
4'-deoxy- adriamycin	1,75	200	-	-
	2,25	233	1/10	-
	2,75	233	-	1/9

Lymfocytisk Ascites P₃₈₈-leukæmi

Han-CDF₁-mus blev intraperitonealt inokuleret med 10⁶ leukæmiceller/mus og 1 dag efter inokuleringen behandlet med forskellige doser af forbindelsen, som skulle afprøves. Middeloverlevelsestiden i % er angivet i tabel III.

Tabel III

Forbindelse	Virkning på P ₃₈₈ -leukæmi	
	Dosis mg/kg	middeloverlevelsestid %
Adriamycin	2,5	218
	5	209
	10	264
4'-deoxy- adriamycin	2	204
	4	218
	6	236
	8	245

Fast sarkom 180

Swiss CD₁-mus blev subkutant implanteret med fragmenter af neoplastisk væv (fast sarkom 180), og dyrene blev på 1., 2., 3., 4. og 5. dagen derefter behandlet intravenøst med forskellige doser af forbindelsen som skulle afprøves. Væksten af tumorerne blev målt på 11. dagen efter tumorimplanteringen. Resultaterne er angivet i tabel IV.

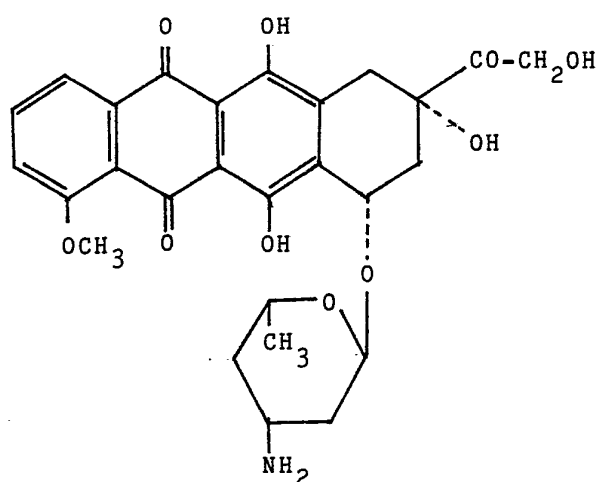
Tabel IV

Forbindelse	Virkning på fast sarkom 180		
	Dosis mg/kg	Tumurvægt g	T/C (x) %
Adriamycin	1,6	0,890	52
	2,0	0,875	51
4'-deoxy- adriamycin	0,8	0,810	47
	1,0	0,790	46

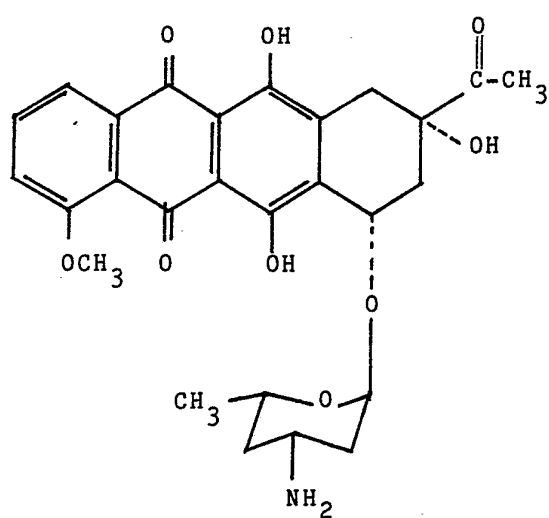
(x) $T/C = \text{middeltumurvægt hos de behandlede mus} / \text{middeltumurvægt hos kontrolmusene} \times 100.$

Patentkrav

Analogifremgangsmåde til fremstilling af 4'-deoxy-adriamycin med formlen:



kendetegnet ved, at man omsætter 4'-deoxy-daunomycin med formlen



med brom, hydrolyserer det således opnåede 14-bromderivat med en vandig natriumformiatopløsning i 100 timer ved stuetemperatur og til slut isolerer det ønskede produkt som hydrochlorid

Fremdragne publikationer:
