



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2179/83

(51) Int.Cl.5

C 07 C 279/04

(22) Indleveringsdag: 16 maj 1983

(41) Alm. tilgængelig: 18 nov 1983

(44) Fremlagt: 10 maj 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 17 mai 1982 JP 57/081398

(71) Ansøger: *MICROBIAL CHEMISTRY RESEARCH FOUNDATION; 14-24, Kamiosaki 3 Chome, Shinagawa-ku; Tokyo 141, JP

(72) Opfinder: Hamao *Umezawa; JP, Shin-ichi *Kondo; JP, Tomio *Takeuchi; JP

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Co. A/S**

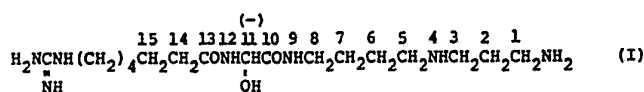
(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af (-)-15-deoxyspergualing og farmaceutisk acceptable syreadditionssalte heraf samt mellemprodukt

(56) Fremdragne publikationer

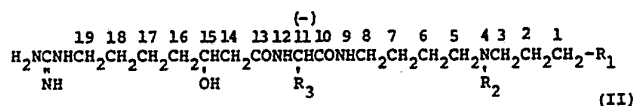
(57) Sammendrag:

2179-83

(-)-15-deoxysperqualin med den almene formel I



og salte deraf, der fremstilles ved, at hydroxylgruppen i 15-stilling i et derivat af (-)-spergualin med den almene formel II

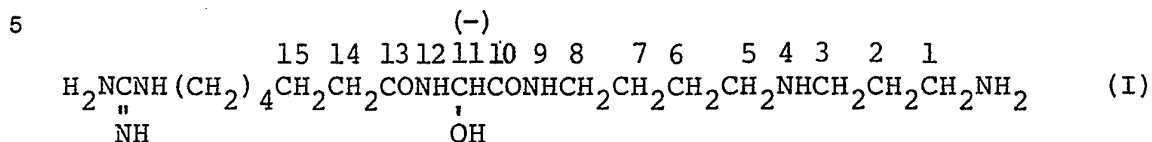


hvor R_1 betyder en maskeret aminogruppe, og R_2 og R_3 hver især betyder en maskeringsgruppe, deoxideres, hvorefter maskeringsgrupperne fjernes, og den fremstillede forbindelse eventuelt omdannes til et salt med en syre, er carcino-statisk virksomme og kan derfor anvendes som lægemidler.

0

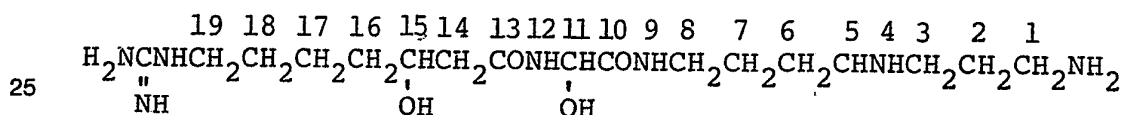
1

Opfindelsen angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af det hidtil ukendte (-)-15-deoxyspergualin med formlen I



10 og farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf og mel-
lemprodukter til fremstilling af disse forbindelser.

I forbindelse med histologiske undersøgelser af carcinostatisk midler blev det indtil da ukendte carcinostatisk antibiotikum BMG 162-aF2, som senere har fået navnet spergualin, opdaget i et kulturmedium af *Bacillus laterosporus* BMG-aF2 (deponeret under nr. 5230 hos Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry of Japan), som er en stamme tilhørende slægten *Bacillus* (*Journal of Antibiotics*, bind 34, 1619-1622, 1981). Den kemiske struktur af spergualin udtrykkes ved følgende formel



i hvilken konfigurationen ved 15-stillingen er venstre-, medens konfigurationen ved 11-stillingen ikke er fastslået (Journal of Antibiotics, bind 34, 1622, 1981). Forbindelsen med denne strukturformel kunne også syntetiseres ved kondensation af et syreamid og glyoxylylspermidin, og den fremkomne epimer blev opdelt i (-)-spergualin, der forekommer naturligt, og (+)-spergualin, der ikke gør det (Journal of Antibiotics, bind 34, 1625, 1981). Det har nu vist sig, at den optisk aktive forbindelse (-)-15-deoxyspergualin med den ovennævnte formel I, der fremstilles ved reduktion af (-)-spergualin, har en

0

tydeligt bedre carcinostatisk virkning end 15-deoxy-spergualin, der er en forbindelse, som er blevet syntetiseret tidligere ved kondensation af (S)-7-guanidino-3-hydroxyheptanamid og N-[4-(3-aminopropyl)-aminobutyl]-2,2-dihydroethanamid, jf. DK-patentansøgning nr. 4451/82.

5

Da det her omhandlede (-)-15-deoxyspergualin er ustabilt i form af en fri base, bør det fortrinsvis omdannes til et ugiftigt salt ved en additionsreaktion med en farmakologisk acceptabel syre ved en gængs metode.

10

Eksempler på syreadditionssalte omfatter salte med uorganiske syrer, såsom saltsyre, svovlsyre, phosphorsyre og borsyre, og salte med organiske syrer, såsom eddikesyre, citronsyre, vinsyre og glutarsyre.

De fysiske, kemiske og biologiske egenskaber af det her omhandlede (-)-15-deoxyspergualin med den almene formel I er anført i det følgende.

15

(1) Fysiske og kemiske egenskaber af (-)-15-deoxy-spergualin-trihydrochlorid-dihydrat:

Forbindelsen er farveløs og sirupsagtig, og dens smeltepunkt kan ikke bestemmes med sikkerhed. Den udviser en optisk drejning $[\alpha]_D^{25} = -7,3^\circ$ ($c = 1$, vand). Dens elementæranalyse er C: 38,45%, H: 8,08%, N: 18,61% og Cl: 20,26%, hvilket svarer til den beregnede sumformel $C_{17}H_{37}N_7O_3 \cdot 3HCl \cdot 2H_2O$ (C: 38,31%, H: 8,32%, N: 18,40% og Cl: 19,96%). Tyndtlagschromatografi på silicagel under anvendelse af en blanding af butanol, pyridin, eddikesyre og vand i volumenforholdet 6:4:2:4 som løbemiddel viser en enkelt plet (ninhydrin-farve-reaktion) ved en R_f -værdi på 0,17 (spergualin har en R_f -værdi på 0,13). Den antibakterielle aktivitet mod *Bacillus subtilis* PCI-219 er 134% af aktiviteten af (-)-spergualin ($3HCl \cdot 1/2H_2O$).

25

30

(2) Biologiske egenskaber af (-)-15-deoxyspergualin-trihydrochlorid-dihydrat.

10.5 Museleukæmi-L1210-celler indpodes intraperitonealt i grupper på 8 mus hver. Den undersøgte forbindelse opløst i fysiologisk saltopløsning indgives intraperitonealt én gang dagligt i 9 på hinanden følgende dage, idet der begyndes på

35

0

podningsdagen. Dyrene holdes og observeres i 60 dage til bestemmelse af overlevelsesraterne (%). Overlevelsesraterne beregnes ud fra udtrykket:

5

$$\frac{T}{C} \times 100$$

10

hvor T er den gennemsnitlige overlevelsesperiode i dage for den behandlede gruppe, og C er den gennemsnitlige overlevelsesperiode i dage for den ubehandlede gruppe.

Den gennemsnitlige overlevelsesperiode for kontrolgruppen (ubehandlet) er 7,6-8,9 dage.

Forsøgsresultaterne er vist i tabel 1 sammen med resultaterne for (-)-spergualin.

15

Tabel 1

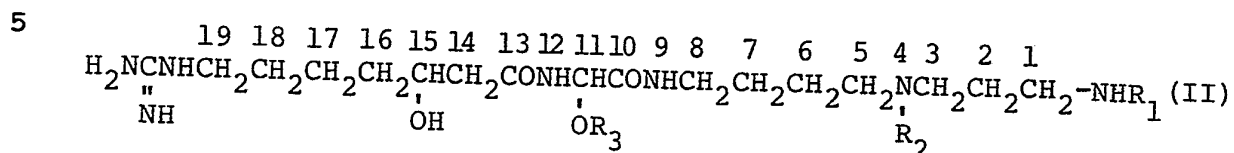
Effektivitet af (-)-15-deoxyspergualin ved behandling af museleukæmi L1210

20	Dosis (mg/kg/dag)	(-)-15-deoxyspergualin [*]		(-)-spergualin ^{**}	
		T/C (%)	Antal mus, som overlever 60 dage	T/C (%)	Antal mus, som overlever 60 dage
	50			295	0/8
	25			334	0/8
	12,5			>586	4/8
25	6,25	408	0/8	>732	8/8
	3,13	>526	2/8	>441	3/8
	1,56	>493	2/8	>301	1/8
	0,78	>789	8/8	107	0/8
	0,39	>629	6/8		
30	0,20	>664	6/8		
	0,10	138	0/8		
	0,05	129	0/8		

^{*}) Trihydrochlorid-dihydrat

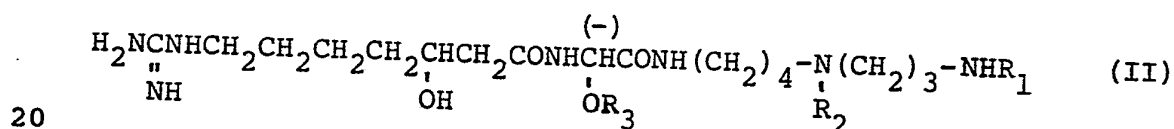
35 ^{**}) Trihydrochloridhemihydrat

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at hydroxylgruppen i 15-stilling i et derivat af (-)-spergualin med den almene formel II



10 hvori R_1 og R_2 betyder en aminobeskyttelsesgruppe, og R_3 betyder en hydroxybeskyttelsesgruppe, reduceres, hvorefter beskyttelsesgrupperne fjernes, og den vundne forbindelse I eventuelt omdannes til et farmaceutisk acceptabelt syre-additionssalt heraf.

Mellemproduktet ifølge opfindelsen er ejendommeligt
15 ved, at det er et (-)-15-deoxyspergualinderivat med den
almene formel II



hvor R_1 og R_2 betyder benzyloxycarbonyl eller p-methoxybenzyloxycarbonyl, og R_3 betyder tetrahydropyranyl, og salte deraf.

25 Beskyttelsesgrupperne for aminogruppen i 1-stilling og aminogruppen i 4-stilling i (-)-spergualinderivaterne med den almene formel II er udbredt anvendte ved syntese af peptider.

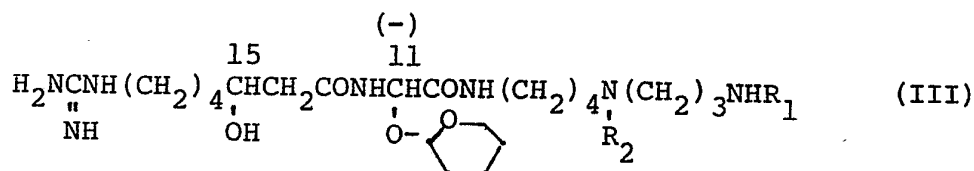
Da forbindelsen med formel I, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er meget ustabil over for baser og syrer, beskyttes aminogrupperne i 1- og 4-stilling fortrinsvis med aralkyloxycarbonylgrupper, såsom en benzyloxycarbonylgruppe og en p-methoxybenzyloxycarbonylgruppe, der let kan fjernes ved hydrogenolyse på gængs måde. Til indføring af disse aminobeskyttende grupper i (-)-spergualin er det fordelagtigt at anvende kendte metoder, som

0

5

aktiv-ester-metoden. Ved disse metoder reagerer disse amino-
 beskyttende grupper i almindelighed ikke med guanidingruppen
 i (-)-spergualin. Beskyttelsesgruppen for hydroxygruppen i
 11-stilling kan være enhver gruppe, der kan indføres uden
 5 isomerisering af forbindelsen, men den bør fortrinsvis være
 en tetrahydropyranylgruppe. Til selektiv binding af en tetra-
 hydropyranylgruppe til hydroxylgruppen i 11-stilling uden
 isomerisering af forbindelsen omsættes 1-3 ækvivalenter
 2,3-dihydro-4H-pyran med forbindelsen i et vandfrit organisk
 10 opløsningsmiddel, fortrinsvis vandfrit dimethylformamid, i
 2-10 timer ved stuetemperatur i nærværelse af 0,1-3 ækviva-
 lenter, fortrinsvis 0,2-1 ækvivalent, af en syrekatalysator,
 såsom p-toluensulfonsyre. Fortrinsvis gennemføres omsætningen
 med 2 ækvivalenter 2,3-dihydro-4H-pyran i 7 timer i nær-
 15 værelse af 0,5 ækvivalenter p-toluensulfonsyre, hvorved en
 tetrahydropyranylgruppe kan bindes selektivt til hydroxy-
 gruppen i 11-stilling uden isomerisering af forbindelsen.

Den fremkomne forbindelse kan gengives ved følgende
 20 almene formel III



25 hvori R_1 og R_2 har den ovenfor angivne betydning. Det er
 blevet bekræftet, at konfigurationen i 11-stillingen af det
 således fremstillede (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-11-O-
 -tetrahydropyranyl-spergualin ikke undergår nogen isomeri-
 30 sering, idet (-)-spergualin med høj optisk renhed genvindes
 ved fjernelse af de aminobeskyttende grupper ved hydrogenolyse
 og fjernelse af tetrahydropyranylgruppen ved hydrolyse med en
 svag syre som beskrevet senere i den foreliggende beskrivelse.
 Tetrahydropyranylgruppen er en blanding af α -formen og
 35 β -formen.

0

Reduktionen af hydroxylgruppen i 15-stilling i (-)-spergualinderivatet med den almene formel II kan gennemføres på gængs måde. For eksempel kan der anvendes en metode, som omfatter forestring af hydroxylgruppen i 15-stilling med sulfonsyre, iodering eller bromering af forbindelsen og dehalogenering af forbindelsen ved katalytisk reduktion. Nærmere bestemt omdannes hydroxylgruppen i 15-stilling til en sulfonsyreester ved behandling af (-)-spergualinderivatet med den almene formel II med en udbredt anvendt sulfonylforbindelse, f.eks. en alkylsulfonylforbindelse som methansulfonylchlorid, en arylsulfonylforbindelse som p-toluen-sulfonylchlorid eller en arylalkylsulfonylforbindelse som benzylsulfonylchlorid, i et opløsningsmiddel som vandfrit pyridin.

Derefter omsættes den fremkomne forbindelse med et halogeneringsmiddel, såsom et alkalimetalioidid eller alkalimetaltbromid (f.eks. natriumiodid eller natriumbromid), i et opløsningsmiddel, såsom vandfrit N,N-dimethylformamid, til fremstilling af derivatet deraf, der er ioderet eller bromeret i 15-stilling. Derpå reduceres derivatet katalytisk i et enkelt opløsningsmiddel, såsom methanol, dioxan eller vand, eller en blanding af disse opløsningsmidler ved en gængs metode under anvendelse af en katalysator, såsom palladium eller platin, for at bevirke dehalogenering, hvorved der opnås reduktion i 15-stillingen. Hvis de aminobeskyttende grupper i dette tilfælde er aralkyloxycarbonylgrupper, fjerner den katalytiske reduktion også disse grupper. 15-Deoxy-11-O-tetrahydropyranylgruppen fjernes let ved tilsætning af ca. 0,1 ækvivalent p-toluensulfonsyre til en vandig opløsning af 2 ækvivalenter af et syreadditionssalt af denne forbindelse og omrøring af blandingen under afkøling med is. En reaktionstid på 5-7 timer skulle være tilstrækkelig. Rensningen af det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede (-)-15-deoxyspergualin bør fortrinsvis gennemføres ved søjlechromatografi over en kationbytterharpiks med en carboxylgruppe som den aktive gruppe. Det anbefales f.eks.

0

7

at absorbere forbindelsen på en søjle pakket med "CM-Sephadex C-25" (Pharmacia, Sverige) ækvilibreret med 0,4 M natriumchlorid og underkaste absorbatet en gradienteluering med 0,4-1,0 M natriumchlorid. Eluatet koncentrerer og tørres og ekstraheres med vandfri methanol. Ekstrakten anbringes på en søjle med en molekylsigte, såsom "Sephadex LH-20" (Pharmacia, Sverige) og elueres derpå med vandig methanol til afsaltning. Eluatet koncentrerer og tørres, hvorved der fås det ønskede trihydrochlorid af (-)-15-deoxyspergualin. Der fås ethvert ønsket additionssalt afhængigt af den type salt, der anvendes ved gradientelueringen fra "CM-Sephadex"-søjlen.

Opfindelsen beskrives nærmere i det følgende eksempel.

15 Eksempel

Syntese af (-)-15-deoxyspergualin.

(a) (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-spergualin:

3,0 g (5,85 mmol) (-)-15-spergualin-trihydrochlorid opløses i 30 ml methanol, og 7,2 ml (17,6 mmol) triethylamin sættes til opløsningen. Til blandingen sættes en opløsning af 3,21 g (12,9 mmol) N-benzyloxycarbonyl-oxysuccinimid i 8 ml dioxan. Den fremkomne blanding omrøres i 3 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen koncentrerer og tørres, og det fremkomne koncentrat opløses i 50 ml 0,1 M natriumchlorid.

Opløsningen indstilles til en pH-værdi på 6,5 med 2 N saltsyre og anbringes på en søjle af "CM-Sephadex C-25" (200 ml) ækvilibreret med 0,1 M natriumchlorid. Derefter udføres der en gradienteluering med 0,1 M og 0,5 M natriumchlorid (1 liter af hver) og opsamles fraktioner på 20 ml. Fraktionerne 34-80 forenes, koncentrerer og tørres, og koncentratet ekstraheres 3 gange med 10 ml methanol. Ekstrakten anbringes på en søjle af "Sephadex LH-20" (200 ml) og elueres med 90% methanol til afsaltning, og der opsamles fraktioner på 2 ml. Fraktionerne 51-63 forenes, koncentrerer og tørres, hvorved der fås 3,8 g (-)-1-N,4-bis(benzyloxycarbonyl)-

0

spergualin-hydrochlorid som et farveløst sirupsagtigt materiale. Udbytte: 91%, $[\alpha]_D^{21} = -11^\circ$ ($c = 1$, vand).

Elementæranalyse for $C_{33}H_{49}N_7O_8 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$:

	C%	H%	N%	Cl%
5 beregnet:	55,26	7,17	13,67	4,94
fundet:	54,95	7,25	13,83	5,06

(b) (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-11-O-tetrahydropyranyl-spergualin:

10 3,45 g (4,81 mmol) af (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-spergualin-hydrochloridet fremstillet i trin (a) ovenfor opløses i 30 ml vandfrit N,N-dimethylformamid. Til opløsningen sættes 0,63 ml (9,75 mmol) 2,3-dihydro-4H-pyran og 464 mg (2,44 mmol) p-toluensulfonsyre (H_2O), og blandingen omrøres i 7 timer ved stuetemperatur. Efter omsætningen tilsættes 0,33 ml (2,44 mmol) triethylamin, og blandingen koncentrerer og tørres. Det fremkomne koncentrat renses ved søjlechromatografi på silicagel ("Wako Gel C-200", 300 g) under anvendelse af en blanding af chloroform, methanol, pyridin og 50%'s eddikesyre i forholdet 240:40:4:1 som elueringsmiddel. Der opsamles fraktioner på 20 ml.

Fraktionerne 66-78 forenes, koncentrerer og tørres, hvorved der fås 1,07 g (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-11-O-tetrahydropyranyl-spergualin-acetat som et farveløst sirupsagtigt materiale. Udbytte: 26%, $[\alpha]_D^{22} = -13^\circ$ ($c = 1$, methanol).

Elementæranalyse for $C_{38}H_{57}N_7O_9 \cdot CH_3COOH \cdot 3/2H_2O$:

	C%	H%	N%
30 beregnet:	56,99	7,65	11,63
fundet:	56,65	7,76	11,75

Endvidere forenes fraktionerne 85-92 og koncentrerer og tørres, hvorved (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-spergualin-acetat fås i en mængde på 362 mg (udbytte: 10%).

35

0

(c) (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-15-O-methansulfonyl-11-O-tetrahydropyranyl-spergualin:

950 mg (1,13 mmol) af (-)-1-N,4-bis-(benzyloxy-carbonyl)-11-O-tetrahydropyranyl-spergualin-acetatet frem-
5 stillet i trin (b) ovenfor opløses i 10 ml vandfrit pyridin. Der tilsættes 0,13 ml (1,75 mmol) methansulfonylchlorid under afkøling af opløsningen med is, og blandingen omrøres i 3 timer. Efter omsætningen tilsættes der 0,2 ml vand, og blandingen koncentrerer og tørres. Koncentratet renses
10 ved søjlechromatografi på silicagel ("Wako Gel C-200", 100 g) under anvendelse af en blanding af chloroform, methanol, pyridin og 50%'s eddikesyre i forholdet 320:40:4:1 som elueringsmiddel. Der opsamles freaktioner på 20 ml. Fraktionerne 16-25 forenes, koncentrerer og tørres, hvorved der fås 598 mg
15 af et acetat af den anførte forbindelse som et farveløst sirupsagtigt materiale. Udbyttet er 54%.

(d) (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-15-deoxy-15-iod-11-O-tetrahydropyranyl-spergualin:

591 mg (0,699 mmol) af (-)-1-N,4-bis-(benzyloxy-carbonyl)-15-O-methansulfonyl-11-O-tetrahydropyranyl-spergualinacetatet fremstillet i trin (c) opløses i 20 ml vandfrit N,N-dimethylformamid. 5,02 g (33,5 mmol) natriumiodid tilsæt-
20 tes, og derefter omrøres blandingen i 15 timer ved 90°C. Reaktionsblandingen koncentrerer og tørres, og koncentratet opløses i 30 ml ethylacetat. Opløsningen vaskes med 30 ml
25 af en 20%'s vandig opløsning af natriumthiosulfat og 30 ml af en mættet vandig opløsning af natriumchlorid. Ethylacetatlaget afvandes med vandfrit natriumsulfat og koncentrerer og tørres. Koncentratet renses ved søjlechromatografi
30 på silicagel ("Wako Gel C-200", 50 g) under anvendelse af en blanding af chloroform, methanol, pyridin og 50%'s eddikesyre i forholdet 320:40:4:1 som elueringsmiddel. Der opsamles fraktioner på 10 ml. Fraktionerne 7-28 forenes,
35 koncentrerer og tørres, hvorved der fås 204 mg af et acetat af den anførte forbindelse som et farveløst sirupsagtigt materiale. Udbyttet er 33%.

0

(e) (-)-15-deoxy-11-O-tetrahydropyranyl-spergualin:

198 mg (0,214 mmol) af (-)-1-N,4-bis-(benzyloxycarbonyl)-15-deoxy-15-iod-11-O-tetrahydropyranyl-spergualin-acetatet fremstillet i trin (d) opløses i 20 ml af en 80%'s vandig opløsning af methanol. 40 mg af en katalystor bestående af 5% palladium og bariumcarbonat tilsættes, og blandingen omrøres i en hydrogenstrøm i 10 timer ved stuetemperatur. Katalysatoren fjernes ved filtrering, og filtratet koncentrerer og tørres. Det fremkomne koncentrat opløses i 30 ml 0,1 M natriumchloridopløsning, og opløsningen indstilles til en pH-værdi på 6,5 med 1 N saltsyre. Derefter anbringes opløsningen på en søjle af "CM-Sephadex C-25" (Pharmacia, Sverige, 40 ml) ækvilibreret med 0,1 M natriumchlorid og underkastes gradienteluering med 0,1 M og 0,8 M natriumchlorid (200 ml af hver), og der opsamles fraktioner på 4 ml. Fraktionerne 67-77 forenes, koncentrerer og tørres og ekstraheres 3 gange med 5 ml methanol. Ekstrakten anbringes på en søjle af "Sephadex LH-20" (100 ml) og elueres med 90%'s methanol til afsaltning. Der opsamles fraktioner på 1 ml. Fraktionerne 36-47 forenes, koncentrerer og tørres, hvorved der fås 62,9 mg af et trihydrochlorid af den anførte forbindelse som et farveløst sirupsagtigt materiale. Udbyttet er 54%.

25

(f) (-)-15-deoxyspergualin:

61 mg (0,112 mmol) af 15-deoxy-11-O-tetrahydropyranyl-spergualin-trihydrochloridet fremstillet i trin (e) opløses i 3 ml vand. Under afkøling af opløsningen med is tilsættes der 2,1 mg (0,011 mmol) p-toluensulfonsyre (H_2O), og blandingen omrøres i 7 timer. Efter omsætningen indstilles blandingens pH-værdi til 6,5 med 1 M vandig ammoniakopløsning, og der tilsættes 10 ml 0,4 M natriumchlorid. Blanding anbringes på en søjle af "CM-Sephadex C-25" (20 ml) ækvilibreret med 0,4 M natriumchlorid og underkastes gradienteluering med 0,4 M og 1,0 M natriumchlorid (100 ml af hver). Der opsamles fraktioner på 2 ml. Fraktionerne 73-81 forenes, koncentrerer og tørres og ekstraheres 3 gange med 5 ml metha-

35

0

nol. Ekstrakten anbringes på en søjle af "Sephadex LH-20"
(100 ml) og elueres med 90%'s methanol til afsaltning.

5

Der opsamles fraktioner på 1 ml. Fraktionerne 38-48 forenes,
koncentreres og tørres, hvorved der fås 46,6 mg (-)-15-
-deoxyspergualin-trihydrochlorid-dihydrat som et farveløst
sirupsagtigt materiale. Udbyttet er 78%.

10

15

20

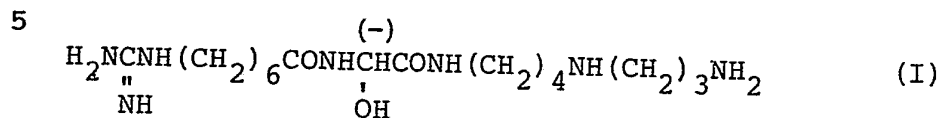
25

30

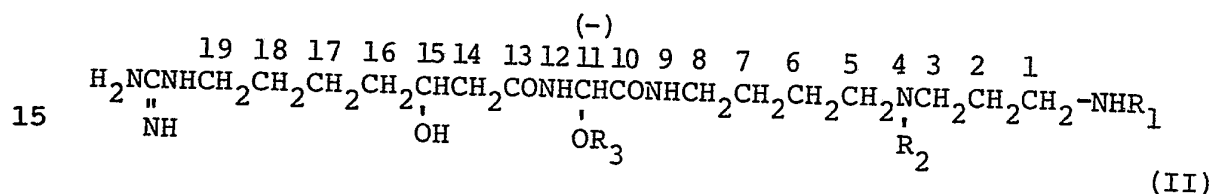
35

P A T E N T K R A V

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af (-)-15-deoxyspergualin med formlen I

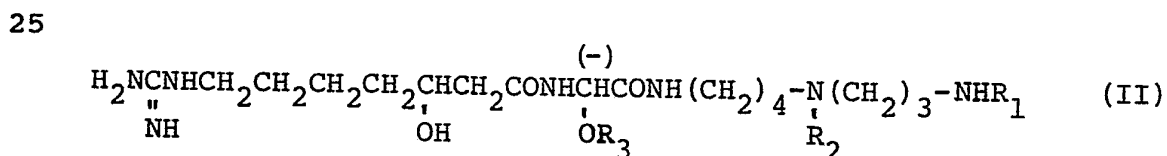


10 og farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf, kendet ved, at hydroxylgruppen i 15-stilling i et derivat af (-)-spergualin med den almene formel II



hvor R_1 og R_2 betyder en aminobeskyttelsesgruppe, og R_3 betyder en hydroxybeskyttelsesgruppe, reduceres, hvorefter beskyttelsesgrupperne fjernes, og den vundne forbindelse I eventuelt omdannes til et farmaceutisk acceptabelt syre-additionssalt heraf.

2. (-)-15-Deoxyspergualinderivat med den almene formel



30 hvori R₁ og R₂ betyder benzyloxycarbonyl eller p-methoxy-
benzyloxycarbonyl, og R₃ betyder tetrahydropyranyl, og salte
deraf.