(19) DANMARK

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **160614 B**

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: **2501/81**

(51) Int.Cl.[5] **C 07 D 519/04**

(22) Indleveringsdag: **09 jun 1981**

(41) Alm. tilgængelig: **11 dec 1981**

(44) Fremlagt: **02 apr 1991**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **10 jun 1980 LU 82514** **23 dec 1980 LU 83034**

(71) Ansøger: ***OMNICHEM S.A.; Avenue de Broqueville 12; 1150 Bruxelles, BE**

(72) Opfinder: **Andre Benoit Leon *Trouet; BE, Kandukuri Sivaprasada Bushana *Rao; BE, Jean Alfred Alphonse *Hannart; BE**

(74) Fuldmægtig: **Kontor for Industriel Eneret**

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af vinblastinderivater og farmaceutisk acceptable salte deraf

(56) Fremdragne publikationer

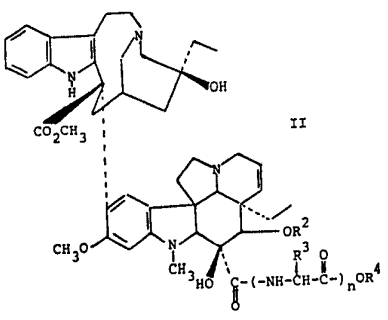
———

(57) Sammendrag:

2501-81

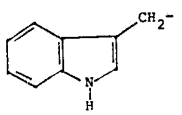
Fremgangsmåde til fremstilling af vinblastinderivater.

Fremstilling af vinblastinderivater med den almene formel

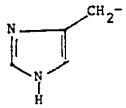


II

hvor R^2 er hydrogen eller C_{2-9}-acyl, R^3 hydrogen, C_{1-8}-alkyl, hydroxy-C_{1-8}-alkyl, aminohydroxy-C_{1-8}-alkyl, karboxy-C_{1-8}-alkyl, amido-C_{1-8}-alkyl, amino-C_{1-8}, guanidin-C_{1-8}-alkyl, tiol-C_{1-8}-alkyl, cysteinylmetyl, metyltioætyl, benzyl, hydroxybenzyl eller



eller



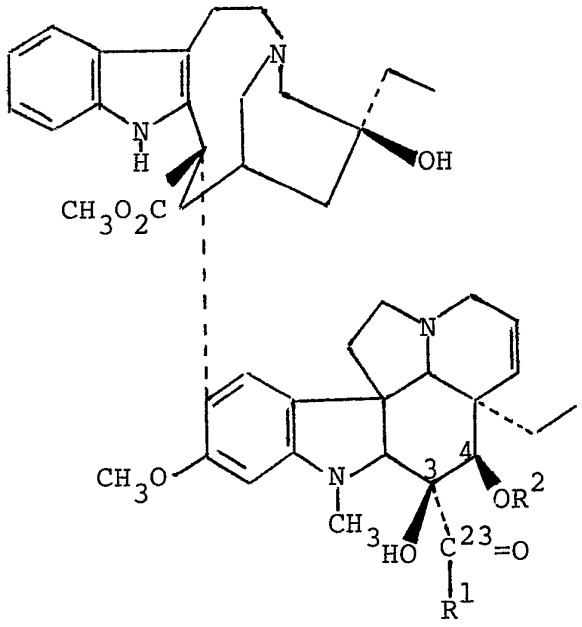
eller sammen med C-atomet og aminonitrogenet en azol- eller hydroxyazolring, n er tallet 1-6 og R^4 C_{1-8}-alkyl eller benzyl, eller syreadditionssalte deraf, ved omsætning af vinblastin med vandfrit hydrazin, omsætning af det dannede hydrazid med et nitroseringsmiddel i surt medium og omsætning af det således dannede acylazid med 1-5 ækvivalenter af ønsket aminosyreester eller peptid.

De dannede forbindelser har kraftige anti-cancervirkninger, navnlig mod leukæmi og visse faste tumorer, og mindre toxiske bivirkninger end beslægtede vinblastinderivater.

DK 160614 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte bisindolalkaloider samt farmaceutisk acceptable salte heraf, nærmere betegnet aminosyrederivater, herunder peptidderivater af vinblastin. De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser kan inkorporeres i farmaceutiske præparater og tjene som antitumormidler, navnlig til behandling af maligne tumorer hos mennesker.

Bisindolalkaloider af vinblastintypen er velkendte forbindelser med den almene formel



I

Eksempler på sådanne alkaloider er vincaleukoblastin (US patentskrift 3.097.137), leurocristin eller vincristin og leurosidin (US patentskrift 3.205.220), vinglycinat (BE patentskrift 659.112) og vindesin (BE patentskrift 813.168). Sidstnævnte forbindelse vindes ved kemisk modifikation af naturligt vinblastin (formel I, $R^1 = OCH_3$, $R^2 = COCH_3$), der kan vindes ved ekstraktion fra blade af Catharanthus roseus.

Vinblastin, vincristin og vindesin er tilgængelig i handelen til brug i humanterapien, navnlig til behandling af leukæmi og visse faste tumorer.

Disse lægemidler har imidlertid vist sig at have væsentlige ugunstige bivirkninger. Vincristin har neurotoxiske virkninger og vinblastin menes at have en kraftig skadelig virkning for knoglemarven, dvs. hæmatopoietisk toxicitet.

Virkningsmekanismen af disse lægemidler menes at minde om den mekanisme der er postuleret for den antimitotiske virkning af colchicin. I sådanne tilfælde ville disse stoffer virke ved inhibering af polymerisationen af tobulin til dannelse af mikrotubuler og påfølgende standsning af celledelingsforløbet i den mitotiske fase.

Udnyttelse af 1:1 complekser af tubulin med antitumorale bisindol-alkaloider er beskrevet i BE patentskrift 854.053. I nogle tilfælde er der angivet lavere toxicitet og mere effektiv kemoterapeutisk aktivitet end for de fire alkaloiders vedkommende.

Forskellige andre kemiske modifikationer af vinblastinmolekylet er blevet afprøvet. En af disse modifikationer, vinglycinat-sulfat (formel I,sulfat, $R^1 = OCH_3$, $R^2 = COCH_2N(CH_3)_2$; Cancer Research 1967, 27, 221-227) er også afprøvet klinisk, men har alment vist sig ikke at være overlegne over vinblastin eller vincristin.

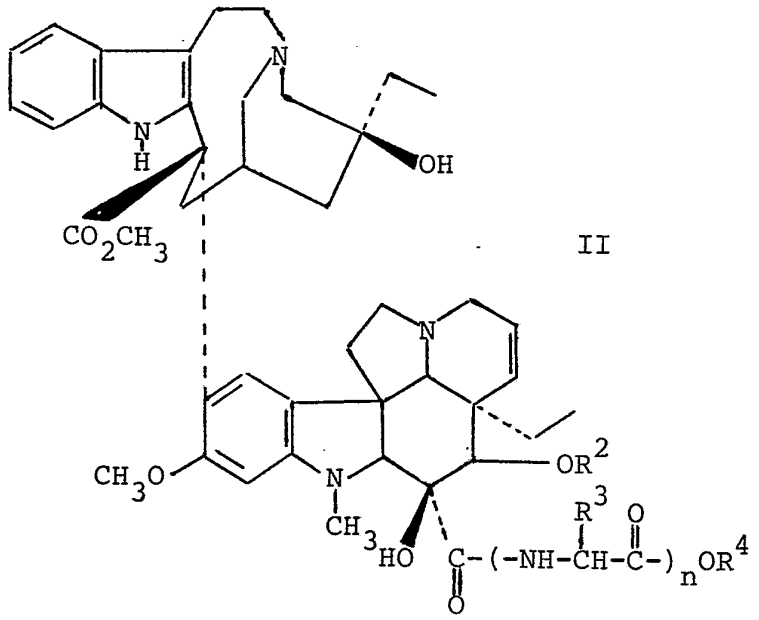
BE patentskrift 813.168 angiver vindesin- (formel I, $R^1 = NH_2$, $R^2 = H$) og vinblastin-karboxamidderivater. Senere raporter tyder på at disse forbindelser, trods den almene nytte af vindesin eller 3-karboxamid-4-O-desacetylvinblastin, ikke er effektive til behandling af mus induceret med murin 1210 leukæmi (C.J. Barnett et al., J. Med. Chem. 21, 88, 1978). Vindesin sælges for tiden på det europæiske marked (bl.a. i Frankrig og Tyskland) og er under anmeldelse til FDA-registrering i USA.

Aminosyrederivater af vinblastin og andre bisindolalkaloider er foreslået generelt i BE patentskrift 813.168. Der er imidlertid ikke angivet nogen specifikke aminosyrederivater og følgelig heller ikke nogen fysisk-kemiske beskrivelser, ingen specifikke fremstillingsmåder og ingen specifikke fysisk-kemiske egenskaber. Det må således antages at sådanne forbindelser faktisk ikke er blevet syntetiseret og/eller ik-

ke er blevet afprøvet for antimitotisk styrke, navnlig i betragtning af en angivelse i skriftet side 3, linje 10 ff., at "anti-neoplastisk aktivitet synes at være begrænset til meget specifikke strukturer, og chancerne for at vinde mere aktive stoffer ved modifikation af disse strukturer synes at være tilsvarende svage".

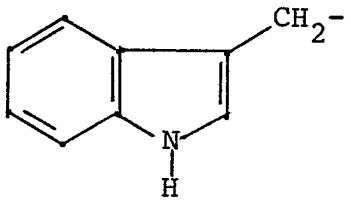
Det har nu vist sig at de ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse fremstillede forbindelser har evne til i væsentlig grad at forsinke døden af mus der er podet intravenøst med P 388 og L 1210 leukæmier, og de udviser væsentlige fordele i forhold til de tidligere beskrevne vinblastinanaloger. Da Vinca-alkaloider generelt ikke udviser nogen aktivitet mod L 1210 leukæmi, er de resultater der er opnået med de omhandlede nye forbindelser i høj grad uventede og overraskende aktiviteter. Virkninger på forsøgsfremkaldt P 388 tumorer har overraskende også vist sig i høj grad bedre end virkningerne af reference-Vinca-alkaloiderne. Der er iagttaget talrige totale afhjælpninger deraf. Forbindelserne udviser yderligere andre vigtige og uventede fordele i sammenligning med vinblastin og kendte analoger, navnlig vindesin. Især er den iagttagede toxicitet generelt lavere end den tilsvarende toxicitet af vindesin eller vincristin.

De ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse fremstillede forbindelser har den almene formel

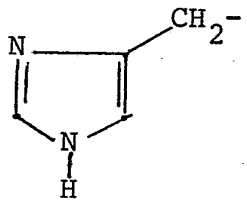


II

hvor R^2 er et hydrogenatom eller en C_{2-9} alkanoylgruppe, fortrinsvis en acetylgruppe, R^3 er et hydrogenatom, en lige eller grenet C_{1-8} alkylgruppe, hydroxy-C_{1-8}-alkylgruppe, aminohydroxy-C_{1-8}-alkylgruppe, karboxy-C_{1-8}-alkylgruppe, amido-C_{1-8}-alkylgruppe, amino-C_{1-8}-alkylgruppe, guanidin-C_{1-8}-alkylgruppe, tiol-C_{1-8}-alkylgruppe, cysteinyl-metylgruppe, metyltioætylgruppe, benzylgruppe, hydroxybenzylgruppe eller en gruppe



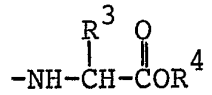
eller



eller hvor R^3 sammen med det tilknyttede kulstofatom og amidonitrogenatomet danner en azol- eller hydroxyazolring, n er et helt tal 1-6 og R^4 er en lige eller grenet C_{1-8} alkylgruppe eller en benzylgruppe, eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf med mineralske eller organiske syrer.

$-COOR^4$ er fortrinsvis en karboætoxy- eller karbometoxygruppe.

Ved en foretrukken udførelse fremstilles der forbindelser hvor struktursegmentet



i den almene formel II angiver en ester afledet af en hvilken som helst af de naturligt forekommende aminosyrer og deres optiske isomerer med D-konfiguration, nemlig glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, asparaginsyre, glutaminsyre, asparagin, glutamin, arginin, lysin, cystein, cystin, methionin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, prolin, histidin, hydroxylysin eller hydroxyprolin.

Forbindelserne kan betegnes som 3-dekarbometoxy-O-4-desacetyl-vinblastin-3-karboxamid. De vil imidlertid i nærværende beskrivelse fortrinsvis blive betegnet som N-(vinblastin-23oyl)-aminosyrederivater (således at man altså udelader prefixet "dekarbometoxy").

Særligt foretrukne aminosyreesterforbindelser med den almene formel II er sådanne hvor R^2 er et hydrogenatom og aminosyredelene er afledede grene til de følgende aminosyrer: L- eller D-tryptofan, leucin, isoleucin, valin, alanin og fenylalanin. L-tryptofan, L-isoleucin og L-alanin har særlig betydning.

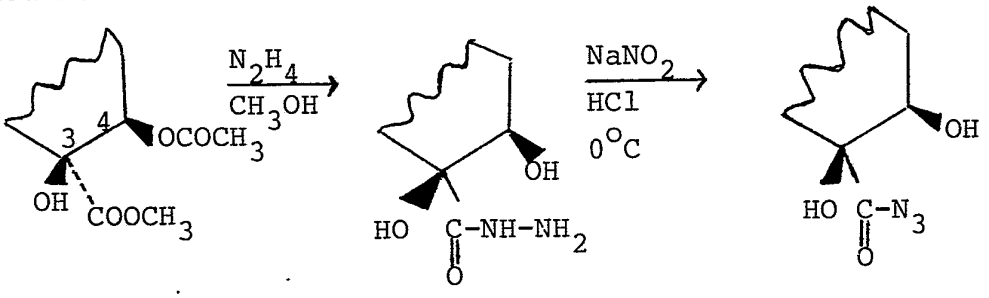
Særligt foretrukne peptidderivater er sådanne med den almene formel II, hvor n er tallet 2 og aminosyreresterne er afledet af de foretrukne naturlige aminosyrer som er angivet ovenfor, og i en hvilken som helst rækkefølge.

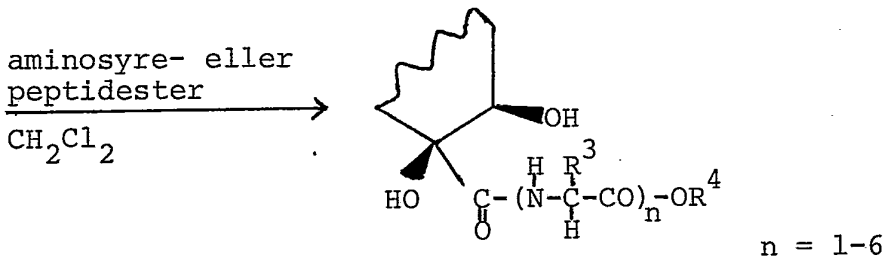
For så vidt angår forbindelsernes farmakologiske egenskaber må det ventes at små variationer i strukturen af peptidskelettet vil give forbindelser med sammenlignelig styrke. Særlig vil tilstedeværelse af ikke-naturlige α-aminosyrer (fx norleucin, N-monosubstituerede α-aminosyrer eller α,α-dialkyl-aminosyrer) give forbindelser med tilsvarende aktivitet mod forskellige tumorer, og fremstilling af sådanne forbindelser skal anses for at indgå i den foreliggende opfindelses rammer.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Når aminosyre- eller peptiddelen indeholder en funktionel sidekæde R^3 kan det være nødvendigt at beskytte de funktionelle grupper i henhold til velkendte metoder der bruges i peptidkemien. Dette er specielt tilfældet for lysin og cystein. Beskyttelsen kan alt efter arten af aminosyren opnås ved hjælp af en trifluoracetyl-, benzyl-, t-butyl-, benzyloxykarbonyl-, t-butoxykarbonyl- eller tritylgruppe kondenseret med den funktionelle gruppe. Andre velkendte beskyttende grupper der bruges almindeligt i peptidkemien kan også bruges med held.

De omhandlede forbindelser kan fremstilles ud fra vinblastin ved hydrazinolyse efterfulgt af nitrosering og omsætning med aminosyreesteren eller peptidet i overensstemmelse med nedenstående reaktionsskema:





Reaktionsfølgens første trin består fortrinsvis i at man sætter vandfrit hydrazin i overskud til en opløsning af vinblastinbase i vandfrit metanol. Opløsningen opvarmes under en inert atmosfære (N_2 eller Ar) i 12-30 timer ved en temperatur mellem ca. 30 og 70°C. Fortrinsvis holdes temperaturen på ca. 60°C, hvorved reaktionstiden vil være ca. 24 timer.

Det resulterende hydrazid af 4-O-desacetyl-vinblastin-23-oinsyre (formel I, R^1 = NH-NH_2, R^2 = H) isoleredes derefter ved tilsætning af vand, ekstraktion med et vandublandbart opløsningsmiddel såsom metylenklorid og koncentration under nedsat tryk. Forbindelsen kan renses yderligere ved søjlekromatografi, fortrinsvis på neutralt silika.

I næste trin omdannes hydrazidgruppen i det modificerede vinblastin til en acylazidgruppe. Denne omdannelse sker bedst ved at man sætter natriumnitrit til hydrazidet opløst i en vandig-sur metanolblanding. Syren i denne blanding kan fx være saltsyre. Reaktionstemperaturen holdes mellem ca. 0°C og 5°C.

Efter ekstraktion med et vandublandbart, aprotisk opløsningsmiddel, fortrinsvis kloroform eller metylenklorid, fraskilles den organiske fase og koncentreres partielt.

Acylazidet isoleres i almindelighed ikke men sættes direkte til den ønskede aminosyreester eller polypeptid, eller et beskyttet derivat deraf, opløst i et passende opløsningsmiddel såsom metylenklorid.

Den mængde aminosyre som skal bruges er omkring 1-5 ækvivalenter i forhold til vinblastinkarboxazidet.

Reaktionsblandingen holdes typisk mellem ca. -3°C og +10°C i 8-72 timer og hyppigst ca. 15 timer. Overvågning af reaktionen opnås bedst ved tyndlagskromatografi. Efter reaktionens fuldførelse kan opløsningsmidlet fjernes under nedsat tryk og det resulterende produkt omdannes til et sulfatsalt eller et andet passende salt afledet fra en mineralsk eller organisk syre, ved krystallisation fra en metanolisk opløsning af den tilsvarende syre. Den rene forbindelse kan isoleres og renses ved konventionel teknik såsom krystallisation eller kromatografi.

Eventuelt kan det resulterende 4-O-desacetyl-modificerede vinblastin genacyleres enten direkte til dannelse af

et vinblastinderivat II hvor R^2 betegner $COCH_3$ (J. Med.Chem. 22, 391, 1979) eller ved dannelse af 3,4-diacetoxyderivatet efterfulgt af selektiv hydrolyse af 3-acetoxygruppen i stilling 3. Hydroxygruppen i stilling 4 kan også forestres med andre aktiverede syrederivater indeholdende 1-9 kulstofatomer.

De ved fremgangsmåden fremstillede forbindelser kan indgå i farmaceutiske præparater, navnlig til brug ved behandling af cancer hos mennesker, idet sådanne præparater indeholder et eller flere af de omhandlede bisindolalkaloider, fortrinsvis sammen med en farmaceutisk bærer.

Forbindelserne udviser særlig bemærkelsesværdige antitumor-egenskaber, der med held kan udnyttes i behandlingen af kræft hos mennesker.

Forbindelser kan fx være nyttige når de bruges til behandling af L 1210, P 388, gliomer, lymfosarcomer og andre leukæmier eller maligne tumorer. I humanmedicinen kan de være nyttige til behandling af Hodgkins' syge og mod andre faste tumorer som er tilgængelige for behandling med vinblastin, vincristin eller vindesin. De omhandlede forbindelser er også nyttige i veterinærmedicinen til behandling af tumorer hos dyr.

Der kan også komme andre terapeutiske anvendelser i betragtning for de omhandlede hidtil ukendte forbindelser, idet disse ligesom vinblastin kan bruges til behandling af nogle former af arthritis (US patentskrift 4.208.411) eller som vincristin, der er påvist at være aktiv til behandling af psoriasis (US patentskrift 3.749.784).

Til behandling af eksperimentelt fremkaldte maligne tilstande hos dyr, er de kemoterapeutiske virkninger afprøvet ved hjælp af de tilsvarende sulfatsalte.

Ved disse forsøg blev DBA 2 hunmus (stammen Charles River France) podet intravenøst med 10^4 leukæmiceller vundet fra 7 dage gamle P 388 eller L 1210 leukæmi-ascites. Dag 0 er dagen for podning af tumorcellerne.

Den til afprøvning værende forbindelse (i sulfatform) injiceres derefter intravenøst som en opløsning i fysiologisk saltopløsning (NaCl 9 o/oo) enten ved hjælp af et skema med en enkelt injektion (dag 1) eller med tre injektioner (dag 1,

2 og 3). MST (middeloverlevelsestid), dvs. den dag hvor halvdelen af dyrene er døde, beregnes efter 30. dag.

Værdien ILS (Increased Life Span, dvs. øget livslængde) beregnes i overensstemmelse med følgende formel:

$$\% \text{ ILS} = \left(\frac{\text{MST produkt}}{\text{MST kontrol}} \times 100\right) - 100$$

Antallet af overlevende mus efter 30. og 60. dag angives også.

Når doserne er for toxiske, kan ILS-procenten blive negativ, dvs. således at ubehandlede mus overlever længere end de der er blevet injiceret med det antitumorale stof.

Under visse omstændigheder kan der iagttages nogen variabilitet af ILS-værdierne, i afhængighed med musenes oprindelse (DBA_2 Frankrig eller USA).

De fundne resultater sammenlignedes med dem der opnås med vinblastin (VLB) samt med vindesin (VDS) og vincristin (VCR) i tabel 1. Den farmakologiske overlegenhed af de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser fremgår også af tabellerne II-XII.

I tabel II gengives der resultater opnået med visse derivater af naturligt leucin.

Følgende forbindelser er afprøvet:
VLE = ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat
VLM = metyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat.

I tabel III er der angivet resultater opnået med D-leucinderivater, nemlig ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-D-leucinat (VDLE).

I tabel IV er der vist resultater opnået med L-tryptofanderivater, nemlig:
V-Trypt-E = ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanat, MST beregnet for 30 og 60 dage.
V-Trypt-M = methyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanat.

I tabel V er der vist aktiviteter opnået med et derivat af ætyltryptofanat med absolut D-konfiguration: ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-D-tryptofanat (VD-Trypt-E).

I tabellerne VI-XI er der angivet resultater opnået med følgende forbindelser:

VAE = ætyl-N-(O-4-deacetylvinblastin-23-oyl)-L-alaninat.
VPE = ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-fenylalaninat.
VILE = ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-isoleucinat.
VILM = metyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-isoleucinat.
VVE = ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-valinat.
V-Tyr-E = ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tyrosinat.
V-Val-Trypt-E = ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-valinyl-L-tryptofanat.

A. Vinblastin (VLB)

P 388:

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
4	1	10	14,6	36,4	0	0
6	1	10	15,6	45,8	0	0
8	1	9	18,5	72,9	0	0

B. Vindesin (VDS)

P 388:

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
2	1	10	13,6	27,1	0	0
3	1	10	14	30,8	0	0
4	1	10	14,8	38,3	0	0
5	1	10	13,8	30,2	0	0
6	1	10	14	32	0	0

L 1210

3	1	20	8,7	5	0	0

C. Vincristin (VCR)

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
0,5	1	10	11,56	4	0	0
1	1	19	12,32	15	0	0
1,5	1	20	12,78	19	0	0
2	1	10	6	-46	0	0

L 1210

0,5	1	10	7,56	1	0	0
1	1	20	7,91	5	0	0
1,5	1	20	8,38	12	0	0
2	1	10	8,67	16	0	0

Tabel II

Derivater af naturligt leucin

A. VLE

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
20	1	10	16	52,4	2	1
22	1	10	20	90,5	4	1
24	1	20	18	65	2	0
26	1	10	17,5	53,5	1	0
28	1	10	19,6	71,9	1	1
30	1	10	21	84,2	2	1
34	1	10	6	-48	2	1
36	1	10	5,4	-53	1	1
5	1,2,3	9	14,5	25	0	0
6	1,2,3	10	15	29,3	0	0
7	1,2,3	10	14,2	24,6	0	0
9	1,2,3	10	5	-56	1	1
12	1,2,3	9	4,8	-59	0	0

Tabel II (fortsat)

B. VLM

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
10	1	20	16,7	41	2	1
10,5	1	10	16,4	53,3	0	0
11	1	19	17,7	51	2	1
11,5	1	10	16,8	57	0	0
12	1	20	17,5	49	3	2
12,5	1	30	17,3	49	8	3
13	1	20	20,5	74	7	5
15	1	10	18	55,2	4	1

L 1210

10,5	1	10	10,6	24,7	0	0
11,5	1	10	10,8	27	0	0
12,5	1	10	10	17,6	0	0

Tabel III

A. VDLE

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
6	1	10	14,7	26,7	0	0
8	1	10	17	46,5	2	1
10	1	20	28,5	146	9	2
11	1	10	16	49,5	1	0
12,5	1	10	30	145,9	6	3

L 1210

9	1	10	10,8	27	0	0
10	1	10	11	29,4	0	0

Tabel IV

A. V-Trypt-E

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
20	1	10	11,4	43,9	0	0
40	1	10	17	58,8	5	4
50	1	20	24,5	117	9	5
55	1	60	41	279	39	25
60	1	100	33	202	57	36
65	1	29	22,75	114	13	9
70	1	20	6,5	-39	8	5

L 1210

55	1	30	11,8	56	0	0
60	1	30	12,5	65	2	2
65	1	30	12	62	0	0
70	1	10	12,3	61,8	1	1

P 388 - (ILS for 60. dag)

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 60 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
55	1	30	60	457	28	16
60	1	60	36	224	52	24

B. V-Trypt-M

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
30	1	10	15	33,9	0	0
40	1	10	16	42,8	0	0
50	1	10	23,5	199,8	1	0
60	1	20	26	140	7	2
70	1	10	26	145,3	5	

L 1210

50	1	10	11,5	47,4	0	0
55	1	10	12,5	60,2	0	0

Tabel V

VD-Trypt-E

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
20	1	10	13,3	18,7	0	0
30	1	10	15,8	41,4	1	0
40	1	20	16,5	52	1	0
50	1	10	22	107,5	1	0
60	1	10	4,4	-60,7	1	0

L 1210

40	1	10	9,5	21,8	0	0
45	1	10	10,5	34,6	0	0

Tabel VI

VAE

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
5	1	10	14,8	27,6	0	0
10	1	10	16,3	40,5	0	0
12,5	1	19	16,2	44	1	1
15	1	20	17	46	5	4
25	1	10	19	63,8	2	1

L 1210

12,5	1	20	10,4	48	0	0

Tabel VII

VPE

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
10	1	10	13	12,1	0	0
20	1	10	14,4	24,1	0	0
40	1	10	30	158,6	7	7
50	1	30	13,6	26	10	7
55	1	10	14,6	36,4	1	0

L 1210

55	1	10	8,5	0	0	0
60	1	10	9	13,9	0	0
65	1	10	8,8	3,5	0	0
70	1	20	8,7	13	0	0
75	1	10	9,5	25	0	0

Tabel VIII

VILE

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
8	1	30	30	172	20	2
9	1	20	30	179	12	

L 1210

8	1	20	11,57	58	0	0
9	1	10	12,8	68,4	0	0

Tabel VIII (fortsat)

VILM

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
3	1	10	16,4	41,3	0	0
5	1	29	18,2	68	8	3
6	1	69	23,4	115	25	6
7	1	30	30	177	16	5
9	1	10	6	-48,3	4	4

L 1210

6	1	29	11,2	60	0	0

Tabel IX

VVE

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
5	1	10	13,6	17,2	0	0
10	1	10	17,8	53,4	0	0
12,5	1	10	21	82,6	2	0
14	1	20	21	98	3	
15	1	39	23,5	107	14	4
17,5	1	9	8,4	-22,2	0	0
25	1	10	6,5	-44	0	0

L 1210

15	1	19	11,4	61,9	0	0

Tabel X

V-Tyr-E

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
20	1	10	13,9	29,9	0	0
40	1	10	16,4	53,3	1	1
50	1	10	16	49,5	1	1
60	1	10	16	49,5	3	2
70	1	10	5,4	-49,5	0	0

Tabel XI

V-Val-Trypt-E

P 388

Dosis mg/kg/dag	På dag	Antal dyr	MST max 30 dage	ILS %	>30 dage	>60 dage
15	1	10	26	132,1	3	
25	1	10	27,5	145,5	3	
35	1	19	27,5	154	8	
45	1	10	30	183	8	
50	1	9	27,5	145,5	4	

Tabel XII

Intraperitonealt injiceret P 388

BDF_1 Charles River France hun

Produkt	Dosis	På dag	Antal dyr	MST	ILS %	30 dage
VCR	2,7	1	11	15,6	64,2	0
V-Trp-E	50	1	10	22	131,6	1
V-Trp-E	60	1	10	31	226	6
V-Trp-E	80	1	10	21,5	126,3	0

Aktivitet af V-Trp-E og VCR på P 388 leukæmi podet intraperitonealt i BDF_1 hunmus der har modtaget 10^6 leukæmiceller på dag 0. På dag 1 indgives de virksomme produkter intraperitonealt i de angivne doser.

Lewis lungecarcinom (3LL)

$1,1 \times 10^6$ tumorceller podes intramuskulært i højre bagben hos hunmus af stammen C57Bl.

Stofferne indgives intravenøst i løbet af 3 injektioner.

Dyrene aflives på 23. dag efter podningen. Vægten af den primære tumor måles og udtrykkes i g; de pulmonære metastaser beregnes og deres diameter er målt. Metastaternes vægt er bedømt ud fra den antagelse at de er kugler med en tæthed på 1; antallet af mus uden metastaser er også angivet.

Resultaterne fremgår af tabel XIII. De tre produkter udviser aktivitet på den primære tumor.

Middelvægten af metastaserne, deres gennemsnitlige antal og antallet af mus uden metastaser er vist og tillader en bedømmelse af den anti-metastatiske aktivitet af de indgivne antitumorale forbindelser.

Tabel XIII

Produkt	Dosis kg/kg/dag	Antal dissekerede mus	Vægt af tumoren (mg) $\bar{X}$	σ	Vægt af metastaser (mg) $\bar{X}$	σ	Gennemsnitligt antal metastaser $\bar{X}$	σ	Antal mus uden metastaser
-	-	20	9,64	0,916	27,61	54,53	28,4	15,22	0
VDS	2,5	22	5,72	0,698	0,40	0,91	13,68	7,49	0
VtrypE	50	21	4,83	0,868	0,047	0,038	4,58	2,83	2

C57Bl hunmus podes intramuskulært på dag 0 med 1,1 x 10^6 tumorceller. På dagene 1, 8 og 15 indgives stofferne i de angivne doser. På 23. dag aflives musene; den primære tumor vejes, de pulmonære metastaser beregnes og deres diameter måles.

Den antitumorale virkning vist i tabellerne I-XII bekræfter den uventede effektivitet af de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede aminosyrederivater. De fleste af forbindelserne synes at være bedre end vindesin mod intraperitonealt og intravenøst podede tumorer. Den exceptionelle aktivitet af disse forbindelser på L 1210 tumorer er påvist.

Det er værd at nævne at blandt de eksperimentelt fremkaldte tumorer der for tiden står til rådighed anses L 1210 leukæmi at være den eksperimentelle tumor, som er den mest signifikante med hensyn til valg af antitumor-lægemidler for mennesker.

I tabel XIII viser de antimetastatiske forsøg at VLB-Trypt-E-derivatet er langt bedre end vindesin. Effektiviteten på en primær tumor er desuden sammenlignelig med effektiviteten af vinblastin eller vindesin.

Her bør særlig nævnes en fremragende virkning af ætyl-N-(desacetyl-O-4-vinblastin-23-oyl)-tryptofanat-sulfat, der giver en ILS efter 60 dage (P 388) på 457% med halvdelen af musene overlevende yderligere. Den optimale dosis er ca. 60 mg. De aminosyrederivater som er afprøvet i amid- eller syreform udviser imidlertid kun svag eller ikke-signifikant aktivitet. Disse forbindelser er imidlertid nyttige som mellemprodukter til fremstilling af andre, meget aktive bisindolalkaloider.

Generelt viser de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser sig væsentligt mindre giftige end de vinca-alkaloider der for tiden bruges i anti-cancerterapien. Letaldosis udtrykt som LD_{50} for VLE er bestemt på CD_1 hunmus af stammen Charles River med en vægt på under 24 g. Litchfield og Wilcoxon's bedømmelsesmetode giver en LD_{50} på 32 mg/kg.

Tilsvarende doser for vinblastin og vindesin er henholdsvis 24 mg/kg og ca. 11 mg/kg. I modsætning til vinblastin og desacetylvinblastin er der konstateret fravær af hepatisk toxicitet ved doser på 20-40 mg/kg.

Den akutte toxicitet af V-Trp-E og VILE er også blevet bestemt på NMRI hunmus. De værdier som er opnået med 100,8

mg/kg og 17,7 mg/kg for henholdsvis V-Trp-E og VILE skal sammenlignes med de tilsvarende værdier på 27,4 og 13,8 mg/kg for henholdsvis vinblastin og vindesin. V-Trp-E er således tydeligt mindre giftig end VLB eller VDS.

Med henblik på terapeutisk anvendelse indgives de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser, eventuelt i lyofiliseret tilstand, fortrinsvis ad parenteral vej, opløst i et farmaceutisk acceptabelt bærestof enten i form af base eller i form af et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt. Blandt syreadditionssaltene foretrækkes de ugiftige, farmaceutisk acceptable salte såsom salte med uorganiske syrer som hydrokloridet, fosfor- og svovlsyresalte, eller med organiske syrer såsom eddikesyre, propionsyre, ravsyre, vinsyre, oxalsyre, metansulfonsyre eller benzensulfonsyre. Fysiologisk saltopløsning eller andre saltopløsninger, fx pufret med et fosfat, er hensigtsmæssige opløsningsmidler. I almindelighed kan forbindelserne bruges i humanterapien på analog måde med den teknik og under de begrænsninger som gælder for andre vinca-alkaloider. Foruden ad den ovennævnte parenterale vej kan forbindelserne også indgives oralt. Den virksomme forbindelse (base eller syreadditionssalt), eventuelt mono- eller polyhydratiseret, fortyndes i et eller flere bærestoffer og inkorporeres som en enhedsdosis, der kan være en gelatinekapsel eller en tablet.

Det virksomme stof er i almindelighed i form af en enhedsdosis på omkring 2 mg til 900 mg i afhængighed af derivatet og det tilsigtede anvendelsesmønster. Totale doser pr. uge vil i almindelighed variere mellem ca. 0,1 og ca. 35 mg/kg.

De omhandlede hidtil ukendte forbindelser kan bruges alene eller i kombination med andre carcinostatiske stoffer, fx forskellige alkyleringsmidler, anti-metaboliter såsom metotrexat, 5-fluoruracil, 6-merkaptopurin, 6-tioguanin, arabinosidet af cytosin, ellipticin og visse antibiotika såsom actinomycin D, daunorubicin, adriamycin og cis-diaminodiklorplatin.

Specielt kan flere af de omhandlede vinblastinderivater bruges i kombination.

Nogle eksempler tjener til nærmere belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Almen metode til fremstilling af N-(desacetyl-O-4-vinblastin-23-oyl)-aminosyrederivater

1 g ($1,3 \times 10^{-3}$M) 3-dekarbometoxy-O-4-desacetylvinblastin-3-karboxhydrazid opløses i 23 ml vandfri metanol og 74 ml 1N HCl. Opløsningen afkøles derefter til -10°C og der tilsættes 207 g natriumnitrit i en portion.

Blandingen holdes i 10-30 minutter på 0°C. Efter overvågning ved tyndlagskromatografi (t.l.c.) reguleres blandingens pH-værdi til 8,5 ved -10°C ved tilsætning af en mættet opløsning af natriumbikarbonat.

Den alkaliske opløsning ekstraheres ved 0°C med et rumfang metylenklorid der er det samme som opløsningens eget rumfang, det sker ved 0°C og indtil der er konstateret negativ Meyer-reaktion på den vandige fase. De organiske faser forenes, tørres over Na_2SO_4 og filtreres ved 0°C.

$1,43 \times 10^{-3}$M (1,1 ækvivalent) af den ønskede aminosyreester tilsættes og opløsningen koncentreres under nedsat tryk indtil der er vundet et rumfang på ca. 4 ml. Denne opløsning holdes på 4°C i 24-48 timer. Reaktionens fremadskriden overvåges ved tyndlagskromatografi. Opløsningsmidlet fjernes fuldstændigt og der vindes 1,05 g tør forbindelse der viser sig som en enkelt plet ved t.l.c.

Rensning

Det ovennævnte tørrede produkt renses i en silikagelkolonne idet elueringsmidlet er en blanding af æter og ammoniakmættet metanol, 96% + 4%.

Der opsamles fraktioner på 10 ml og de afprøves ved t.l.c. Som fremkaldelsesmiddel anvendtes ninhydrin (aminosyrer) eller cerisalt (alkaloider).

Når alle aminosyrerne har undergået eluering (ninhydrin-) bruges der yderligere 100 ml af elueringsmidlet før der ændres til en blanding af 92% og 8% af opløsningsmidlerne.

Aminosyrederivatet af alkaloiderne vil derefter undergå eluering (cerisalt +).

Identiske fraktioner forenes, inddampes til tørhed (rotavapor), opløses i metylenklorid, tørres over Na_2SO_4, filtreres og inddampes til tørhed. Det dannede skum er aminosyrederivatet af det dimere alkaloid, hvis fysisk-kemiske egenskaber vil blive bestemt på portioner deraf. Det tilbageværende stof omdannes direkte til sulfat. Udbytter af basen af de forskellige forbindelser er kun retningsgivende og kan forbedres.

Fremstilling af sulfatet

Den amorfe fase (skum) opløses i den 20-dobbelte vægtmængde ætanol.

Til denne opløsning sættes der meget langsomt og under hurtig omrøring 2 ækvivalenter svovlsyre som en opløsning bestående af 2% svovlsyre og 98% vandig ætanol (0,484 ækvivalenter/liter). Efter at der er tilsat 2 ækvivalenter samt efter 1/2 times omrøring sker der koncentrering under nedsat tryk. Ved tilsætning af svovlsyreæter under hurtig omrøring udfælder sulfatet af den oprindelige forbindelse sig. Efter filtrering og tørring under nedsat tryk ved $10^{o}C$ vindes det ønskede sulfatderivat, rede til brug.

Nummereringen ved beskrivelsen af NMR-spektrene i de følgende eksempler er inspireret af forslag der er givet af Le Men og Taylor for derivater af aspidospermidintypen (Experientia 21, 508, 1965).

Eksempel 1

Vinblastin-base (VLB)

Til en opløsning af 1,5 g VLB-sulfat ($1,65 \times 10^{-3}M$) i 15 ml destilleret vand sættes der successivt under kraftig omrøring 15 ml metylenklorid og 1,5 ml koncentreret ammoniak. Efter 5 minutter dekanteres blandingen og den vandige fase ekstraheres yderligere med 3 x 15 ml metylenklorid. De forenede organiske faser vaskes med 2 x 40 ml deioniseret vand, tørres over Na_2SO_4 og inddampes til tørhed på rotavapor. Der vindes 1,32 g VLB-base (99%).

3-Dekarbometoxy-O-4-desacetylvinblastin-3-karbohydrazid (VLH)

Til en opløsning af 1 g vinblastin-base ($1{,}23 \times 10^{-3}$M), opløst i 7 ml vandfri ætanol, sættes der 14 ml vandfrit hydrazin og 7 ml vandfri ætanol. Reaktionsblandingen opvarmes derefter til 60°C i 24 timer.

Efter afkøling tilsættes der 28 ml saltmættet vand og der foretages ekstraktion med samme rumfang metylenklorid indtil der konstateres negativ Meyer-reaktion på den syrnede vandige fase. De forenede organiske faser tørres over $MgSO_4$ og inddampes til tørhed under nedsat tryk.

Hydrazidet, der vindes i et udbytte på 88% (0,706 g) gav en enkelt plet ved t.l.c.

Eksempel 2

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat (VLE)

Til en opløsning af 275 mg ($3{,}58 \times 10^{-4}$M) O-4-desacetylvinblastinhydrazid i 7 ml vandfri metanol og 20,5 ml 1N HCl tilsættes der efter afkøling af opløsningen til 0°C 58 mg natriumnitrit. Efter omrøring i 25 minutter reguleres pH til 8,5 ved tilsætning af en passende mængde 5%s opløsning af $NaHCO_3$. Det dannede azid ekstraheres med metylenklorid. Den organiske fase tørres over $MgSO_4$ og filtreres. Der tilsættes 68,4 mg ætyl-L-leucinat ($4{,}29 \times 10^{-4}$M) og opløsningen koncentreres under nedsat tryk til ca. 4 ml. Opløsningen henstår i køleskab i 24 timer.

Når reaktionen er fuldført tilsættes der 50 ml metylenklorid og opløsningen vaskes nogle gange med rumfang af deioniseret vand som er lig med opløsningens rumfang, og en gang med en NaCl-mættet opløsning.

De forenede organiske faser tørres over $MgSO_4$, filtreres og inddampes til tørhed.

På denne måde vindes 300 mg råprodukt hvortil der sættes 0,035 g H_2SO_4 i opløsning i 1 ml vandfri metanol.

Det dannede salt udfældes med æter og bundfaldet vaskes 10 gange med 50 ml vandfri svovlsyreæter.

På denne måde vindes der 183 mg (57%) produkt som er i det væsentlige tørt og som ikke indeholder noget ætylleucinat.

Efter frigivelse af basen, kan den underkastes silikagel-kromatografi (10 g SiO_2) og eluering med 50 ml æter/ammoniakmættet metanol (92/8) og derefter 250 ml æter/ammoniakmættet metanol (85/15). VLE vindes i det andet eluat. På denne måde opsamles der 49% VLE, dvs. 152 mg base.

Fysisk-kemiske egenskaber af VLE

Smp. ca. 169°C; $[\alpha]^D = 60^\circ$ (c = 0,35 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (metanol, λmax, nm, log ε): 221 (4,62); 267 (4,15); 287 (4,02); 295 (3,99).

IR-spektrum (KBr): 3470, 2960, 2880, 1735, 1665, 1610 cm^{-1}.

Massespektrum (m/e, %): 924 (6) $M^+ + 28$; 910 (56) $M^+ + 14$; 897 (62); 896 (100); 865 (25); 938 (68); 772 (19); 709 (25); 651 (43); 571 (69).

NMR-spektrum (H^1, $CDCl_3$, ppm, 360 MHz): 9,66 (1H, bs, C^{16}-OH); 8,20 (1H, s, $N'^{\alpha}H$); 7,52 (1H, d); 7,15 (3H, m); 6,56 (1H, s, C^9-H); 6,05 (1H, s, C^{12}-H); 5,86 (1H, dd, C^{14}-H, J 14-15-12; J 14-3=3,6); 5,78 (1H, d, C^{15}-H); 4,69 (1H, m, CH(NHR)CO-); 4,2 (2H, q, $\underline{OCH_2}CH_3$); 4,18 (1H, t, C^{17}-H); 3,77 (3H, s, OCH_3); 3,66 (3H, s, OCH_3); 3,47 (1H, s, C_5-H); 2,77 (3H, s, N^{α}-CH_3); 0,92 (12H, m, $-C^{18}H_3 + C^{18'}H_3$ + isopropyl).

Eksempel 3

Metyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat (VLM)

Ved den foran beskrevne almene procedure er VLM vundet i et udbytte på 68%. De fysisk-kemiske egenskaber af VLM var som følger:

Smp. ca. 172°C, $[\alpha]^D = 67^\circ$ (c = 0,27 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (CH_3OH, λmax, nm, log ε): 220 (4,61); 267 (4,15); 287 (4,03); 294 (3,98).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3475, 2960, 2880, 1740, 1680, 1615 cm^{-1}.

Massespektrum (m/e, %): 910 (25) $M^+ + 28$; 896 (78) $M^+ + 14$; 883 (26) $M^+ + 1$; 882 (36) M^+; 850 (29); 836 (41); 822 (100); 708 (15); 681 (56); 650 (78); 570 (70).

NMR-spektrum ($CDCl_3$, ppm, 60 MHz): 9,21 (1H, s, C^{-6}-OH);

8,1 (1H, s, N'$^{\alpha}$-H); 7,53 (1H, m); 7,23 (3H, m); 6,63 (1H, s, C^{9}-H); 6,13 (1H, s, C^{12}-H); 5,86 (2H, m, C^{14}-H + C^{15}-H); 3,83 (3H, s, $-OCH_3$); 3,80 (3H, s, $-COOCH_3$); 3,63 (3H, s, $-OCH_3$); 2,8 (3H, s, $-N^{\alpha}-CH_3$); 0,96 (12H, m, $C^{18}H_3$ + $C^{18'}H_3$ + isopropyl).

Eksempel 4

n-Butyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat (VLn-But)

På den foran beskrevne almene måde vandtes VLn-But i et udbytte på 58%. Forbindelsens fysisk-kemiske egenskaber er:

Smp. ca. 158°C, $[\alpha]^{D}$ = 74° (c = 0,26 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (CH_3OH, λmax, nm, log ε): 220 (4,66); 266 (4,21); 289 (4,08); 296 (4,03).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}):3470, 2960, 2880, 1740, 1670, 1615 cm^{-1}.

Massespektrum (m/e, %): 952 (5) M^{+} + 28; 938 (31) M^{+} + 14; 924 (12) M^{+}; 923 (15)M^{+} - 1; 891 (13); 863 (36); 835 (5); 821 (11); 708 (33); 650 (81); 570 (100).

NMR-spektrum ($CDCl_3$, ppm, 60 MHz): 9,6 (1H, s, C^{-6}-OH); 8,06 (1H, s, N'$^{\alpha}$-H); 7,5 (1H, m); 7,2 (3H, m); 6,63 (1H, s, C^{9}-H); 6,1 (1H, s, C^{12}-H); 5,86 (2H, m, C^{14}-H + C^{15} - H); 4,2 (2H, t, $-COO-CH_2$); 3,83 (3H, s, $-OCH_3$); 3,63 (3H, s, $-OCH_3$); 2,8 (3H, s, $-N-CH_3$); 1 (15H, m, $-C^{18'}H_3$ + $C^{18}H_3$; CH_3 butyl; CH_3 isopropyl).

Eksempel 5

Octyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat (VL-octyl)

På samme almene måde som beskrevet foran vandtes VL-octyl i et udbytte på 48%. VL-octyl havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

Smp. ca. 145°C, $[\alpha]^{D}$ = 54° (c = 0,33 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (CH_3OH, λmax, nm, log ε, 8,62 mg/l):217 (4,69); 265 (4,14); 289 (4,01); 295 (3,95).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3460, 2940, 2920, 2870, 1735, 1665, 1610, 1500, 1455 cm^{-1}.

NMR-spektrum ($CDCl_3$, ppm, 60 MHz): 9,6 (1H, s, C^{16}-OH); 8,1 (1H, s, N'-H); 7,55 (1H, m); 7,23 (3H, m); 6,5 (1H, s,

C^9-H); 6,12 (1H, s, C^{12}-H); 5,90 (2H, m, C^{14}-H + C^{15}-H); 4,2 (2H, t, -O-CH_2-Oct; 1H, d, C^{17}-H); 3,83 (3H, s, -$COOCH_3$); 3,67 (3H, s, -OCH_3); 3,56 (1H, s, C^5-H); 2,83 (3H, s, N-CH_3); 1,33 (10H, m, massiv octyl + $CH_2^{19'}$ + CH_2^{19}); 1 (15H, m, massiv octyl + CH_3^{18} + $CH_3^{18'}$).

Eksempel 6

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-D-leucinat (VDLE)

VDLE vandtes i et udbytte på 74% ved den almene fremgangsmåde der er beskrevet foran. VDLE havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

Smp. ca. 181°C, $[\alpha]^D$ = 70° (c = 0,28 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (metanol, λmax, nm, log ε): 220 (4,67); 226 (4,20); 288 (4,11); 295 (4,02).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3460, 2960, 2880, 1735, 1665, 1605 cm^{-1}.

Massespektrum (m/c %): 924 (14) M^+ + 28; 910 (32); M^+ + 14; 897 (38) M^+ + 1; 896 (66) M^+; 863 (28); 835 (43); 709 (43); 651 (81); 570 (100).

NMR-spektrum ($CDCl_3$, ppm, 60 MHz): 9,6 (1H, s, C^{16}-OH); 8,16 (1H, s, N'^{α}-H); 7,66 (1H, m); 7,26 (3H, m); 6,7 (1H, s, C^9-H); 6,16 (1H, s, C^{12}-H); 5,90 (2H, m, C^{14}-H + C^{15}-H); 4,26 (2H, q, -$COOCH_2$); 3,83 (3H, s, -OCH_3); 3,66 (3H, s, -OCH_3); 2,90 (3H, s, -N^{α}-CH_3); 1,3 (3H, t, -($COOCH_2$)-CH_3; 0,96 (12H, m, $C^{18'}H_3$ + $C^{18}H_3$ + isopropyl).

Eksempel 7

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-serinat (VSE)

VSE fremstilledes i et udbytte på 35% ved den almene fremgangsmåde der er beskrevet foran. Forbindelsen havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

$[\alpha]^D$ = ca. 65° (c = 0,7 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (MeOH, λmax, nm, log ε): 215 (4,76); 266 (4,31); 288 (4,20); 297 (4,15).

IR-spektrum ($CHCl_3$, cm^{-1}): 3460, 3400, 2965, 2935, 2880, 1730, 1665, 1605 cm^{-1}.

NMR-spektrum ($CDCl_3$, ppm, 60 MHz): 8,13 (1H, s, $N^{\alpha'}$-H); 7,9 (1H, d, -OH); 7,52 (1H, m); 7,20 (3H, m); 6,63 (1H, s, C^9-H); 6,1 (1H, s, C^{12}-H); 5,9 (2H, m, C^{14}-H + C^{15}-H); 4,3 (2H, q, -COO-CH_2-); 3,83 (3H, s, $-OCH_3$); 3,66 (3H, s, $-OCH_3$); 2,67 (3H, s, $-N^{\alpha}-CH_3$); 1,34 (3H, t, (-COO-CH_2)CH_3); 0,95 (6H, m, $C^{18'}H_3$ + $C^{18}H_3$).

Eksempel 8

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-glutamat (VGE)

Fremstilles i et udbytte på 55% ved den fremgangsmåde der er beskrevet foran. VGE havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

Smp. ca. 149°C, $[\alpha]^D = 59^o$ (c = 2 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (MeOH, 10 mg/l, λmax, nm, log ε): 219 (4,46); 269 (3,94); 288 (3,80); 296 (3,76).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3460, 3395, 2960, 2920, 2870, 1730, 1665, 1610, 1500 cm^{-1}.

NMR-spektrum ($CDCl_3$, ppm, 60 MHz): 9,63 (1H, s, C^{16}-OH); 8,10 (1H, s, $N^{\alpha'}$-H); 7,6 (1H, m); 7,16 (3H, m); 6,64 (1H, s, C^9-H); 6,07 (1H, s, C^{12}-H); 5,83 (2H, m, $C^{14}H$ + $C^{15}H$); 4,23 (2H, q, $-COOCH_2$-); 4,16 (2H, q, $-COOCH_2$-); 3,8 (3H, s, $-OCH_3$); 3,64 (3H, s, $-OCH_3$); 3,5 (1H, s, C^5-H); 2,8 (3H, s, $-N^{\alpha}CH_3$); 1,33 (3H, t, $-CH_3$); 1,26 (3H, t, $-CH_3$); 1 (6H, m, $C^{18}H_3$ + $C^{18'}H_3$).

Eksempel 9

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-fenylalaninat (VPE)

Fremstilledes i et udbytte på 66% ved den fremgangsmåde der er beskrevet alment foran. VPE havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

Smp. ca. 154°C, $[\alpha]^D = 78^o$ (c = 1,2 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (MeOH, 9,8 mg/l, λmax, nm, log ε): 217,5 (4,67); 265 (4,13); 286,5 (3,99); 295,5 (3,95).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3560, 3460, 3400, 2860, 2830, 1730, 1650, 1610, 1500, 1455 cm^{-1}.

Massespektrum (m/c %): 958 (17); 944 (41); 930 (35); 871 (64); 651 (41); 588 (41); 571 (53); 401 (100).

NMR-spektrum ($CDCl_3$, ppm, 36 MHz): 9,48 (1H, bs, $-C^{16}-OH$); 8,1 (1H, s, $N^{\alpha'}-H$); 7,6 (1H, d); 7,5 (1H, d); 7,3-7,02 (7H, m); 6,6 (1H, s, $C^{-9}-H$); 6,1 (1H, s, $C^{12}-H$); 5,87 (2H, m, $C^{14}-H + C^{15}-H$) (J^{15-14} = 12Hz; J^{14-3} = 8,6 Hz); 4,9 (1H, m $\overset{O=C}{NHR}\!>\!CH-$); 4,16 (2H, q, $COO-CH_2$); 3,8 (3H, s, $-OCH_3$); 3,56 (3H, s, $-OCH_3$); 3,43 (1H, s, C^5-H); 2,74 (3H, s, $N^{\alpha}-CH_3$); 1,20 (3H, t, $-CH_3$ (ester)); 0,97 (3H, t, $-C^{18'}H_3$); 0,88 (3H, t, $-C^{18}H_3$).

Eksempel 10

Metyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-isoleucinat (VILM)

VILM fremstilledes i et udbytte på 66% ved den almene fremgangsmåde der er beskrevet foran. VILM havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

$[\alpha]^D$ = ca. 66° (c = 0,135 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (MeOH, λmax, nm, log ε): 225 (4,55); 266 (4,18); 288 (4,05); 295 (4,00).

NMR-spektrum ($CDCl_3$, 360 MHz): 9,48 (bs, 1H, $C^{16}-OH$); 8,03 (s, 1H,NH); 7,51 (m, 2H); 7,23-7,06 (m, 2H); 6,58 (s, 1H, C^9-H); 6,20 (s, 1H, $C^{12}-H$); 5,85 (dd, 1H, $C^{14}-H$; J^{15-14} = 12 Hz; J^{14-3} = 3,6 Hz); 5,78 (d, 1H, $C^{15}-H$); 4,62 (m, 1H $H\!>\!C\!<\!\overset{NH}{COOR}$); 4,17 (d, 1H); 3,77 (s, 3H, $COOCH_3$); 3,75 (s, 3H, $COOCH_3$); 3,6 (s, 3H, -OMe-); 2,73 (s, 3H, $N^{\alpha}-CH_3$); 2,58 (s, 1H, $C^{21}-H$); 0,92 (m, 12H, $C^{18}H_3-C^{18'}H$).

Eksempel 11

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tyrosinat (V-Tyr-E)

Fremstilles i et udbytte på 48% ved den almene fremgangsmåde beskrevet foran. V-Tyr-E havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

$[\alpha]^D$ = ca. 64° (c = 0,1087 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (CH_3OH, λmax, nm, log ε): 227 (4,73); 266 (4,26); 288 (4,07); 296 (3,94).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3460, 3400, 3040, 2950, 2840, 1715, 1660, 1610, 1500, 1455, 1225 cm^{-1}.

NMR-spektrum (360 MHz): 9,6 (bs, 1H, $C^{-6}-OH$); 8,05 (s, 1H, NH); 7,55 (m, 2H); 7,21-7,06 (m, 2H); 7,03 (d, 2H,

arom tyr J = 7,5); 6,7 (d, 2H, arom tyr, J = 7,5); 6,55 (s, 1H, C^9-H); 6,05 (s, 1H, C^{12}-H); 5,83 (dd, 1H, C^{14}-H; J^{15-14} = 12 Hz; J^{14-3} = 3,6 Hz); 5,76 (d, 1H, C^{15}-H); 4,83 (m, 1H, CH); 4,13 (massiv 3H, $-COOCH_2$, C^{17}-H); 3,76 (s, 3H, $-OCH_3$-); 3,6 (s, 3H, $-COOCH_3$); 3,45 (s, 1H, C^5-H); 2,71 (s, 3H, $-N^{\alpha}-CH_3$); 1,21 (t, 3H' $-CH_3-(CH_2OCC)$); 0,88 (m, 6H, $-C^{18}H_3-C^{18'}H_3$).

Eksempel 12

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanat (V-Trypt-E)

Fremstilledes ved den almene fremgangsmåde der er beskrevet foran i et udbytte på 72%. V-Trypt-E havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

$[\alpha]^D$ = ca. 90^o (c = 0,51119 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (MeOH, λmax, nm, log ε): 225 (5,15); 267 (4,65); 280 (ep); 290 (4,55).

Massespektrum: 998 (M^+ + 1 + 28), 984 (M^+ + 1 + 14), 970 (M^+ + 1), 926.

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3460, 3400, 3040, 2960, 2940, 2880, 1725, 1660, 1610, 1500, 1455, 1225, 740 cm^{-1}.

NMR-spektrum ($CDCl_3$, 360 MHz): 9,5 (1H, s, C^{16}-OH); 8,2 (1H, s, NH, trypt); 8,03 (1H, s, NH); 7,66 (1H, d, trypt; J = 7, 2Hz); 7,58 (1H, d, trypt; J = 7,2 Hz); 7,51 (1H, d, trypt; J = 7, 2Hz); 7,31 (1H, d, trypt; J = 7,2 Hz); 7,25-7,04 (5H, m); 6,58 (1H, s, C^9-H); 6,06 (1H, s, C^{12}-H); 5,83 (1H, dd, C^{14}-H; J = 12 Hz; J = 3,6 Hz); 5,78 (1H, d, C^{15}-H; J = 12 Hz); 4,95 (1H, q, >CH); 3,75 (3H, s, $-COOCH_3$); 3,6 (3H, s, $-OCH_3$); 3,4 (1H, s, C^5-H); 2,77 (1H, s, N-CH_3); 1,15 (3H, t, $-COOCH_3(CH_3)$).

Eksempel 13

Metyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanat (V-Trypt-M)

Fremstilledes i et udbytte på 41% ved den almene fremgangsmåde der er beskrevet foran. V-Trypt-M havde de fysisk-kemiske egenskaber:

$[\alpha]^D$ = ca. 94^o (c = 1,82 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (MeOH, λmax, nm, log ε): 269 (4,48); 280; 289 (4,32).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 1730, 1710, 1660, 1610, 1495, 1455, 1220, 740 cm^{-1}.

NMR-spektrum (260 MHz): 9,5 (1H, bs, C^{16}-OH); 8,06 (1H, s, NH ind); 8,01 (1H, s, NH ind); 7,65 (1H, d); 7,58 (1H, d); 7,38-7,06 (7H, m); 6,41 (1H, s, C^9-H); 6,05 (1H, s, C^{12}-H); 5,85 (1H, dd, C^{14}-H; J = 12Hz; J' = 3,6 Hz); 5,78 (1H, d, C^{15}-H; J = 12 Hz); 4,95 (1H, q, C); 4,2 (1H, m, C^{17}-H); 3,75 (3H, s, $-OCH_3$); 3,61 (3H, s, $-COOCH_3$); 3,58 (3H, s, $-COOCH_3$); 3,43 (2H, s, C^5-H); 2,6 (3H, s, N-CH_3).

Eksempel 14

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-valinat (VVE)

Fremstilledes på den måde der er beskrevet foran i et udbytte på 63%. VVE havde de fysisk-kemiske egenskaber:

UV-spektrum (MeOH, λmax, nm, log ε): 226 (4,95); 267 (4,57); 285 (4,45); 296 (4,40).

Massespektrum (m/e %): 910 (0,1); 896 (2); 882 (5); 823 (4,5); 822 (6); 708 (5,3); 653 (9,2); 651 (8,7); 650 (14,6); 572 (8,7); 571 (23,3); 539 (10,7); 355 (16); 354 (10); 353 (31); 294 (17); 188 (8,5); 156 (100); 155 (11,8); 154 (11,3); 144 (12,2); 141 (12,1); 140 (16,4); 136 (13); 135 (20,4); 124 (61); 122 (35,5); 121 (15,3).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3540, 3470, 3420, 2960, 2930, 2870, 1730, 1720, 1670, 1610, 1500, 1455, 1225, 745 cm^{-1}.

NMR-spektrum: 9,48 (1H, bs, C^{16}-OH); 8,03 (1H, bs, NH ind); 7,55 (1H, d; J = 7,2 Hz); 7,51 (1H, d, J = 7,2 Hz); 7,51 (1H, d); 7,23-7,06 (3H, m); 6,58 (1H, s, C^9-H); 6,06 (1H, s, C^{12}-H); 5,85 (1H, dd, C^{14}-H; J^{14-15} = 12 Hz; J^{14-3} = 3,6 Hz); 5,78 (1H, d, C^{15}-H; J = 12 Hz); 4,56 (1H, dd, C); 4,21 (2H, q, $COOCH_2$); 4,15 (1H, d, C^{17}-H); 3,96 (1H, t); 3,76 (3H, s, OCH_3); 3,6 (3H, s, $COOCH_3$); 3,46 (1H, s, C^5-H); 2,73 (3H, s, N-CH_3); 1,31 (6H, m, $COOCH_2CH_3$); 0,96 (14 H, m); 0,9 (14H, t).

Eksempel 15

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-isoleucinat (VILE)

Fremstilles i et udbytte på 58% ved den fremgangsmåde der er beskrevet foran. VILE havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

UV-spektrum (MeOH, λmax, nm, log ε): 226 (4,94); 266 (4,56); 285 (4,44); 295 (4,38).

Massespektrum (m/e %): 924 (7); 910 (11); 897 (23); 896 (44,4); 867 (11,3); 837 (18,7); 836 (26,6); 822 (4); 709 (10); 650 (21); 571 (13); 570 (34,7); 366 (21,7); 154 (100); 126 (11).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3460, 3440, 3040, 2960, 2940, 2880, 1730, 1665, 1610, 1500, 1455, 1225, 745 cm^{-1}.

NMR-spektrum ($CDCl_3$, 360 MHz): 9,46 (1H, bs, C^{16}-OH); 8,03 (1H, bs, NH); 7,55 (1H, d; J = 7,2 Hz); 7,51 (1H, d); 7,23-7,06 (3H, m); 6,58 (1H, s, C^{9}-H); 6,06 (1H, s, C^{12}-H); 5,85 (1H, dd, C^{14}-H; J = 12 Hz; J' = 3,6 Hz); 5,78 (1H, d, C^{15}-H); J = 12 Hz); 4,61 (1H, q (dd), $\bar{C}$); 4,21 (2H, q, $COO-CH_2$); 4,15 (1H, d, C^{17}-H); 3,96 (1H, t); 3,76 (3H, s, OCH_3 ester); 3,6 (3H, s, OCH_3); 3,46 (1H, s, C^{5}-H); 2,73 (3H, s, $N-CH_3$); 1,25 (3H, t, $COOCH_2CH_3$). (se fig. 4).

Eksempel 16

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-D-tryptofanat (VD-Trypt-E)

Fremstilledes i et udbytte på 60% ved den fremgangsmåde der er beskrevet foran og havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

$[\alpha]^{D}$ = ca. 70° (c = 0,3295 i $CDCl_3$).

UV-spektrum (MeOH, λmax, nm, log ε): 225 (4,77); 269 (4,30); 290 (4,20); 320 (ep).

Massespektrum (m/e %): 970, 391, 279, 165, 108, 35.

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3460, 3400, 3050, 2960, 2940, 2870, 1735, 1665, 1610, 1495, 1455, 1210, 740 cm^{-1}.

NMR-spektrum: 9,53 (1H, bs, C^{16}-OH); 8,1 (1H, s, NH ind tryp); 8,02 (1H, s, NH ind); 7,76 (1H, d); 7,65 (1H, d); 7,51 (1H, d); 7,35 (1H, d); 7,2-7,05 (6H, m); 6,53 (1H, s,

C^9H); 5,98 (1H, dd, $C^{14}H$) J^{14-15} = 12 Hz, J'^{14-3} = 3,6 Hz); 5,73 (1H, d, C^{15}-H; J = 12 Hz); 4,86 (1H, q, C-); 4,1 (3H, m, C^{17}-H-$COOCH_2$); 3,75 (3H, s, $COOCH_3$); 3,6 (3H, s, $-OCH_3$); 3,33 (2H, s, C^5-H); 2,43 (3H, s, N-CH_3); 1,16 (3H, t, $-COOCH_2-CH_3$); 0,93 (8H, m).

Eksempel 17

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-valinyl-L-tryptofanat (V-Val-Trypt-E)

Fremstilledes på den måde der er beskrevet foran. V-Val-Trypt-E vandtes i et udbytte på 40% og havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

$[\alpha]^D$ = ca. 36° (c = 0,3589 i $CHCl_3$).

UV-spektrum (Metanol, λmax, nm, log ε): 270 (4,42); 290; 312 (4,96).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3480, 3400, 2960, 2940, 2870, 1735 1725, 1660, 1610, 1500, 1455, 1230 cm^{-1}.

NMR-spektrum ($CDCl_3$, 360 MHz): 9,5 (1H, bs, C^{16}-OH); 8,18 (1H, s, NH ind); 8,01 (1H, s, NH ind); 7,6-7,06 (10H, m, arom); 6,41 (1H, s, C^9-H); 5,95 (1H, s, C^{12}-H); 5,85 (1H, dd, C^{14}-H; J^{15-14} = 12 Hz; J^{8-14} = 3,6 Hz); 5,75 (1H, d, C^{15}-H; J^{15-14} = 12 Hz); 5,02 (1H, m, C); 4,9 (1H, m, $\bar{C}$); 3,73 (3H, s, $COOCH_3$); 3,56 (3H, s, $-OCH_3$); 3,43 (2H, s, C^5-H); 2,61 (3H, s, N-CH_3); 1,05-0,86 (± 16H, m, CH_3).

Eksempel 18

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-alanylat (V-Leu-Ala-Leu-Ala-E)

I overensstemmelse med den beskrevne almene fremgangsmåde og under fremstilling af azidet ud fra 700 mg monohydrazid gav omsætning med 377 mg ætyl-L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Alaninat ved 4°C i 60 timer et udbytte på 213 mg rent V-Leu-Ala-Leu-Ala-E. Rensning opnåedes ved at råproduktet først førtes gennem en kolonne af silikagel 60 "Merck" ® (230 mesh), idet der som elueringsmiddel anvendtes en blanding af æter og ammoniakmættet MeOH (86:14) og derefter gennem en identisk kolonne ved anvendelse som elueringsmiddel af en blanding af

isopropanol/ætylacetat/cyklohexan 40:20:40.

V-Leu-Ala-Leu-Ala-E havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

UV-spektrum (metanol, 5,74 mg/100cm^3, log ε): 266 (4,24); 285-288 (4,12); 296 (4,07).

Massespektrum (isobutan-DCI, molekulær ionisering): 1152 ($M^+ + 1$), 1166 ($M^+ + 1 + 14$), 1134, 1108, 1094.

IR-spektrum (KBr): 3400, 2960, 1740, 1660, 1620, 1506, 1460, 1225, 745 cm^{-1}.

NMR-spektrum ($CDCl_3$, 360 MHz, ppm): 0,91, 1,27 (t), 1,40 (2d), 1,67 (dxd), 2,61 (s), 2,72 (s), 3,60 (s), 3,75 (s), 4,19 (q), 5,74 (d), 5,83 (dxd), 6,03 (s), 6,59 (s), 6,88 (d), 7,00 (d), 7,39 (d), 7,49 (d), 7,53 (d), 8,02 (s), 9,57 (s).

Eksempel 19

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl-L-tryptofyl-L-tryptofanat (V-Tryp-Tryp-E)

I overensstemmelse med den beskrevne almene fremgangsmåde og under anvendelse af 1 g hydrazid og 543 mg ætyl-L-tryptofyl-L-tryptofanat vandtes der 268 g rent V-Tryp-Tryp-E ved at råproduktet førtes gennem en kolonne af silikagel under anvendelse af elueringsmiddel først en blanding æter/NH_3-metanol 92:8 og derefter samme blanding, men 86:14. V-Tryp-Tryp-E havde følgende fysisk-kemiske egenskaber:

UV-spektrum (MeOH, 49,6 mg/l): max 272 (4,38); 278 (4,37); 290 (4,31); min 248 (4,18); 288 (4,30).

Massespektrum (DCI-isobutan, molekulær ionisering): 1184; 1170; 1156 ($M^+ + 1$); 1112; 1098; 624; 498; 165.

IR-spektrum (KBr): 3410; 2970; 2880; 1725; 1665; 1615; 1500; 1460; 1230 cm^{-1}.

Eksempel 20

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofylglycinat (V-Tryp-Gly-E)

Kondensation af 596 mg hydrazid og 226 mg ætyl-L-tryptofylglycinat i 41 timer ved 4°C gav 200 mg V-Tryp-Gly-E efter rensning på en silikakolonne ved anvendelse som elue-

ringsmiddel af en blanding af æter-metanol hvor andelen af ammoniakmættet metanol steg fra 4 til 14%.

Massespektrum (molekulær ionisering, isobutan): $M^+ + 1$ 1027, 1042, 1055, 1013, 983, 969.

Eksempel 21

Ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-valinyl-L-tryptofanat (V-Val-Tryp-E)

Efter søjlekromatografi vandtes der 215 mg rent V-Val-Tryp-E ud fra 500 mg hydrazid af desacetyl-VLB og 215 mg ætyl-L-valinyl-L-tryptofanat.

Massespektrum (molekulær ionisering, NH_3): $M^+ + 1$ 1069, 632, 617, 498, 332, 223.

Eksempel 22

N-(O-4-Desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofan (V-Trypt-Ac)

I overensstemmelse med den beskrevne almene fremgangsmåde, med ved anvendelse af en uforestret aminosyre vandtes V-Trypt-Ac i et udbytte på 67%.

UV-spektrum (MeOH, λmax, nm, log ε): 270 (4,29); 289 (4,18); 321 (ep).

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3400, 2860, 2820, 2760, 1720, 1650, 1605, 1590, 1500, 1455, 1225, 780.

Eksempel 23

Ætyl-N-(vinblastin-23-oyl)-L-valinat

100 mg ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl-L-valinat omsættes med en blanding af 2,5 ml pyridin og 2,5 ml eddikesyreanhydrid under en inert atmosfære og omrøring i 24 timer. Efter tilsætning af metanol og koncentrering under nedsat tryk opløses produktet i diklormetan og vaskes med vand mættet med NaCl. Den organiske fase tørres over Na_2SO_4 og koncentreres under nedsat tryk. Produktet renses ved t.l.c. med anvendelse som elueringsmiddel af en blanding af isopropanol/ætylacetat/cyklohexan 40:20:40. På denne måde vindes der 29 mg ætyl-N-(vinblastin-23-oyl)-L-valinat.

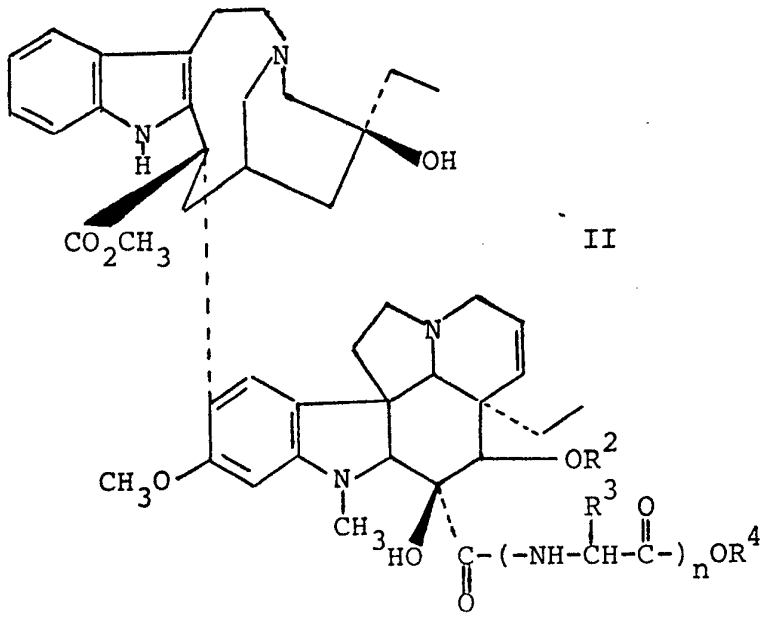
Massespektrum (molekylær ionisering, isobutan): $M^+ + 1$ 925; $M^+ + 1 + 14$ 939; $M^+ + 1 + 28$ 953; 924; 907; 893; 882; 881; 867; 866; 392; 279.

IR-spektrum (KBr, cm^{-1}): 3480, 3430, 2970, 1740, 1690, 1615.

UV-spektrum (54,2 mg/l, λmax, log ε): 263 (4,28); 288 (4,17); 296 (4,13).

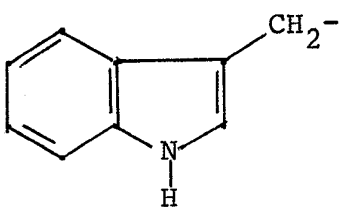
Patentkrav

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af vinblastinderivater med den almene formel

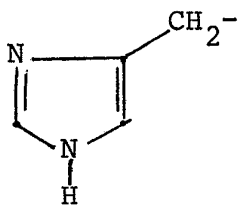


II

hvor R^2 er et hydrogenatom eller en C_{2-9} alkanoylgruppe, fortrinsvis en acetylgruppe, R^3 er et hydrogenatom, en lige eller grenet C_{1-8} alkylgruppe, hydroxy-C_{1-8}-alkylgruppe, aminohydroxy-C_{1-8}-alkylgruppe, karboxy-C_{1-8}-alkylgruppe, amido-C_{1-8}-alkylgruppe, amino-C_{1-8}-alkylgruppe, guanidin-C_{1-8}-alkylgruppe, tiol-C_{1-8}-alkylgruppe, cysteinyl-metylgruppe, metyltioætylgruppe, benzylgruppe, hydroxybenzylgruppe eller en gruppe



eller



eller hvor R^3 sammen med det tilknyttede kulstofatom og amidonitrogenatomet danner en azol- eller hydroxyazolring, n er et helt tal 1-6 og R^4 er en lige eller grenet C_{1-8} alkylgruppe eller en benzylgruppe, eller farmaceutisk acceptable syre-

additionssalte deraf med mineralske eller organiske syrer, k e n d e t e g n e t ved at man omsætter vinblastin med vandfrit hydrazin til dannelse af O-4-desacetyl-3-vinblastin-3-karboxhydrazid, omsætter det således dannede hydrazid med et nitroseringsmiddel i surt medium til dannelse af det tilsvarende acylazid og omsætter acylazidet med 1-5 ækvivalenter tilsvarende aminosyreester eller peptid, hvor eventuelle reaktive sidegrupper om nødvendigt er beskyttet, hvorpå sådanne beskyttelsesgrupper fjernes og det fremkomne produkt om ønsket omdannes til et syreadditionssalt deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at azidet af O-4-desacetylvinblastin-23-oesyre omsættes med 1-5 ækvivalenter af den ønskede aminosyreester eller peptid, hvilket peptid indeholder 2-6 aminosyrer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2 til fremstilling af ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanat, k e n d e t e g n e t ved at O-4-desacetyl-3-dekarbometoxy-vinblastin-3-karboxhydrazid omsættes med et nitroseringsmiddel i surt medium, hvorefter det på denne måde vundne acylazid omsættes med ætyl-L-tryptofanat.

4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3 til fremstilling af ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanat, k e n d e t e g n e t ved at azidet af O-4-desacetylvinblastin-23-oesyre omsættes med 1-5 ækvivalenter ætyl-L-tryptofanat.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 3 eller 4, k e n d e t e g n e t ved at den dannede forbindelse omsættes med svovlsyre til fremstilling af ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanatsulfat, hvor sulfatmængden er ækvimolær med tryptofanatmængden.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at den bruges til fremstilling af
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat,
metyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat,
n-butyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat,
octyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-leucinat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-D-leucinat,

ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-glutamat,
ætyl-N-(O-4-desacetyl-vinblastin-23-oyl)-L-serinat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-D-tryptofanat,
metyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tryptofanat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-alaninat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-fenylalaninat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-isoleucinat,
metyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-isoleucinat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-valinat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-tyrosinat,
ætyl-N-(O-4-desacetylvinblastin-23-oyl)-L-valinyl-L-tryptofanat,
ætyl-N-(vinblastin-23-oyl)-L-valinat

eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf med mineralske eller organiske syrer.