



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 91112823.9

[51]Int.Cl⁵

C07C235 / 14

[45]授权公告日 1995 年 5 月 10 日

[24]颁证日 95.2.12

[21]申请号 91112823.9

[22]申请日 91.12.24

[30]优先权

[32]90.12.25[33]JP[31]413683 / 90

[32]90.12.25[33]JP[31]419162 / 90

[73]专利权人 有限会社尾源研究所

地址 日本石川县小松市

[72]发明人 秋山澄

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

C07H 7 / 00

代理人 王景朝

A61K 31 / 70 A61K 47 / 48

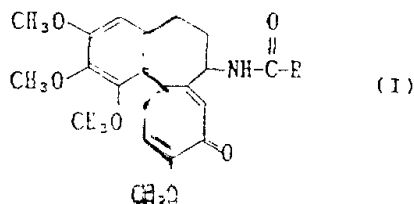
说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 脱乙酰基秋水仙素衍生物的制备方法

[57]摘要

由式 (I) 表示的脱乙酰基秋水仙素衍生物:



其中 R 为从 C₃-C₇ 糖羧酸中除去 COOH 后得到的残基, 在这些残基中存在的羟基可用羟基保护基团适当保护, 该脱乙酰基秋水仙素衍生物具有较低毒性并对抑制肿瘤细胞增生具有较强作用, 预计可作抗肿瘤剂使用。

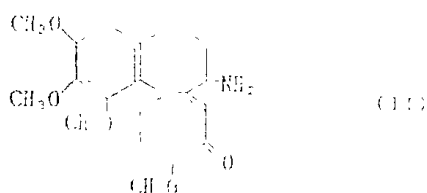
1

权利要求书

1. 制备由下式表示的脱乙酰基秋水仙素衍生物的方法，



其中 R 为从 C_3 - C_7 糖羧酸中除去 COOH 后得到的残基，在该残基中存在的羟基可用选自酰基、乙缩醛基和酮缩醇基的羟基保护基团适当保护，所述方法包括使式 (II) 表示的脱乙酰基秋水仙素

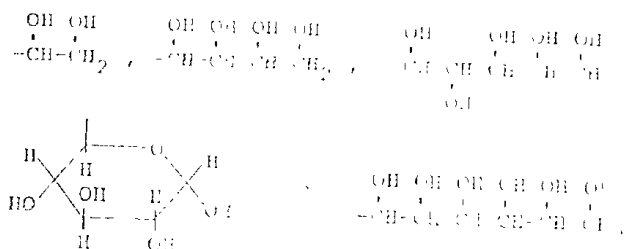


与下式表示的糖羧酸或它们的酰卤或活性酯进行酰胺化反应，



其中 R 定义同权利要求 1。

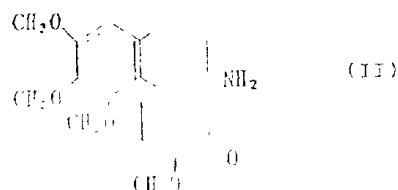
2. 权利要求 1 的方法，其中 R 为：



存在于这些基中的羟基可用酰基、乙缩醛基或酮缩醇基保护。

3. 权利要求 1 的方法，其中式 (I) 的脱乙酰基秋水仙素衍生物选自脱乙酰基秋水仙素-甘油酸丙酮化物酰胺、脱乙酰基秋水仙素-甘油酸酰胺、脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛酸四乙酰基酰胺、脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛酸二乙酰基酰胺、脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛酸酰胺、脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛酸五乙酰基酰胺和脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛酸酰胺。

4. 权利要求 1 的方法，其中由式 (II) 表示的脱乙酰基秋水仙素衍生物如下制备，

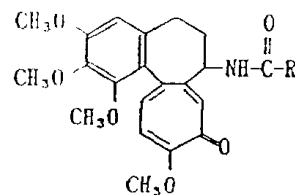


由下式表示的秋水仙素



与三烷基氧磷氮硼酸盐反应，然后用水处理反应混合物。

本发明涉及新的脱乙酰基秋水仙素衍生物。更准确地说，本发明涉及由下式所表示的脱乙酰基秋水仙素衍生物：

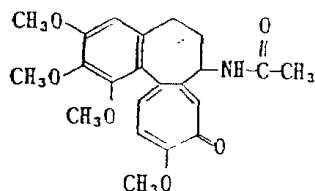


其中 R 为从 C_3 - C_7 糖羧酸中除去 COOH 后得到的残基，在该残基中的羟基可用羟基的保护基

3

团适当地保护。

已知由下式

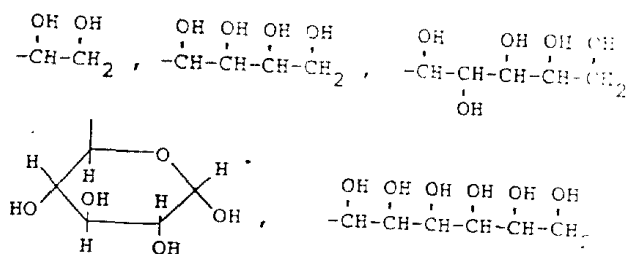


所表示的秋水仙素对肿瘤细胞、痛风等有药物活性。[参见《在农业、医药、生物学和化学中的秋水仙素》(Jowa Stage College Press Amis, Jowa, 1955)]

然而,秋水仙素具有相当高的毒性,随着后来发现的脱甲秋水仙素(脱乙酰基-N-甲基秋水仙素)的出现[(Chem. Engng. News, 37, No. 41, 67 (1959)],秋水仙素被完全忽视了。

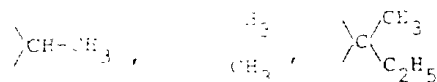
本发明人为此做了不懈地研究以寻找具有低毒性和较好的抗肿瘤活性的秋水仙素衍生物。因此,发现了由式(I)所表示的脱乙酰基秋水仙素衍生物对抑制肿瘤细胞增生显示出高活性,并且预计将作为抗肿瘤剂使用。这一发现使本发明得以完成。

由R所代表的“从C₃-C₇糖羧酸中除去COOH所得的残基”,包括从C₃-C₇单糖羧酸如甘油酸、核糖羧酸、葡萄糖酸、葡萄糖或葡庚糖酸中除去COOH所得到的单价残基(下文称为糖残基)。这些残基的例子如下所示:



存在于糖残基的多个羟基中的至少一部分可以用羟基的保护基团适当地保护。这些保护基团的例子为酰基,如乙酰基、丙酰基、丁酰基、新戊酰基和苯甲酰基;和用下式表示的乙缩醛和酮缩醇基:

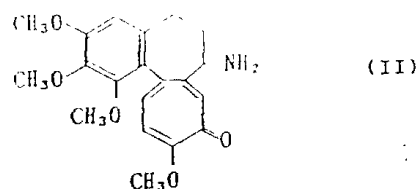
4



本发明的化合物可以通过,例如,用下式表示的糖羧酸:



其中R的定义如上或它们的反应的衍生物使下式表示的脱乙酰基秋水仙素酰胺化来制备。



采用肽化学领域中已知的酰胺化反应,使式(III)表示的糖羧酸或它的反应的衍生物(如:卤化物和活性酯)和脱乙酰基秋水仙素进行酰胺化反应。

例如,在碱存在下,脱乙酰基秋水仙素与式(III)的糖羧酸卤化物反应制备本发明的化合物。上述反应通常可在约0℃-30℃温度下进行,优选约0℃至室温。卤化物的量无严格限制,通常对每摩尔脱乙酰基秋水仙素为1-1.5摩尔,优选1-1.2摩尔。碱的例子为叔胺,如三乙基胺和吡啶;和碱金属(氢)碳酸盐,如碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾和碳酸氢钾。碱的量通常为,对摩尔脱乙酰基秋水仙素1-1.5摩尔,优选1-1.2摩尔。

上述反应通常在惰性溶剂中进行,溶剂的例子为卤化烃,如二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、二氯乙烯和三氯乙烯;脂肪醚,如乙醚、甲氧基乙醇;和芳香烃,如苯和甲苯。

在缩合剂如二环己基碳化二亚胺(DDC)存在下,脱乙酰基秋水仙素与糖羧酸直接反应或脱乙酰基秋水仙素与式(III)的糖羧酸的酯(如甲酯、乙酯或丁酯)反应制备本发明的化合物。

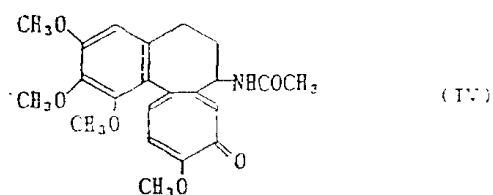
本发明所得到的化合物可用已知方法分离和纯化,如:萃取、色谱、结晶或其组合。

本发明的化合物,其羟基保护基团存在于由

5

R 代表的糖残基中的情况下, 可通过脱保护基反应 (如所需要的水解反应) 把保护基脱去。

在前述的反应中, 作为起始物的脱乙酰基秋水仙素本身是已知化合物[参见 J. Am. Chem. Soc., 75, 5292 (1953)], 可用已知方法制备, 或者可由下式表示的秋水仙素:



与三烷基氧磷氟硼酸盐反应, 然后按本发明人另外开发的方法用水处理反应混合物而制备。

秋水仙素与三烷基氧磷氟硼酸盐的反应可在惰性有机溶剂中, 在约 0℃ 至 30℃ 温度, 优选约 0℃ 至室温下进行。隋性有机溶剂的例子为卤化烃如二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、二氯乙烯和三氯乙烯; 脂肪醚, 如乙醚和甲氧基乙醇; 芳香烃, 如苯和甲苯。

与秋水仙素反应的三烷基氧磷氟硼酸盐是由下式表示的化合物:

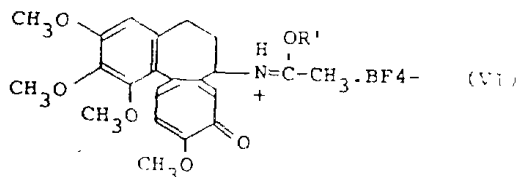


其中 R' 为烷基。

实际上三乙基氧磷氟硼酸盐作为米尔文剂是较好的。

对每摩尔秋水仙素, 三烷基氧磷氟硼酸盐的量通常为 1-2 摩尔, 优选 1-1.5 摩尔。

推测秋水仙素与三烷基氧磷氟硼酸盐反应生成下式表示的化合物:



其中 R' 的定义如上。

如用水处理式 (VI) 的化合物可以形成式 (II) 的脱乙酰基秋水仙素。用水处理通常在约 0℃-30℃ 温度下, 特别是在室温下, 通过搅拌 30

6

分钟至 3 小时来完成, 对每摩尔起始物秋水仙素, 水的量至少 1 摩尔, 通常为过量。

因此, 脱乙酰基秋水仙素是以溶于水相的状态形成的, 可以从水相中分离出来并用已知方法精制。例如, 用加入碱而形成的 pH 范围 9-10 的碱性水层来分离脱乙酰基秋水仙素。这些碱包括如: 氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠或碳酸氢钠。然后, 用有机溶剂萃取, 有机溶剂包括例如: 卤化烃, 如二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、二氯乙烯或三氯乙烯; 脂肪醚, 如乙醚或甲氧基乙醇; 或芳烃, 如苯或甲苯。

这样分离出的脱乙酰基秋水仙素可被精制, 例如, 把它转化成酒石酸盐或苹果酸盐。

本发明式 (I) 的脱乙酰基秋水仙素衍生物具有极好的抗肿瘤活性。这一点在以下所描述的对肿瘤细胞的体外或体内实验结果中很明显的看出。

实施例 1: 体外抑制肿瘤细胞增生实验

抗鼠白血病细胞 P388 / ADR 的 2×10^5 亚德里亚霉素被悬浮在含有 10% 的牛胎儿血清的 RPMI1640 培养介质中, 在实验化合物 (该实验化合物被溶解在二甲基亚砜中, 其浓度为 1mg/ml, 这是用磷酸盐缓冲溶液稀释的) 存在下培养 2 天。测试对细胞增生的影响, 抑制 50% 增生的浓度: 测定 IC_{50} ($\mu g / ml$)。结果列于表 1 中。

表 1

试验化合物	IC_{50}
化合物 1a	0.036
化合物 1b	0.066
化合物 4	0.034
化合物 5	0.037

* 在以下实施例中说明化合物编号的意义

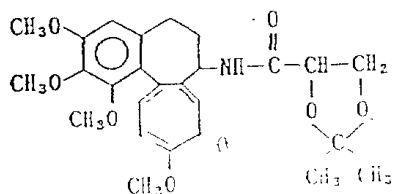
实验例 2:

内肉瘤 180 腹水肿瘤移植至鼠体的体内实验。

1×10^6 肉瘤 180 细胞移植入六周大的 ddy 雄性鼠的腹部空腔中。每组由 6 只鼠组成。在植入肿瘤细胞第 1 天后的 7 天内, 实验化合物 (溶于丙二醇, 并用磷酸盐缓冲液稀释, 最后丙二醇的浓度为 20% 或更低) 给药于鼠的腹部空腔中, 每日一次。计算存活日的平均数和延长的百分数 *。结果列表 2 中。

9

脱乙酰基秋水仙素-甘油酸丙酮化物酰胺 (化合物 1)



把甘油酸丙酮化物 (3.60g, 20mmol) 悬浮在 30ml 无水乙醚中, 往悬浮液中逐滴加入 2.4g (20mmol) 亚硫酰氯乙醚 (5ml) 溶液。加完之后, 混合物回流 3 小时。混合物被冷却到室温后, 用抽吸法过滤沉淀物, 在减压下浓缩滤液。往剩余物中加入无水二氯甲烷并使其溶解。

其间, 把 2.96g (8.3mmol) 脱乙酰基秋水仙素和 2.02g (20mmol) 三乙胺溶解在 30ml 二氯甲烷中混合物冷却到 0℃, 逐滴加入上述的甘油酰氯的二氯甲烷溶液。在 0℃ 搅拌 3 小时后, 用碳酸氢钠水溶液洗涤二氯甲烷溶液。二氯甲烷层用硫酸镁干燥, 然后在减压下浓缩, 剩余物通过硅胶柱色谱分离, 从苯-丙酮 (5:1) 冲洗的部分中得到 1.11g 产物 (化合物 1a: L-异构体)。产率为 28%, m.p. 251-253℃ (分解)。

另外, 从苯-丙酮 (5:2) 冲洗的部分中得到第二种产物 (化合物 1b: D-异构体) 0.58g, 产率为 14%。

化合物 1a: IR(KBr): 3250cm⁻¹(NH), 1670cm⁻¹(C=O), 1250cm⁻¹(-O-);

NMR(DCD₃): 1.40(3H, s), 1.60(3H, s), 1.69-2.67(4H, m), 3.62(3H, s), 3.87(3H, s), 3.91(3H, s), 3.93(3H, s), 4.00-4.50(4H, s), 6.49-7.29(4H, m)。

[0046]

化合物 1b: IR(KBr): 3250cm⁻¹(NH), 1670cm⁻¹(C=O), 1250cm⁻¹(-O-);

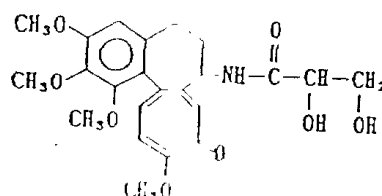
NMR(DCD₃): 1.37(3H, s), 1.46(3H, s), 1.69-2.67(4H, m), 3.62(3H, s), 3.86(3H, s), 3.91(3H, s), 3.97(3H, s), 4.00-4.50(4H, s), 6.49-7.29(4H, m)。

实施例 3

脱乙酰基秋水仙素-甘油酸酰胺

10

[N-(5, 6, 7, 9-四氢-1, 2, 3, 10-四甲氧基-4-氧代苯并[a]庚间三烯并庚间三烯-7-基)甘油酰胺] (化合物 2)



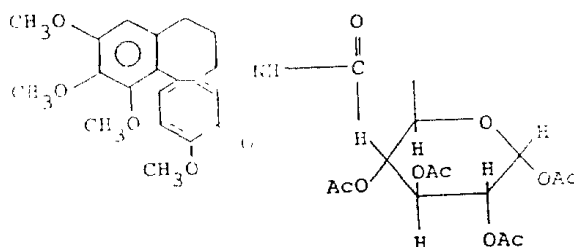
10ml 5% 的盐酸加入 0.94g (2mmol) 实施例 2 中得到的脱乙酰基秋水仙素甘油酸丙酮酰胺 (化合物 1) 的 30ml 甲醇溶液中, 在室温下搅拌 5 小时。搅拌后, 加入 200ml 氯仿, 混合物用碳酸氢钠水溶液和饱和 NaCl 水溶液洗涤。氯仿层用硫酸镁干燥, 然后在减压下浓缩。剩余物用硅胶柱色谱分离, 用苯-丙酮 (1:2) 溶剂洗脱, 得到 0.45g 上述标题化合物 (化合物 2); D, L-混合物)。产率为 52%, m.p. 48-50℃。

IR(KBr): 3350cm⁻¹(OH), 1660cm⁻¹(C=O), 1280cm⁻¹(-O-);

NMR(DCD₃): 1.87-2.64(4H, m), 3.62(3H, s), 3.87(3H, s), 3.91(3H, s), 3.96(3H, s), 3.56-4.84(6H, m), 6.51-7.58(4H, m), 7.9(1H, brs)。

实施例 4

脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛酸四-乙酰基酰胺 (化合物 3)



把亚硫酰氯 (1.19g, 10mmol) 加入 1.81g (5mmol) 的葡萄糖醛酸四乙酸酯的 30ml 氯仿溶液

11

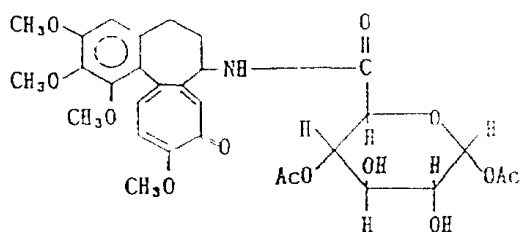
中, 混合物回流 3 小时。待混合物冷却到室温后, 在减压下除去溶剂和过量的亚硫酸氯。剩余的酰基氯溶解在 10ml 二氯甲烷中。其间, 1.78g (5mmol) 的脱乙酰基秋水仙素和 0.60g (6mmol) 的三乙胺溶解在 30ml 的二氯甲烷中并冷却到 0℃。上述酰基氯加入混合物中, 在 0℃ 搅拌 1.5 小时, 并在室温下搅拌 1.5 小时。反应混合物用碳酸氢钠水溶液洗涤, 然后用硫酸镁干燥。溶剂浓缩后, 剩余物用硅胶柱色谱分离。用苯-丙酮 (11 : 3) 溶剂洗脱。得到 1.30g 上述标题化合物 (化合物 3), 产率为 37%, m.p. 145-147℃ (分解)

IR(KBr): 1750cm⁻¹(OH), 1680cm⁻¹(C=O);

NMR(DCDI₃): = 1.91(3H,s), 1.96(3H,s), 2.00(2H,s), 2.09(3H,s), 2.10-2.64(4H,m), 3.58(3H,s), 3.87(3H,s), 3.89(6H,s), 4.00-4.22(1H,m), 5.00-5.38(4H,m), 5.80-5.89(1H,m), 6.47-7.53(4H,m)。

实施例 5

脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛二乙酰基酰胺 (化合物 4)



(可能的结构式)

上述标题化合物按实施例 4 方法制备, 只是使用 3.62g (13mmol) 的葡萄糖醛二乙酸酯, 1.71g (15mmol) 亚硫酸氯, 2.89 (8mmol) 脱乙酰基秋水仙素, 和 1.52g (15mmol) 三乙胺。产量为 1.67g, 产率为 35%。

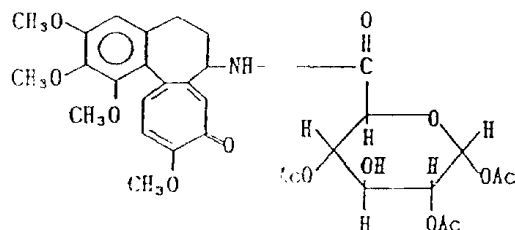
NMR(DCDI₃): = 2.15(6H,s), 2.26-2.71(4H,m), 3.64(3H,s), 3.89(6H,s), 3.98(3H,s), 3.37-4.48(8H,m), 6.53-7.81(4H,m)。

实施例 6

脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛酰胺[N- (5, 6, 7, 9-四氢-1, 2, 3, 10-四甲氧基-9-氧代苯

12

并[a]庚间三烯并庚间三烯-7-基) 葡萄糖醛酰胺] (化合物 5)

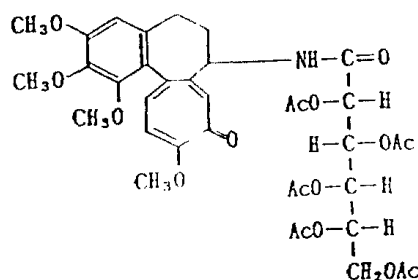


在实施例 5 中得到的脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖醛二乙酰基酰胺 (化合物 4) (1.52g, 2.5mmol) 溶解在 30mmol 甲醇中并冷却到 0℃。逐滴加入 5ml 1N 氢氧化钠, 混合物在 0℃ 搅拌 1 小时。用稀盐酸调节混合物 pH 为至 7, 并在减压下浓缩。往剩余物中加入氯仿, 过滤沉淀, 然后, 用硅胶柱色谱分离滤液。结果从被苯-甲醇 (5 : 1) 洗脱的部分中得到 0.93 克上述标题化合物 (化合物 5)。产率为 73%, m.p. 53-57℃。

NMR(DCDI₃): = 2.22-2.67(4H,m), 2.96-3.27(4H,m), 3.62(3H,s), 3.87(6H,s), 3.93(3H,s), 3.50-4.22(6H,m), 6.48-7.78(4H,m)。

实施例 7

脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖酸五乙酰基酰胺 (化合物 6)

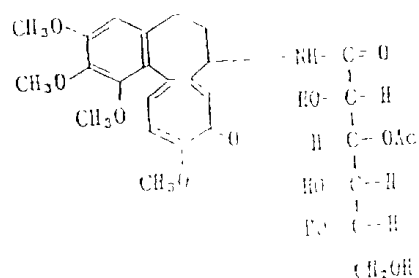


把亚硫酸氯 (1.50g, 13mmol) 加入含有 2.57g (6.3mmol) 葡萄糖酸五乙酸酯的 30ml 氯仿溶液中, 回流 3 小时。待混合物冷却到室温后, 在减压下除去溶剂和过量亚硫酸氯。剩余的酰基氯溶解在 10ml 二氯甲烷。其间, 1.53g (4.3mmol) 脱乙酰基秋水仙素和 1.00g (10mmol) 三乙胺溶解在 40ml 二氯甲烷中并冷却到 0℃。上述的酰基氯逐滴加入混合物中, 在 0℃ 搅拌 1.5 小时并在室温搅

拌 1.5 小时，反应混合物用碳酸氢钠水溶液洗涤，然后用硫酸镁干燥。待溶剂浓缩后，剩余物用硅胶柱色谱分离。用苯-丙酮溶剂（11：3）洗脱，得到 1.83g 上述标题化合物（化合物 6）。产率为 57%。

实施例 8

脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖酰胺（化合物 7）



把实施例 7 中得到的脱乙酰基秋水仙素-葡萄糖五乙酰基酰胺（化合物 6）（3.73g, 5mmol）溶解在 30ml 甲醇中并冷却到 0℃，逐滴加入 5ml 1N 氢氧化钠，在 0℃ 搅拌 1 小时，用稀盐酸调节混合物 pH 至 7，在减压下浓缩。往剩余物中加入氯仿，过滤沉淀物。浓缩滤液，剩余物用硅胶柱色谱分离。结果，从苯-甲醇（5：1）洗脱的部分中得到 1.12g 上述标题化合物（化合物 7）。产率为 42%。

表 2

实验 化合物	剂量(mg/ kgi.P)	存活日的平均数 (平均值 ± SD)	延长百分数 (%)	治愈例
化合物 1a	2.5	54.2 ± 11.6	333	4
	1.25	47.2 ± 11.5	277	2
	0.63	47.7 ± 11.1	281	1
	0.31	36.0 ± 8.5	188	
化合物 1b	5	57.0 ± 5.3	356	4
	2.5	57.0 ± 7.3	356	5
	1.25	42.5 ± 15.4	240	1
	(20%丙二 醇)	14.3 ± 3.3	14.7	0
	(对照:未 处理)	12.5 ± 4.8	—	0

表 3

实验化合物	剂量(μ g / kgi.p)	平均肿瘤重 (平均值 ± SD,g)	抑制百分率 (%)
化合物 1a	5.0	0.60 ± 0.52	57.4
	2.5	0.63 ± 0.51	55.3
	1.25	0.88 ± 0.78	47.6
	0.625	0.71 ± 0.38	49.6
对照	(20%丙二醇)	1.41 ± 0.58	—