



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0469/85

(51) Int.Cl.⁵ **C 07 D 475/08**

(22) Indleveringsdag: 01 feb 1985

(41) Alm. tilgængelig: 04 aug 1985

(44) Fremlagt: 22 apr 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 03 feb 1984 US 576581

(71) Ansøger: *Research Corporation; 405 Lexington Avenue; New York; New York, US

(72) Opfinder: **Mohammad Abu *Khaled; US, Frederick *Benington; US, Richard D. *Morin; US**

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) **Pteridinderivater, fremgangsmåde til fremstilling heraf samt farmaceutisk præparat**

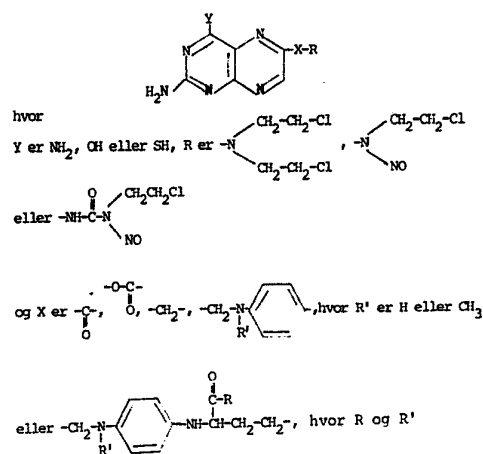
(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4077957, 4374984

(57) Sammendrag:

469-85

2,4-diaminopteridinderivater med formlen

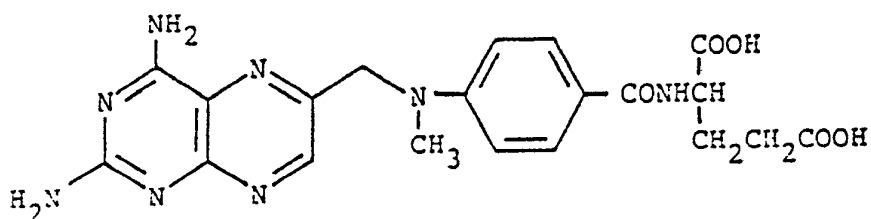


har de ovenfor angivne betydninger, med det forbehold, at når Y er NH_2 skal R' være CH_3 , og når Y er OH skal R' være H, samt farmaceutisk acceptable salte deraf. Forbindelserne har kraftig virkning til bekæmpelse af cancer.

Den foreliggende opfindelse angår pteridinderivater, der bærer en speciel alkyleringsgruppe i 6-stillingen på pteridinkernen, som det vil blive angivet nærmere i det følgende. Opfindelsen angår også farmaceutiske præparater, der indeholder de oven-

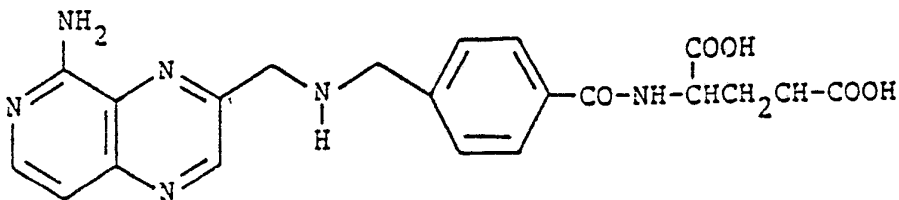
5 nævnte pteridinderivater samt en fremgangsmåde til fremstilling af derivaterne.

US patentskrifterne nr. 4.077.957 og 4.374.987 beskriver fremgangsmåder til fremstilling af pteridinforbindelser indbefattet anticancer-lægemidlet methotrexat, der har strukturen



N-p - ([2,4-diamino-6-pteridinyl)-methyl]-
methylamino) benzoyl-glutaminsyre

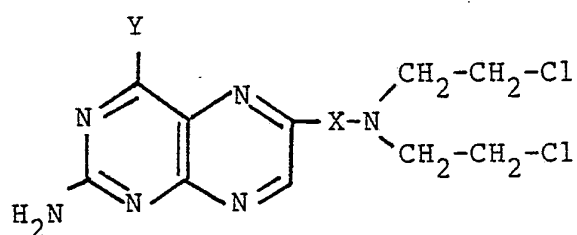
samt analoge forbindelser, såsom aminopteridin



Methotrexat er i de sidste år blevet et fremtrædende lægemiddel ved behandling af forskellige cancere (C. B. Pratt, et al., Cancer Chemother. Rep.. del 3, 6, 13 (1975)).

Ifølge den foreliggende opfindelse anvises pteridinderivater og farmaceutisk acceptable salte deraf, som har en kraftig anticancervirkning og som er signifikant mere målspecifikke end methotrexat og dets analoge. Pteridinderivaterne ifølge opfindelsen har den strukturelle formel

5



hvor

10

Y er NH_2 , OH eller SH,

og X er $-\text{C}-$ eller $-\text{CH}_2$.

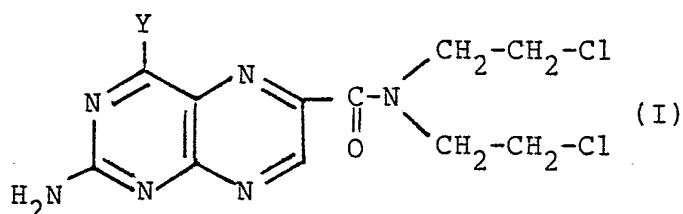


15

Pteridinderivaterne ifølge opfindelsen kan let fremstilles af fagmanden ved at anvende kendte og konventionelle synteser. Således fremstilles de 2,4-diaminopteridinderivater, hvori X er $-\text{C}-$, dvs. forbindelser med formlen



20

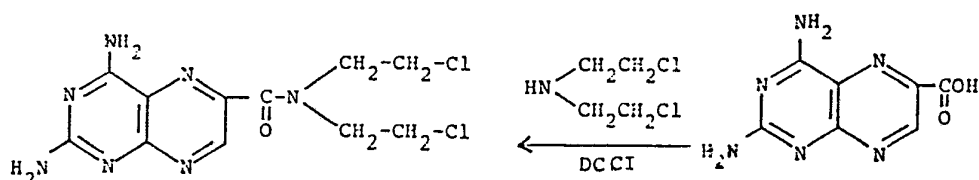


25

30

35

ved at omsætte den tilsvarende carboxylsyre under amiddannelses-betingelser, med en passende amin, til fremstilling af det ønskede derivat. Et eksempel på rækkefølgen af reaktioner er vist som følger:



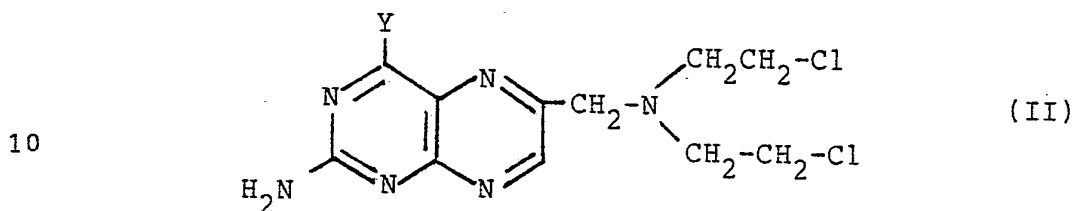
2,4-diamino-6-[(bis-2-chlorethyl)carboxamido]pteridin.
(DCCI er dicyclohexylcarbodiimid).

Udgangsforbindelsen i det ovenfor viste reaktionsskema kan fremstilles ved oxidation af 2,4-diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridin, der er et kendt mellemprodukt, hvis fremstilling er beskrevet i US patentskrift nr. 4.077.957.

De amiddannende betingelser, der refereres til i nærværende beskrivelse og krav, indebærer anvendelsen af kendte derivater af de beskrevne syrer, såsom syrehalogeniderne, syreanhydriderne, blandede anhydrider, lavere alkylestere, carbodiimider, carbonyldiimidazoler og lignende. Reaktionerne gennemføres i organiske opløsningsmidler, såsom acetonitril, tetrahydrofuran, dioxan, eddikesyre, methylenchlorid, ethylenchlorid og lignende sådanne opløsningsmidler. Den amiddannende reaktion vil foregå ved stuetemperatur eller ved forhøjet temperatur. Anvendelsen af forhøjet temperatur er bekvem, idet den tillader noget forkortede reaktionsperioder. Der kan anvendes temperaturer, der ligger fra 0°C op til reaktionssystemets tilbagesvalingstemperatur. Som en yderligere hensigtsmæssig foranstaltning kan den amiddannende reaktion gennemføres i nærværelse af en base, såsom tertiære organiske aminer, f.eks. trimethylamin, pyridin, picoliner og lignende, navnlig når der dannes hydrogenhalogenid ved amiddannelsesreaktionen, f.eks. mellem syrehalogenid og aminosubstans. Naturligvis

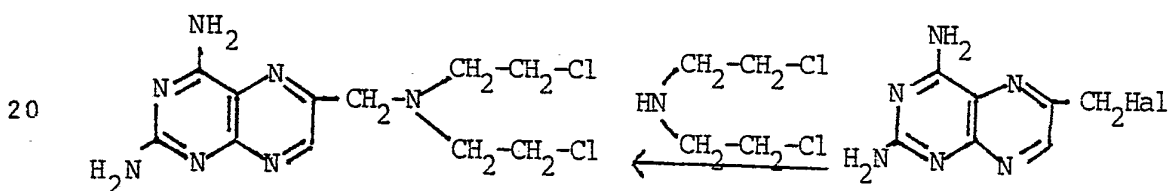
kan der i de reaktioner, hvor der dannes hydrogenhalogenid, også anvendes en hvilken som helst almindeligt anvendt hydrogenhalogenidacceptor.

- 5 De 2,4-diaminopteridinderivater, hvori X er $-\text{CH}_2-$, dvs. forbindelser med formlen

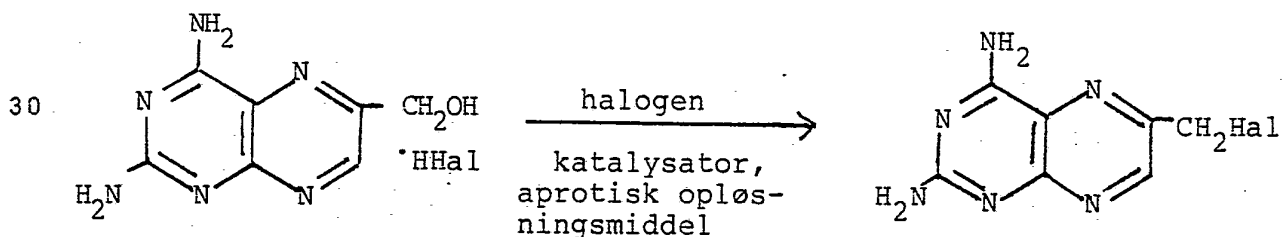


fremstilles ved at et 6-halogenmethylderivat af 2,4-diaminopteridin omsættes med bis(2-chlorethyl)amin til dannelsen af
15 det ønskede derivat.

Et eksempel på reaktionsforløbet er vist som følger:



6-halogenmethylderivatet kan fremstilles ved halogenering af et hydrohalogenidsalt af den kendte forbindelse 2,4-diamino-
25 6-(hydroxymethyl)-pteridin i nærværelse af en katalysator i et aprotisk opløsningsmiddel. Reaktionsforløbet vil være som følger:



35 Passende katalysatorer til den ovennævnte reaktion kunne f.eks. være triphenylphosphin og lignende. Anvendelige aprotiske opløsningsmidler indebefatter bl.a. N,N-dimethylacetamid, N,N-diethylacetamid, 1-methyl-pyrrolidin-2-on, N,N-dimethylpropionamid, acetonitril, benzonitril, tetrahydrofuran og dioxan.

0

5

De omhandlede derivater (som indbefatter farmaceutisk acceptable salte) kan formuleres til forskellige dosisformer som det er kendt indenfor teknikken og kan anvendes til behandling af forskellige cancere på samme måde som det for tiden anvendte lægemiddel methotrexat.

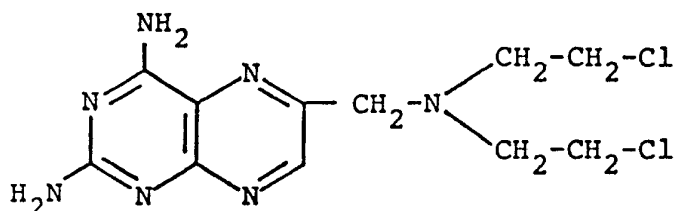
10

Følgende eksempler belyser fremgangsmåden til fremstilling af de omhandlede 2,4-diaminopteridinderivater og deres anvendelse i anticancerterapien.

Eksempel 1

Fremstilling af:

15



2,4-diamino-6-(bis-2-chlorethyl)-aminomethyl-pteridin.

20

A. 2,4-diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridin-hydrochlorid.

25

30

35

Til en opløsning af 42,8 g (0,167 mol) 2,4,5,6-tetraaminopyrimidinsulfat-monohydrat, som har været omkrystalliseret fra kogende 1N svovlsyre, i 700 ml kogende vand sattes lidt efter lidt en opløsning af 40,7 g (0,167 mol) bariumchlorid-dihydrat i 100 ml vand. Efter en kort reaktionsperiode filtreredes blandingen fra det udfældede bariumsulfat, filtratet omrørtes med 5 g affarvende carbon og filtreredes på ny. Denne opløsning sattes til en under omrøring værende blanding af 426 g ammoniumchlorid, 26,3 g (0,167 mol) cystein-hydrochlorid, 46,6 g (0,259 mol) dihydroxyacetone-dimer og 970 ml vand i en 3 liters trehalset kolbe forsynet med en omrører og et glas-frittet gasindløbsrør. Den resulterende blanding omrørtes i 67 timer ved stuetemperatur, idet der i dette tidsrum førtes en langsom oxygenstrøm gennem blandingen via gasindløbsrøret. Produktet, 2,4-

0

diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridin-hydrochlorid, der var skilt ud som et gyldenbrunt fast stof opsamledes ved sugefiltrering, vaskedes med vand og lufttørredes; udbytte 17,2 g (45%).

5

B. 2,4-diamino-6-(brommethyl)-pteridin-hydrobromid.

Til en opløsning af 17,2 g 2,4-diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridin i 345 ml varmt vand sattes 50 ml 28% vandig ammoniak. Efter afkøling filtreredes den faste frie base fra og lufttørredes; udbytte 12,4 g (86%). En under omrøring værende blanding af den frie base i 800 ml kogende ethanol behandledes med 7,5 ml 48% brombrintesyre og fik lov til at køle. Det dannede hydrobromidsalt opsamledes ved sugefiltrering, vaskedes med ethanol og lufttørredes; udbytte 16,6 g (94%).

Til en under omrøring værende opløsning af 63,9 g (0,244 mol) triphenylphosphin i 325 ml N,N-dimethylacetamid sattes der dråbevis 39 g (0,244 mol) brom ved en temperatur på 10 til 12°C. Til denne under omrøring værende blanding sattes der i en portion 16,6 g (0,061 mol) 2,4-diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridin-hydrobromid. Efter omrøring i 2 timer ved 20-25°C tilsattes der 4 ml ethanol, og blandingen holdtes et koldt rum (4°C) natten over. Det meste af N,N-dimethylacetamidet fjernes ved destillation ved et tryk på 1 mmHg og en badtemperatur på ikke over 45°C. Remanensen omrørtes med 190 ml benzen, som dekanteredes fra den uopløselige halvfaste remanens. Denne procedure blev gentaget med en yderligere portion på 190 ml benzen, som dekanteredes fra den uopløselige halvfaste remanens. Proceduren blev gentaget med yderligere en portion på 190 ml benzen og det tilbageværende faste stof omrørtes ved 80°C med 435 ml iseddikesyre indtil der var indtrådt fuldstændig opløsning. Denne blanding fik lov til at køle natten over, og det udskilte faste stof fjernedes ved filtrering; udbytte 15,5 g. Dette rå produkt omkrystalliseredes fra kogende isopropanol, filtreredes fra 5 g uopløseligt materiale; udbytte

0

af 2,4-diamino-6-(brommethyl)-pteridin-hydrobromid indeholdende 0,5 mol isopropanol som krystalvæske, 8,3 g (34,5)

C. 2,4-diamino-6-bis-(2-chlorethyl)-aminomethyl-pteridin.

5

Til en opløsning af 4 g 2,4-diamino-6-(brommethyl)-pteridin-hydrobromid i 150 ml varmt vand sættes 10 ml 28% vandigt ammoniak, og efter afkøling filtreredes den udfældede faste base fra, den vaskedes med vand og lufttørredes; udbytte

10

2,94 g (94%).

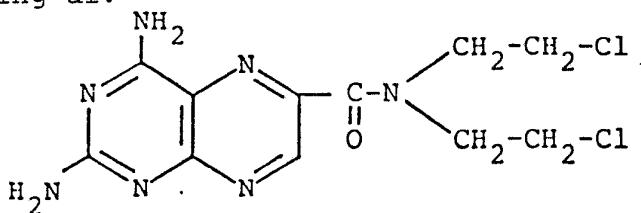
Til en under omrøring værende opløsning af 2,4 g (9,4 mmol) 2,4-diamino-6-(brommethyl)-pteridin i 50 ml N,N-dimethylacetamid sættes 6 g (0,04 mol) bis-(2-chlorethyl)-amin og blandingen omrørtes ved 50-55°C i 5 timer og derpå i 18 timer ved stuetemperatur. Efter frafiltrering af en lille mængde mørkt uopløseligt stof, fortyndedes filtratet med 200 ml vand, hvorpå 2,4-diamino-6-bis-(2-chlorethyl)-aminomethyl-pteridin udskilte sig som et lys gyldenbrunt fast stof, som filtreredes, vaskedes grundigt med vand og lufttørredes; udbytte 0,92 g (31%).

20

Eksempel 2

Fremstilling af:

25



30

4 g 2,4-diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridin-hydrochlorid opløses i natriumbicarbonat og oxideres med KMnO_4 . Det oxiderede produkt, 2,4-diamino-6-(carboxy)-pteridin, vindes ved neutralisering af reaktionsblandingen med fortyndet H_2SO_4 .

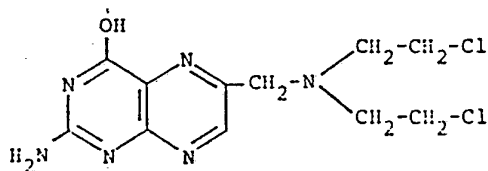
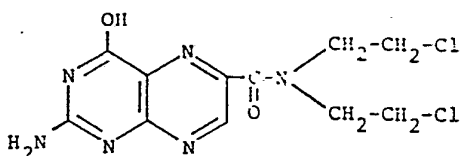
35

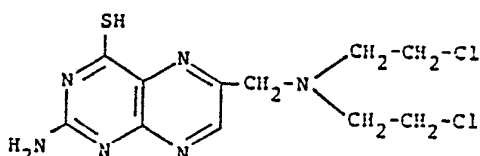
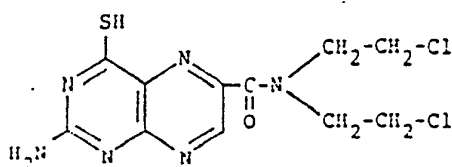
Syntesevej 1: 2,5 g (9,5 mmol) 2,4-diamino-6-(carboxy)-pteridin opløses i DMSO og sættes til 9,5 mmol N,N'-dicyclo-

hexylcarbodiimid (DCCI). Til denne reaktionsblanding sættes 6 g (0,4 mmol) bis(2-chlorethyl)-amin og der omrøres i 18 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen oparbejdes derpå på samme måde som nævnt i trin C, eksempel 1.

Syntesevej 2: 2,5 g (9,5 mmol) 2,4-diamino-6-(carboxy)-pteridin opløses i tørt DMF. Opløsningen afkøles til -5°C . Til denne opløsning sættes 9,5 mmol N-methylmorpholin og der omrørtes i 15 minutter. Til den under omrøring værende opløsning sættes 9,5 mmol ethylchlorformiat, og der omrørtes i en halv time. En frisk fremstillet bis(2-chlorethyl)-amin (0,5 mmol) i DMF (afkølet) tilsættes dråbevis. Efter en halv time blev reaktionsblandingen bragt til stuetemperatur og henstod natten over. Reaktionsblandingen indampes til tørhed. Remanensen opløses i vand og neutraliseres ved tilsætning af fortyndet HCl eller NaHCO_3 -opløsning. Resten af proceduren er den samme som angivet ovenfor.

De følgende yderligere forbindelser, der ligger indenfor den foreliggende opfindelses rammer kan fremstilles ved at anvende analoge metoder:





Eksempel 3

Farmakologiske forsøgsresultater

15 Virkningsstyrken for den i eksempel 1 fremstillede forbindelse, dvs. 2,4-diamino-6(bis-2-chlorethyl)-aminomethyl-pteridin bestemtes på B6D2F1/J hunmus, (Jackson Lab., Bar Harbor, ME). Under forsøgene blev dyrene holdt i et kontrolleret miljø med begrænset adgang, og de fik fri adgang til foder og
 20 vand. De blev delt i grupper, omfattende 10 dyr i hver gruppe. Musene blev podet intraperitonealt (I.P.) med 1×10^5 L-1210 museleukæmi-lymfoblaster. Dag 0 var den dag, da L-1210 blev indsprøjtet og den følgende dag, dag 1, startede behandlingen. Indledningsvis var de anvendte doser af lægemidlet 2,5; 5; 10
 25 og 20 mg/kg og de blev anvendt i suspension i destilleret vand. For at undersøge dette lægemiddels åbenbare toksiske virkning blev de ovennævnte doser også indsprøjtet (i.p.) på normale mus af alderen 9-11 uger og med en vægt på 22-25 g pr. mus. Der indsprøjtedes et rumfang på 0,2 til 0,3 ml af suspensionen
 30 i hvert dyr. En enkelt dosis benyttedes til såvel toksicitetsstudier som aktivitetsstudier.

Resultaterne fra toksicitetsstudierne viste ingen toksisk dødsfald hos dyr fra den dosis, der viste maksimal aktivitet, dvs.
 35 5 mg/kg. Resultaterne for lægemiddelvirksomheden er opstillet i fig. 1. Det ses, at lægemidlet havde en signifikant virkning på overlevelsessevnen hos dyr implanteret med 1×10^5 L-1210 tumorceller på dag 0. Flere doser blev undersøgt og i hvert tilfælde var der en mærkbar forlængelse af levetiden, sammen-

lignet med kontrollen (punkteret linie på fig. 1). For eksempel havde dyr, der modtog 2,5 mg/kg af lægemidlet en forlænget levetid på 190%, mens dyr, der modtog en dosis på 5 mg/kg viste en mærkbar overlevelsessevne (fuldt optrukket linie på fig. 1). Denne dosis blev gentaget 2 gange og ved hver undersøgelse viste den et lignende overlevelsesmønster, dvs. 50% af dyrene havde en forøget levetid på mere end 200%, mens de andre 50% af dyrene blev fuldstændigt kureret og endda forblev i live efter afslutningen af 90 dage. Imidlertid havde de dyr, der modtog lægemidlet i en mængde på henholdsvis 10 og 20 mg/kg en forlænget levetid på henholdsvis 250 og 140%, og 20% af de dyr, der behandledes med 10 mg/kg forblev i live ved afslutningen af 30 dage (se fig. 1).

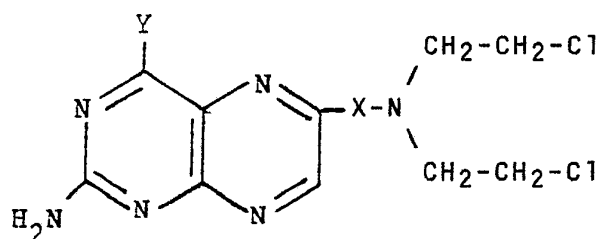
Virkningen af 2,4-diamino-6-(bis-2-chlorethyl)-aminoethylpteridin afprøvedes også på fast tumor. Voksne BALB/C hunmus fik intravenøst indgivet 2×10^6 levedygtige MOPC 104E celler. 18 dage efter transplantationen af tumor, da tymorbyrden var stor og på et fremskredet stadium, behandledes musene med 5 mg/kg af forbindelsen ifølge opfindelsen i en suspension (I.P.). Forøgelsen af musenes levetid viste sig at være 224%, selv når behandlingen startede på et meget fremskredet stadium af tumorvækst, (dvs. behandlingen startede på den 18. dag, hvor kontroldyrene døde på den 20. dag).

Der er gennemført en yderligere afprøvning ved Lederle Laboratories, Pearl River, New York, til demonstration af virkningen af 2,4-diamino-6-(bis-2-chlorethyl)-aminomethylpteridin ved forsøget betegnet (CL 551.926) på methotrexat-resistent L1210 leukæmi hos mus. CD₂F₁-mus modtog 10^5 tumorceller intraperitonealt, og der blev indgivet lægemiddel intraperitonealt en gang om dagen i 9 dage efter tumorcelleimplantation. De fremkomne resultater viste, at når aminopteridin (CL 551.926) blev indgivet i doser på henholdsvis 0,62 mg/kg, 0,31 mg/kg og 0,15 mg/kg var forøgelsen i levetiden sammenlignet med kontrolmus (mus, som modtog tumorceller, men ikke modtog nogen behandling) større end henholdsvis 80%, 94% og 65%. Når derimod

methotrexat blev indgivet i doser på henholdsvis 1,25 mg/kg, 0,62 mg/kg og 0,31 mg/kg, var forøgelsen af levetiden kun henholdsvis 2%, 7% og 4%. Disse forsøgsresultater viser, at 2,4-diamino-6-(bis-2-chlorethyl)-aminomethylpteridin har en kraftig effektivitet mod methotrexat-resistent L1210 leukæmi hos mus, hvilket ifølge sagens natur ikke er tilfældet for methotrexat.

P a t e n t k r a v .

1. Pteridinderivat, k e n d e t e g n e t ved den almene formel



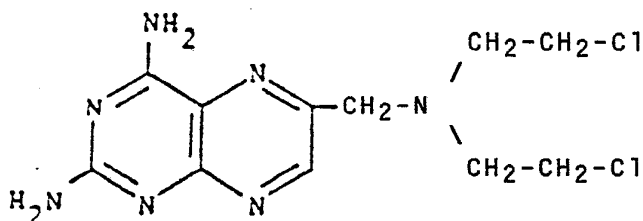
hvor

Y er NH₂, OH eller SH,

og X er $\begin{array}{c} \text{-C-} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ eller -CH₂-

eller farmaceutisk acceptable salte heraf.

2. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det er en forbindelse med formlen

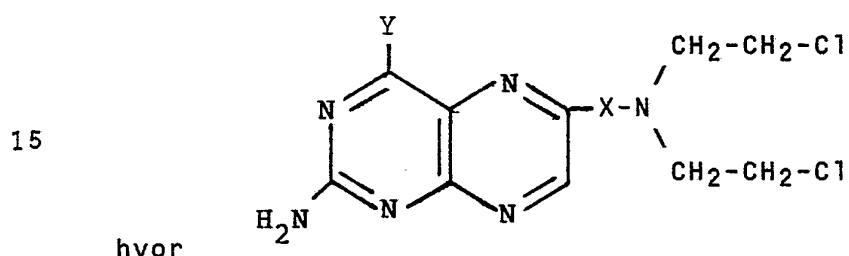


eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

3. Præparat til bekæmpelse af cancer, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en mod cancer effektiv mængde af en forbindelse ifølge krav 1.

5 4. Præparat til bekæmpelse af cancer, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en mod cancer effektiv mængde af en forbindelse ifølge krav 2.

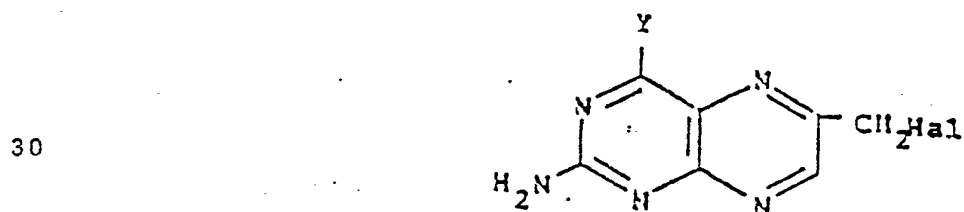
10 5. Fremgangsmåde til fremstilling af pteridinderivater med formen



20 Y er NH₂, OH eller SH,

og X er $\begin{array}{c} \text{-C-} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ eller $\text{-CH}_2\text{-}$,

25 k e n d e t e g n e t ved, at man til fremstilling af en forbindelse, hvor X er CH₂, omsætter et methylhalogenid med formen



hvor Y har samme betydning som ovenfor og Hal betyder halogen,

35

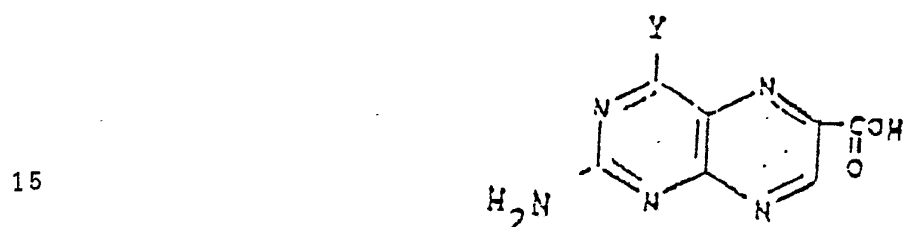
med en amin med formelen

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl} \\ / \\ \text{NH} \\ \backslash \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl} \end{array}$$

5 eller til fremstilling af en forbindelse, hvor X er



10 omsætter en tilsvarende carboxylsyre med formelen



hvor Y har samme betydning som ovenfor,

20 under betingelser til dannelse af et amid, med en amin med formelen



6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, kendt tegnet ved, at den anvendes til fremstilling af en forbindelse med formelen

