



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 147484 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 1606/79

(51) Int.Cl.³: C 07 D 519/04

(22) Indleveringsdag: 19 apr 1979

(41) Alm. tilgængelig: 21 okt 1979

(44) Fremlagt: 27 aug 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 20 apr 1978 US 899032

(71) Ansøger: ELI *LILLY AND COMPANY; Indianapolis, US.

(72) Opfinder: George Joseph *Cullinan; US, Koert *Gerzon; US.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard

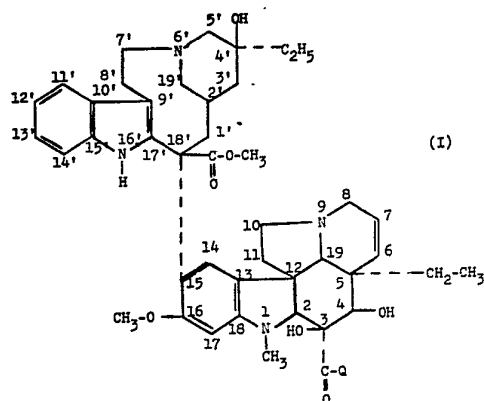
(54) Fremgangsmåde til fremstilling af derivater af
4-desacetyl-vincalucoblastin-C-3-carboxhydrazid

(57) Sammendrag:

hvor i Q betegner gruppen $\text{-NH-N} \begin{matrix} R \\ R^1 \end{matrix}$, R er alkyl med 1-3 C-atomer, β -hydroxyethyl, β -acetoxyethyl, alkanoyl med 2-4 C-atomer, dichloroacetyl, benzoyl eller alkylcarbazyl med 1-3 C-atomer i alkylgruppen, R¹ er hydrogen eller, når R er alkyl, tillige methyl, eller R og R¹ danner tilsammen en alkylidengruppe, fremstilles ved at omsætte det tilsvarende C-3-carboxazid med en alkylhydrazin eller ved at omsætte det tilsvarende C-3-carboxhydrazid med et aldehyd, en keton eller et syrechlorid. Forbindelserne er virksomme som anti-tumor-midler.

1606-79

Derivater af 4-desacetyl-vincalucoblastin-C-3-carboxhydrazid med den almene formel:



DN 147484 D

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte derivater af 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-carboxyhydrazid med den i krav 1's indledning anførte almene formel I, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Adskillige naturligt forekommende alkaloider, der kan udvindes fra *Vinca rosea*, har vist sig at være virksomme ved behandling af eksperimentelt fremkaldte sygdomme hos dyr.

10 Blandt disse alkaloider kan nævnes leurosin (beskrevet i USA patentskrift nr. 3 370 057), vincaleukoblastin (vinblastin), der i det følgende betegnes som VLB (beskrevet i USA patentskrift nr. 3 097 137), leuroformin (beskrevet i belgisk patentskrift nr. 811 110), leurosidin (vinrosidin)

15 og leurocristin, der i det følgende betegnes vincristin (begge beskrevet i USA patentskrift nr. 3 205 220), deoxy-VLB "A" og "B" (beskrevet i Tetrahedron Letters, 783 (1958), 4-desacetoxvinblastin (beskrevet i USA patentskrift nr. 3 954 773), 4-desacetox-3'-hydroxyvinblastin (beskrevet

20 i USA patentskrift nr. 3 944 554), leurocolombin (beskrevet i USA patentskrift nr. 3 890 325) og vincadiolin (beskrevet i USA patentskrift nr. 3 887 565). To af disse alkaloider, VBL og vincristin, markedsføres nu som medikamenter til behandling af visse sygdomme, specielt leukæmi-

25 sygdomme og lignende lidelser hos mennesker. Disse to markedsførte alkaloider indgives sædvanligvis ad intravenøs vej.

Den kemiske modifikation af Vinca-alkaloiderne har været forholdsvis begrænset. For det første er de involverede

30 molekylstrukturer overordentlig komplicerede, hvorfor det er vanskeligt at gennemføre kemiske reaktioner, som ændrer en specifik funktionel gruppe i molekylet uden at indvirke på andre grupper. For det andet har man ud fra *Vinca rosea* fremstillet dimere alkaloider, som ikke indeholdt de

ønskede kemoterapeutiske egenskaber, og en bestemmelse af disse alkaloiders struktur har ført til den konklusion, at disse "inaktive" forbindelser er nært beslægtede med de aktive alkaloider, idet de ofte kun afviger herfra ved stereokemien på et enkelt sted. Således synes den anti-neoplastiske aktivitet at være begrænset til meget specifikke grundstrukturer, og mulighederne for at opnå mere aktive medikamenter ved modifikation af disse strukturer synes at være tilsvarende små. Blandt de vellykkede forsøg på at ændre fysiologisk virksomme alkaloider kan nævnes fremstillingen af 6,7-dihydro-VLB (beskrevet i USA patentskrift nr. 3 352 868) og udskiftningen af acetylgruppen ved VLB-ringsystemets carbonatom nr. 4 med højere alkanoylgrupper eller med ikke-beslægtede acylgrupper (se USA patentskrift 3 392 173). Adskillige af disse C-4-derivater er i stand til at forlænge levetiden hos mus, der er podet med P1534-leukæmi. Et sådant C-4-derivat, hvori acetylgruppen ved VLB-ringsystemets C-4-atom udskiftes med en chloracetylgruppe, er desuden et nyttigt mellemprodukt ved fremstillingen af strukturelt modificerede VLB-forbindelser, hvori en N,N-dialkylglycylgruppe erstatter acetylgruppen ved C-4 i VLB (se USA patentskrift nr. 3 387 001). Man har endvidere fremstillet C-3-carboxamid- og C-3-carboxhydrazid-derivater af VLB, vincristin, vincadiolin og andre alkaloider, og disse derivater har vist sig at være virksomme ved behandling af svulster (se belgisk patentskrift nr. 813 168). Disse forbindelser er overordentlig interessante, idet f.eks. 3-carboxamiderne af VLB er mere virksomme over for Ridgeway's osteogene sarcoma og Gardner's lymphosarcoma end selve forbindelsen VLB, som er det fundamentale alkaloid, hvorefter disse carboxamider er afledt. Visse af disse amid-derivater har tilnærmelsesvis samme virkning som vincristin over for de samme tumorer. Et af disse amider, 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxamid eller vindesin, underkastes løbende kliniske eksperimenter på mennesker, og det har vist sig, at forbindelsen er virksom over for visse

leukæmi-forekomster. Hos mennesker synes vindesin at have en lavere grad af neuro-toxicitet end vincristin, og forbindelsen er tydeligvis virksom over for vincristin-resistente former for leukæmi.

- 5 I dansk fremlæggelsesskrift nr. 141 511 omtales 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid som et virksomt anti-tumor-middel over for transplanterede tumorer hos mus. Forbindelsen har endvidere vist sig at være virksom over for Ridgeway's osteogene sarcoma, Gardner's lymphosarcome og P 1534 (J)-leukæmi.

Ovennævnte danske fremlæggelsesskrift nr. 141 511 omtaler, foruden 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid, flere andre forbindelser, der er beslægtede med forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen. Disse kendte forbindelser har lignende virkninger som de her omhandlede forbindelser, men som det fremgår af den efterfølgende forsøgsrapport, er de her omhandlede forbindelser mere aktive end de ovennævnte kendte forbindelser, eller de er effektive i lavere doser eller bliver virksomme på kortere tid.

- 20 I de omhandlede forbindelser med den almene formel I kan R betegne methyl, ethyl, n-propyl eller isopropyl, når R^1 betegner hydrogen.

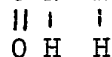
R og R^1 kan endvidere tilsammen betegne en alkylidengruppe med 1-3 carbonatomer, og en sådan gruppe kan være methylden ($=CH_2$), ethyliden ($=CH-CH_3$), n-propyliden ($=CH-C_2H_5$)

eller isopropyliden ($=C \begin{array}{l} \swarrow CH_3 \\ \searrow CH_3 \end{array}$).

Forbindelserne med formel I navngives som derivater af 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid. En systematisk navngivning af disse forbindelser burde omfatte betegnelsen "3-descarbomethoxy", men denne betegnelse er udeladt, idet

den er implicit indeholdt i betegnelsen "C-3-carboxhydrazid", fordi C-3-carbomethoxygruppen i VLB er udskiftet. Man kan også anvende andre navngivningssystemer. F.eks. kan forbindelserne navngives som derivater af 4-desacetyl-VLB-23-desmethoxy-23-hydrazid, idet man her refererer til, at methoxylgruppen ved C-23 er udskiftet med hydrazid. Imidlertid foretrækkes det at navngive forbindelserne som derivater af C-3-carboxhydrazid.

Hydrazin indeholder to nitrogenatomer, som i et hydrazid numereres på følgende måde: C-N¹-N²-H.



Hydrazid-derivaterne fremstillet ifølge opfindelsen er alle N²-derivater.

De omhandlede forbindelser med formel I fremstilles ud fra 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid, som kan opnås ved reaktion imellem hydrazin og VLB i overensstemmelse med den metode, der er beskrevet i det ovennævnte danske fremlæggeskrift nr. 141 511. Ifølge denne fremgangsmåde opvarmes VLB og hydrazin i en lukket reaktionsbeholder under anvendelse af ethanol som opløsningsmiddel. Alternativt kan man omsætte 4-desacetyl-VLB med vandfri hydrazin under samme betingelser. Reaktionen mellem hydrazin og VLB tjener til at hydrolysere acetoxylgruppen ved C-4, og reaktionsproduktet bliver herved 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid, uanset om der anvendes VLB eller 4-desacetyl-VLB som udgangsmateriale.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid som udgangsmateriale ved fremstilling af de forbindelser med formel I, hvori R og R¹ tilsammen betegner en alkylidengruppe med 1 - 3 carbonatomer. Nærmere bestemt omsættes det usubstituerede C-3-carboxhydrazid med formaldehyd, acetaldehyd, propionaldehyd eller acetone.

Disse alkyliden-derivater kan hydrogeneres, f.eks. med et reducerende hydrid, såsom NaBH_4 , til opnåelse af den tilsvarende forbindelse med formel I, i hvilken R betegner en alkylgruppe med 1 - 3 carbonatomer, og R^1 betegner hydrogen.

Opfindelsen illustreres nærmere ved de følgende eksempler.

Fremstilling af 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid
(udgangsmateriale)

10 4-desacetyl-VLB blev opvarmet i vandfri ethanol med et overskud af vandfri hydrazin i en lukket reaktionsbeholder ved omkring 50°C i omkring 18 timer. Reaktionsbeholderen blev afkølet og åbnet, indholdet blev udtaget, og de flygtige bestanddele blev inddampet i vakuum. Den resulterende inddampningsrest, der bestod af 4-desacetyl-VLB-C-3-carbox-

15 hydrazid, blev opsamlet i methylenchlorid, og methylenchlorid-opløsningen blev vasket med vand. Methylenchlorid-fasen blev skilt fra og tørret, og methylenchloridet blev fjernet ved inddampning i vakuum. Inddampningsresten blev opløst i en 1:1 blanding af chloroform og benzen og chromatograferet over silicagel. Til udvikling af chromatogrammet anvendtes en eluent bestående af benzen, chloroform og triethylamin. De første chromatografiske fraktioner indeholdt uomsat 4-desacetyl-VLB. Efterfølgende fraktioner viste sig at indeholde 4-desacetyl-18'-descarbomethoxy-VLB-

20 C-3-carboxhydrazid (tidligere beskrevet af Neuss et al., Tetrahedron Letters, 1968, 783). De følgende fraktioner, som ved tyndtlags-chromatografi viste sig at indeholde 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid, blev samlet, og opløsningsmidlet blev inddampet i vakuum. Det resulterende

25 faste stof smeltede ved omkring $219-22^\circ\text{C}$ under dekomponering.

30

EKSEMPEL 1Fremstilling af 4-desacetyl-VLB-C-3-N²-ethylidencarboxhydrazid

Et millimol (768 mg) 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid blev opløst i 50 ml methylenchlorid, og der tilsattes 200 mg acetaldehyd. Reaktionsbeholderen blev lukket og hensat ved stuetemperatur natten over. Derefter blev opløsningen indampet, hvilket efterlod et gyldentbrunt amorft pulver, som blev fordelt imellem methylenchlorid og vand til fjernelse af overskydende acetaldehyd. Methylenchlorid-opløsningen blev tørret og indampet til tørhed. Det resulterende gyldenbrune amorfe pulver bestod af 4-desacetyl-VLB-C-3-N²-ethylidencarboxhydrazid med følgende fysiske data:

M.S.: $m/e = 794 (M^+)$
I.R.: $\nu = 1680 \text{ cm}^{-1} (-CON)$
 $1710 \text{ cm}^{-1} (COO)$

EKSEMPEL 2Fremstilling af 4-desacetyl-VLB-C-3-N²-ethylcarboxhydrazid

Produktet fra eksempel 1 blev opløst i 100 ml absolut ethanol, og der tilsattes 500 mg 96% NaBH₄. Reaktionsblandingen blev omrørt natten over ved stuetemperatur. Derpå sattes 1N saltsyre til reaktionsblandingen, indtil opløsningen blev klar. Efter tilsætning af vand blev opløsningen gjort basisk med koncentreret ammoniumhydroxid og ekstraheret to gange med methylenchlorid. Methylenchlorid-extrakterne blev tørret og indampet til tørhed. Det resulterende gyldenbrune amorfe pulver bestod af 4-desacetyl-VLB-C-3-N²-ethylcarboxhydrazid med følgende fysiske karakteristika: Udbytte = 49 mg.

M.S.: $m/e = 796$ (M^+)
I.R.: $\nu = 3460 \text{ cm}^{-1}$ (N-H)
1656 cm^{-1} (CON)
1715 cm^{-1} (COO)

EKSEMPEL 3

Fremstilling af 4-desacetyl-VLB-C-3-N²-methylenidencarboxhydrazid

768 mg 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid blev opløst i 100 ml tetrahydrofuran, og der tilsattes 20 ml 37% formaldehyd i vand. Reaktionsbeholderen blev lukket, og reaktionsblandingen blev omrørt natten over ved stuetemperatur. Den resulterende opløsning blev indampet til en gel, som derefter blev opløst i absolut ethanol. Til denne alkoholopløsning blev sat methylenchlorid, og den resulterende opløsning blev ekstraheret med vand. Methylenchloridopløsningen blev skilt fra, tørret og indampet til tørhed. Det resulterende gyldentbrune, amorf pulver bestod af 4-desacetyl-VLB-C-3-N²-methylenidencarboxhydrazid med følgende fysiske karakteristika:

M.S.: $m/e = 780$ (M^+), 439, 355, 154

I.R.: bredt bånd for carbonylgrupper $\nu = 1650\text{-}1740 \text{ cm}^{-1}$

NMR.: to nye signaler $\delta 4,63$ og $\delta 4,89$

EKSEMPEL 4

Fremstilling af 4-desacetyl-VLB-C-3-N²-isopropylidencarboxhydrazid

400 mg 4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid blev opløst i 25 ml acetone, og reaktionsblandingen blev omrørt i 3 dage i mørke ved stuetemperatur. Ved indampning af den resulterende opløsning opnåedes omkring 400 mg 4-desacetyl-

VBL-C-3-N²-isopropylidencarboxhydrazid med følgende fysiske data:

M.S.: $m/e = 808 (M^+)$, 822, 836, 777, 750, 751, 467, 355,
154, 124
I.R. (CHCl_3): $\nu = 1730 \text{ cm}^{-1}$ ($-\text{COOCH}_3$)
1710 cm^{-1} ($-\text{N}=\text{C}-$)
1685 cm^{-1} ($-\text{COONH}-$)

Forbindelserne med formel I virker inhiberende på væksten af transplanterede tumorer hos mus, og/eller de forlænger levetiden for mus, der er podet med tumorer. Aktiviteten af de omhandlede forbindelser blev eftervist ved at indgive disse til mus, normalt ad intraperitoneal vej i en bestemt dosering i 7-10 dage. Størrelsen af tumoren blev målt efter 3 eller 7 dage i de tilfælde, hvor den indgivne forbindelse virkede inhiberende på tumorens vækst. I de tilfælde, hvor den livsforlængende virkning blev undersøgt bestemtes den ekstra levetid af de behandlede dyr i forhold til kontroldyrene. I den efterfølgende tabel I er anført resultaterne af de udførte forsøg, i hvilke mus med transplanterede tumorer blev vellykket behandlet med en forbindelse med formel I. Kolonne 1 i tabellen giver navnet på den undersøgte forbindelse, kolonne 2 angiver arten af den transplanterede tumor, kolonne 3 angiver dosisniveauet og det antal dage, hvor doseringen blev indgivet, og kolonne 4 angiver den procentvise inhibering af tumorvæksten eller den procentvise forlængelse af overlevelsestiden (ROS er en forkortelse for Ridgeway's osteogene sarcoma; GLS for Gardner's lymphosarcoma og B16 for en melanoma malignum).

TABEL I

<u>Forbindelse</u>	<u>Tumor</u>	<u>Dosis</u> <u>mg/kg x dage</u>	<u>% inhibering eller</u> <u>livsforlængelse</u> <u>3 dage</u>	<u>7 dage</u>
4-desacetyl-VLB-C-3-N ² -ethylcarboxhydrazid	GLS	0,5 x 10 0,25 x 10	toxisk 100 (+)	toxisk toxisk
4-desacetyl-VLB-C-3-N ² -isopropylidencarboxhydrazid	ROS	0,05 x 10 0,1 x 10 0,15 x 10 0,2-0,1 x 10	33 42 74 toxisk	
4-desacetyl-VLB-C-3-N ² -ethylidencarboxhydrazid	GLS	0,4 x 9 0,2 x 9	toxisk 100	
	ROS	0,4 x 9 0,2 x 9	toxisk 100	
4-desacetyl-VLB-C-3-N ² -methylidencarboxhydrazid	GLS	0,5 x 10 0,25 x 10 0,125 x 10	toxisk 100 91	toxisk 100 91
4-desacetyl-VLB-C-3-N ² -isopropylidencarboxhydrazid	ROS	0,15 x 10		74
<u>Sammenligningsforbindelser:</u>				
	<u>Tumor</u>	<u>Dosis</u> <u>mg/kg x dage</u>	<u>% inhibering</u>	
4-desacetyl-VLB-C-3-carboxhydrazid	GLS	0,2-0,6 x 7-10	73 - 100	
4-desacetyl-deoxy-VLB-"B"-C-3-carboxhydrazid	GLS	0,6 x 7	77	

TABEL I (fortsat)

<u>Sammenligningsforbindelser:</u>	<u>Tumor</u>	<u>Dosis</u> <u>mg/kg x dage</u>	<u>% inhibering</u>
4-desacetyl-VLB-C-3- carboxamidsulfat	GLS	0,15-1,0 x 10	79 - 100
4-desacetyl-VLB-C-3-N-		0,4 x 7	36
(3,4-dihydroxyphenylethyl)-		0,2 x 7	16
carboxamidsulfat	GLS	0,1 x 7	10

Som det måtte forventes, afviger de hidtil ukendte hydrazid-derivater med formel I med hensyn til deres anti-tumor-spektrum fra VLB, vincristin og vindesin, såvel som fra C-4-N,N-dialkylglycylesterne af VLB, på samme måde
5 som disse forbindelsers anti-tumor-spektre afviger indbyrdes fra hinanden, idet nogle er mere virksomme over for visse tumorer eller klasser af tumorer og mindre virksomme over for andre. Ved den kliniske anvendelse af en forbindelse med formel I vil lægen imidlertid i første omgang
10 anvende en indgivelsesvej og et bærestof svarende til den kliniske anvendelse af vincristin og VLB, og forbindelsen vil blive anvendt over for samme typer af tumorer som behandles med disse forbindelser. Forskellene i dosishniveau vil naturligvis blive baseret på den relative aktivitet imellem vincristin eller VLB og den nye forbindelse med
15 formel I i den samme eksperimentelle tumor hos mus.

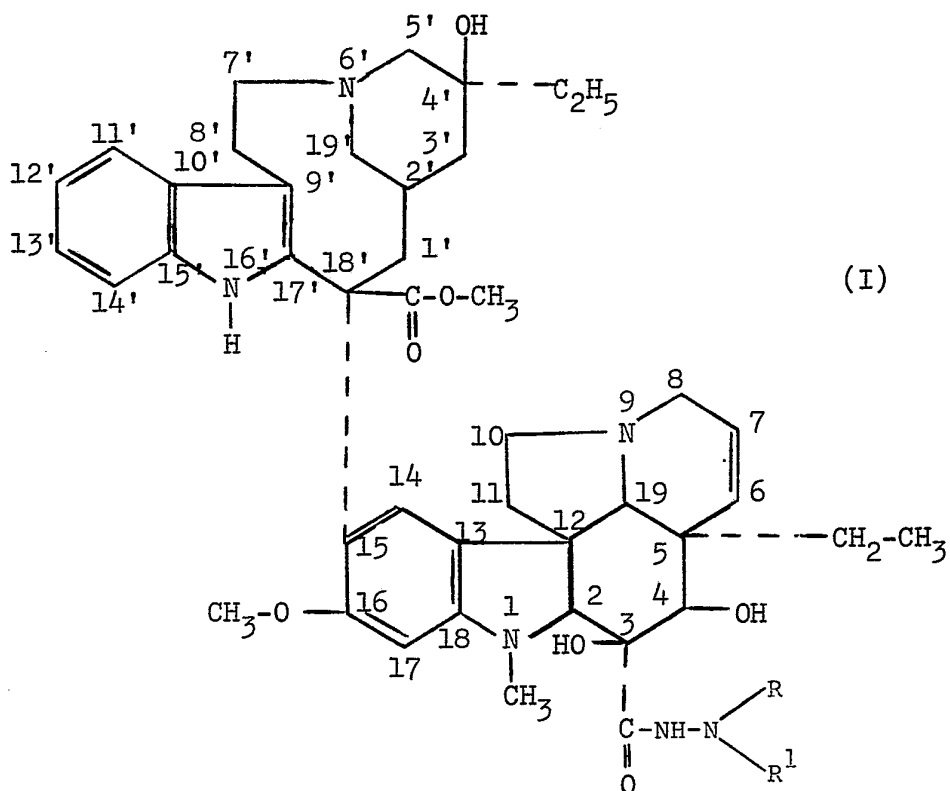
Når hydrazid-derivaterne med formel I anvendes som anti-neoplastiske midler, anvendes den parenterale indgivelsesvej. Til dette formål benyttes isotoniske opløsninger, der
20 indeholder 1-10 mg per ml af en forbindelse med formel I. Forbindelserne indgives i en mængde på mellem 0,01 og 1 mg per kg legemsvægt og fortrinsvis mellem 0,1 og 1 mg per kg legemsvægt 1 eller 2 gange om ugen eller 1 eller 2 gange hver anden uge i afhængighed af såvel aktiviteten som
25 toxiciteten af den pågældende forbindelse. En anden metode til fastsættelse af den terapeutiske dosis baseres på arealet af patientens legemsoverflade, idet der benyttes en mængde på mellem 0,1 og 10 mg per kvadratmeter legemsoverflade hver syvende eller fjortende dag.

30 En klinisk undersøgelse af en forbindelse med formel I kan gennemføres i overensstemmelse med en procedure foreslået af S. K. Carter i et afsnit med overskriften "Study Design Principles for the Clinical Evaluation of New Drugs as Developed by the Chemotherapy Programme of the National Can-

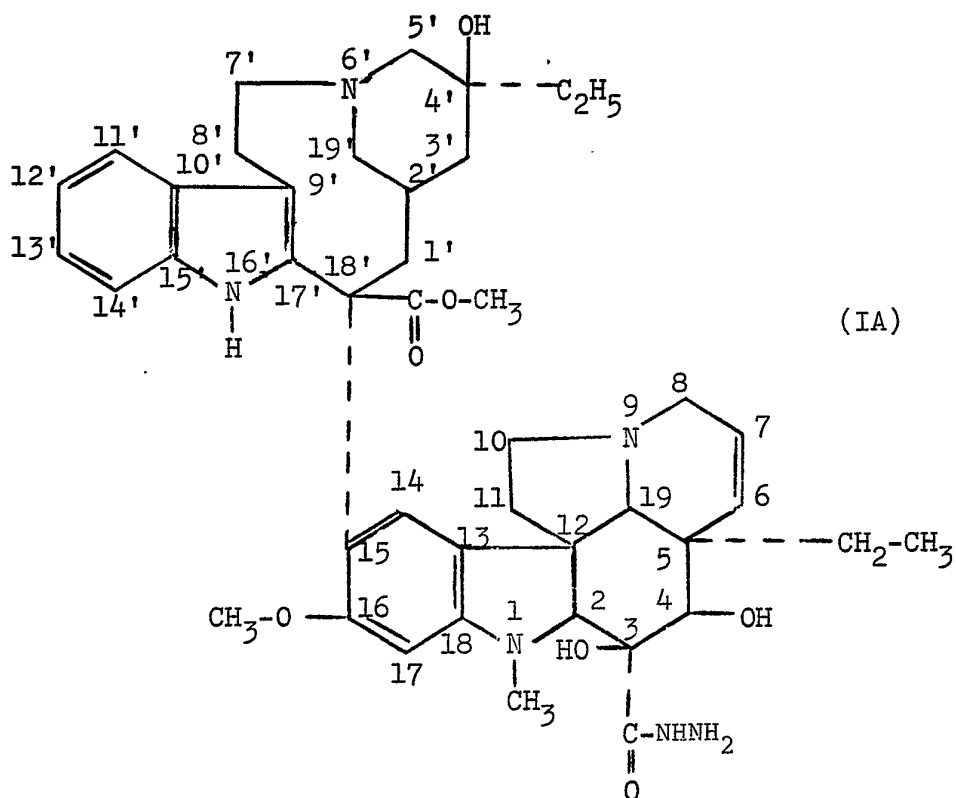
cer Instituet", der findes på side 242-289 i bogen "The Design of Clinical Trials in Cancer Therapy", redigeret af Maurice Staquet (Futura Publishing CO., New York, 1973).

P a t e n t k r a v :

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af derivater af 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-carboxhydrazid med den almene formel:



5 hvori R er alkyl med 1-3 carbonatomer og R^1 er hydrogen, eller hvori R og R^1 tilsammen danner en alkylidengruppe med 1-3 C-atomer, k e n d e t e g n e t v e d , a t m a n omsætter 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-carboxhydrazid med formelen:



i opløsning med formaldehyd, acetaldehyd, acetone eller propionaldehyd, eventuelt efterfulgt af en hydrogenering.

2. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-N²-ethylidencarboxhydrazid, kendet tegn et ved, at man omsætter 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-carboxyhydrazid med acetaldehyd.

3. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-N²-ethylcarboxhydrazid, kendet tegn et ved, at man omsætter 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-carboxhydrazid med acetaldehyd efterfulgt af en hydrogenering.

4. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-N²-methylenidencarboxhydrazid, k e n d e t e g n e t ved, at man omsætter 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-carboxhydrazid med form-
5 aldehyd.

5. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-N²-isopropylidencarboxhydrazid, k e n d e t e g n e t ved, at man omsætter 4-desacetyl-vincaleucoblastin-C-3-carboxhydrazid med
10 acetone.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 1787/74 (patent nr. 141511).