

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144599 B

- (21) Ansøgning nr. 4714/80 (51) Int.Cl.³ C 07 D 519/04
(22) Indleveringsdag 6. nov. 1980
(24) Løbedag 17. jan. 1978
(41) Alm. tilgængelig 6. nov. 1980
(44) Fremlagt 13. apr. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. 224/78
(30) Prioritet 19. jan. 1977, 760595, US 25. nov. 1977, 853979, US

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

(72) Opfinder Gerald Lee Thompson, US.

(74) Fuldmægtig Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard.
-

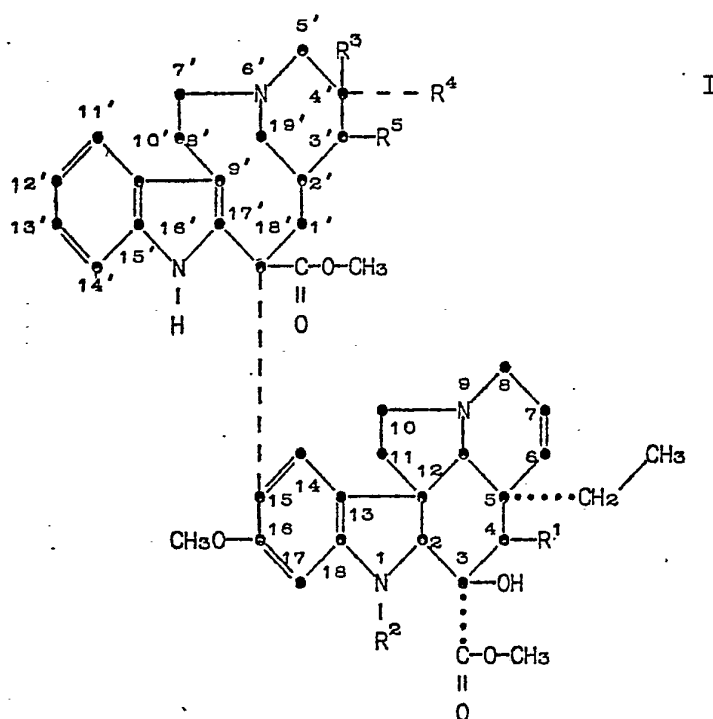
(54) Analogifremgangsmåde til fremstil=
ling af vincaalkaloidderivater og
salte deraf.

DK 144599 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte vincaalkaloidderivater med den i krav 1's indledende del anførte almene formel IV samt farmaceutisk acceptable salte deraf, 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*, er blevet konstateret virkningsfulde ved behandlingen af eksperimentelt fremkaldte maligne tilstande hos dyr. Blandt disse er leurosin (USA patentskrift nr. 3 370 057), vincalukoblastin (vinblastin), som i det følgende betegnes som VLB (USA patentskrift nr. 3 097 137), leurosidin (vinrosidin) og leurocristin (VCR eller vincristin) begge i USA patentskrift nr. 3 205 220, 4'-desoxy-VLB-"A" og "B", Tetrahedron Letters, 783 (1968) (desacetyl-leurosinhydrazid nævnes ligeledes heri); 4-desacetoxy-vinblastin (USA patentskrift nr. 3 954 773); 4-desacetoxy-3'-hydroxyvinblastin (USA patentskrift nr. 3 944 554); leurocolombin (USA patentskrift nr. 3 890 325), leuroformin (N-formylleurosin, se belgisk patentskrift nr. 811 110) og vincadiolin (USA patentskrift nr. 3 887 565). To af disse alkaloider, VLB og leurocristin, markedsføres nu som lægemidler til behandling af maligne tilstande hos mennesker, særligt leukæmierne og hermed beslægtede sygdomme.

De ud fra *Vinca rosea* fremstillede dimere alkaloider kan afbildes ved den almene formel I:



I formel I, hvori R^1 er acetoxy, R^2 er methyl, R^3 er hydroxyl, R^4 er ethyl og R^5 er H, er VLB afbildet; dersom R^1 er acetoxy, R^2 er formyl, R^3 er hydroxyl, R^4 er ethyl og R^5 er H, er vincristin afbildet; dersom R^1 er acetoxy, R^2 er methyl, R^3 er ethyl, R^4 er hydroxyl, og R^5 er H, er leurosidin afbildet; dersom R^1 er acetoxy, R^2 er methyl, R^3 og R^5 er H og R^4 er ethyl, er 4'-desoxy-VLB-"A" afbildet; dersom R^1 , R^2 og R^5 er det samme som i 4'-desoxy-VLB-"A", men R^3 er ethyl, og R^4 er hydrogen, er 4'-desoxy-VLB-"B" afbildet; og dersom R^1 er acetoxy, R^2 er methyl, R^3 er ethyl, og R^4 og R^5 taget under et danner en α -epoxidring, er leurosine afbildet.

Af ovennævnte alkaloider er vincristin det mest anvendelige og samtidig det, der i den mindste udstrækning kan udvindes fra Vinca. Jovanovics et al, USA patentskrift nr. 3 899 493, har fornylig udviklet en oxidativ metode til omdannelse af det forholdsvis mere rigeligt forekommende VLB til vincristin ved chromsyre-oxidation ved lave

temperaturer (-60°C). I vinca-alkaloidfraktionen indeholdende dimere indol-dihydroindoler er der andre forholdsvist rigeligt forekommende alkaloider såsom leurosin, og det ville være ønskværdigt at omdanne disse direkte eller indirekte til vincristin eller til et lægemiddel med tilsvarende svulst-nedbrydende virkning. Det er velkendt, at leurosin kan omdannes til 4'-desoxy-VLB-"B" (sammen med vekslende mængder 4'-desoxy-VLB-"A") ved behandling med Raney-nikkel under tilbagesvaling i absolut ethanol, se Neuss, Gorman, Cone og Huckstep, Tetrahedron Letters 783-787 (1968). Medens leurosin udviste svulst-nedbrydende virkning overfor eksperimentelt fremkaldte tumorer hos dyr, var den kliniske respons begrænset. 4'-desoxy-VLB-"A" og 4'-desoxy-VLB-"B" blev anført som manglende reproducerbar virkning overfor eksperimentelt fremkaldte tumorer hos mus.

Det har nu vist sig, at de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ud fra 4'-desoxy-VLB-"A" og "B" eller disses l-formylderivater opnåede forbindelser med formlen IV til forskel fra 4'-desoxy-VLB-"A" og "B" har svulst-nedbrydende virkning og derved kan finde anvendelse som lægemidler som beskrevet nedenfor.

En forbindelse med den almene formel I, hvori R^4 er ethyl, R^1 er acetoxy, R^2 er CHO, og R^3 og R^5 er hydrogen, betegnes som 4'-desoxy-vincristin; en forbindelse, hvori R^1 er hydroxy, medens de andre grupper er de samme, betegnes som 4'-desoxy-4-desacetyl-vincristin. Eftersom man ikke kender det til vincristin svarende alkaloid som har den modsatte konfiguration af hydrogen og ethyl ved 4'-carbonatomet, vil sådanne forbindelser, hvori R^3 er ethyl og R^4 er hydrogen, blive benævnt under henvisning til forbindelsen leurosidin, som har den samme konfiguration ved 4'-carbonatomet som 4'-desoxy-VLB-"B", og de vil blive benævnt som derivater af l-formylleurosidin; f.eks. 4-desoxy-l-formylleurosidin (eller 4'-desoxyepivincristin)

og 4'-desoxy-4-desacetyl-1-formylleurosidin, hvor R¹ er henholdsvis acetoxy og hydroxy. I hvert af de ovenfor anførte navne skal det underforstås, at 1-methylgruppen i leurosidin er blevet erstattet af en formylgruppe,
5 og at betegnelsen "1-desmethyl" er blevet udeladt for at simplificere nomenklaturen.

Ikke-toxiske syrer, der er anvendelige til dannelse af farmaceutisk acceptable syreadditionssalte af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen, omfatter salte afledt fra uorganiske syrer såsom:
10

saltsyre, salpetersyre, phosphorsyre, svovlsyre, hydrogenbromidsyre, hydrogeniodidsyre, salpetersyrerling, phosphorsyrerling og lignende, såvel som salte af ikke-toxiske organiske syrer omfattende alifatiske mono- og dicarboxylsyrer, phenylsubstituerede alkancarboxylsyre, hydroxyalkancarboxylsyre, alkandicarboxylsyre, aromatiske syre, alifatiske og aromatiske sulfonsyre, etc. Sådanne farmaceutisk acceptable salte omfatter således sulfat, pyrosulfat, hydrogensulfat, sulfit, hydrogensulfit, nitrat, phosphat, monohydrogenphosphat, dihydrogenphosphat, metaphosphat, pyrophosphat, chlorid, bromid, iodid, acetat, propionat, decanoat, caprylat, acrylat, formiat, isobutyrat, caprat, heptanoat, propionat, oxalat, malonat, succinat, suberat, sebacat, fumarat, maleat, benzoat, chlorbenzoat, methylbenzoat, dinitrobenzoat, hydroxybenzoat, methoxybenzoat, phthalat, terephthalat, benzensulfonat, toluensulfonat, chlorbensensulfonat, xylensulfonat, phenylacetat, phenylpropionat, phenylbutyrat, citrat, lactat, 2-hydroxybutyrat, glycolat, malat, tartrat, methansulfonat, propansulfonat, naphthalen-1-sulfonat, naphthalen-2-sulfonat og lignende salte.
15
20
25
30

4'-desoxy-VLB-"A" og "B" eller deres 1-formyl-derivater hydrolyseres til de tilsvarende 4-desacetyl-derivater under sure eller alkaliske reaktionsbetingelser.

Den foretrukne metode til gennemførelse af ovennævnte hydrolyseomsætning anvender natriumcarbonat i methanol ved tilbagesvalingstemperatur. Hydrazinhydrat kan anvendes. Andre baser, som kan anvendes, omfatter kalium-
5 t-butoxid, natrium- eller kaliummethoxid eller -ethoxid, pyridin, triethylamin (eller andre tertiære aminer), urinstof og lignende i polære, organiske opløsningsmidler såsom de lavere alkanoler. Fortyndet natrium- og kaliumhydroxid kan også anvendes, f.eks. i methanol, men forholdesregler må tages for ikke at arbejde med base-koncentrationer eller reaktionstemperaturer, ved hvilke andre
10 hydrolyserbare grupper i 4'-desoxyvincristin eller 4'-desoxy-1-formylleurosidin påvirkes. Baser, der kun er virksomme i ikke-polære opløsningsmidler, kan også anvendes;
15 eksempelvis natrium eller lithiumhydroxid i benzen, ether, tetrahydrofuran, etc., eller natriumsaltet af dimethyl-sulfoxid i DMSO. Man kan anvende temperaturer varierende fra stuetemperatur (25°C) til kogepunktet af det anvendte opløsningsmiddel. På den anden side kan hydrolysen udføres under sure reaktionsbetingelser, f.eks. i
20 absolut methanol mættet med vandfri hydrogenchlorid ved 0°C.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere ved de efterfølgende eksempler.

25 EKSEMPEL 1

Fremstilling af 4'-desoxy-4-desacetyl-1-formylleurosidin

Ca. 744 mg 4'-desoxy-1-formylleurosidin blandes med 10 ml vandfri methanol, og blandingen opvarmes til tilbagesvalingstemperatur, ved hvilken temperatur forbindelsen
30 opløses til klar opløsning. 200 mg fast natriumcarbonat tilsættes, og reaktionsblandingen holdes under omrøring i ca. 7,2 timer, på hvilket tidspunkt TLC af de ubehandlede reaktionskomponenter viser, at praktisk talt al 4'-desoxy-1-formylleurosidin er forsvundet. Opløs-

ningsmidlet fjernes ved afdampning, og inddampningsresten indeholdende 4'-desoxy-4-desacetyl-1-formylleurosidin, som er dannet ved den ovenfor beskrevne omsætning, fordeles mellem vand og methylenchlorid. Det organiske lag fraskilles og tørres, og opløsningsmidlet fjernes ved afdampning, hvilket fører til 506 mg af et hvidt faststof, som i det store hele består af rent 4'-desoxy-4-desacetyl-1-formylleurosidin.

Forbindelsen udviser følgende fysiske karakteristika:

- 10 Massespektrum: m/e 766 (M^+), 764, 735, 254, 252, 205, 138.
 IR spektrum: ν (CHCl_3), 3450, 1734, 1680, 1596, 1495, 1456, 1434 cm^{-1} .
 100 MHz NMR spektrum: (CDCl_3) omfatter N-formyl ved 0,8:80, methyl-enkeltbånd ved 3,89 ($\text{C}_{16}\text{-OCH}_3$) og 3,66 ($\text{C}_{18}\text{-CO}_2\text{CH}_3$),
 15 brede multipelbånd ved 3,82 ($\text{C}_3\text{-CO}_2\text{CH}_3$), og ingen N- CH_3 omkring 2,75 (eller OCOCH_3 omkring 2,06).

Det tilsvarende sulfatsalt dannes ved anvendelse af acetone som opløsningsmiddel og 0,26 ml 2% svovlsyre i ethanol. Andre opløsningsmidler kan anvendes, og man foretrækker at anvende et opløsningsmiddel, i hvilket basen er letopløselig, men hvori sulfatsaltet er stort set uopløseligt.

4'-desoxy-4-desacetylvincristin og dets sulfatsalt fremstilles på fuldstændig analog måde ud fra 4'-desoxyvincristin.

EKSEMPEL 2

Fremstilling af 4'-desoxy-4-desacetyl-leurosidin

Man fremstillede en reaktionsblanding indeholdende 1,48 g 4'-desoxy-VLB-"B", 1 g natriumcarbonat og 100 ml methanol, og man opvarmede til tilbagesvaling under nitrogenatmos-

fære. Tyndslagschromatografi på en repræsentativ prøve taget efter to timers forløb angav, at hydrolyseomsætningen til fjernelse af 4-acetylgruppen var omtrent halv gennemført. reaktionsblandingen blev, efter at den havde
5 stået natten over ved stuetemperatur, opvarmet igen til tilbagesvalingstemperatur i 8 1/2 time. Tyndtlagschromatografering af en repræsentativ prøve under anvendelse af et 20:1:1:1 ether/diethylamin/toluen/methanol-opløsningsmiddelsystem angav, at reaktionen var blevet helt
10 gennemført. Opløsningsmidlet blev fjernet fra reaktionsblandingen ved afdampning, og den derved opståede indampningsrest blev opløst i en blanding af methylenchlorid og vand. Methylenchloridfasen blev frasepareret og tørret. Afdampning af methylenchloridet førte til en ind-
15 dampningsrest, som ved TLC viste sig at indeholde en særdeles polær forbindelse plus den forventede 4'-desoxy-4-desacetylleurosidin. Inddampningsresten, som vejede 1,33 g, blev opløst i benzen. Det stærkt polære materiale var stort set uopløseligt i benzen, og blev fraskilt ved
20 filtrering. Filtratet blev inddampet til tørhed, og indampningsresten, som vejede 500 mg, blev chromatograferet på Woelm silicagel under anvendelse af et 20:1:1 ether/diethylamin/toluen-opløsningsmiddelsystem (med stigende indhold af methanol) som elugeringsmiddel. Chro-
25 matograferingens forløb blev fulgt ved tyndtlagschromatografi, og fraktioner, som viste sig at indeholde 4'-desoxy-4-desacetylleurosidin, blev samlet og førte til 348 mg base efter afdampning af opløsningsmidlet. Inddampningsresten blev behandlet med 1,28 ml 2% svovlsyre
30 i methanol (0,36 mol), og den derved opnåede opløsning blev filtreret, hvilket førte til 315 mg 4'-desoxy-4-desacetylleurosidinsulfat.

4'-desoxy-4-desacetylleurosidin udviste følgende fysiske karakteristika:

Massespektrum: m/e 752 (M^+), 750, 693, 691, 555, 338, 240, 138.

IR spektrum: ν (CHCl_3) 3455, 1724, 1610, 1497, 1457, 1431 cm^{-1} .

100 MHz NMR spektrum: δ CDCl_3 9,43 (br s, 1, $\text{C}_3\text{-OH}$), 7,92
 5 (brs, 1, indol N-H), 7,47-7,63 (m, 1, $\text{C}_{11}\text{-H}$), 7,06-7,31
 (m, 3, $\text{C}_{12,14}\text{-H}$), 6,58 (s, 1, $\text{C}_{14}\text{-H}$), 6,10 (s, 1, $\text{C}_{17}\text{-H}$),
 5,78-5,87 (m, 2, $\text{C}_{6,7}\text{-H}$), 4,10 (m, 1, $\text{C}_4\text{-H}$), 3,83 (s, 3,
 $\text{C}_{16}\text{-OCH}_3$), 3,78 (s, 3, $\text{C}_3\text{-CO}_2\text{CH}_3$), 3,70 (s, 1, $\text{C}_2\text{-H}$), 3,58
 10 (s, 3, $\text{C}_{18}\text{-CO}_2\text{CH}_3$), 2,75 (s, 3, N-CH_3), 0,76-1,06 (m, 6,
 $\text{C}_{21,21}\text{-H}$).

Forbindelserne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse, som kan afbildes ved ovennævnte formel IV er kraftigere anti-tumormidler. Ved påvisningen af disse midlers virkning imod i mus transplanterede tumorer blev anvendt
 15 en fremgangsmåde, som indebar intraperitoneal indgivning af midlet ved et fastlagt doseringsniveau i 7 til 10 dage efter indpodningen af tumoren, eller alternativt på den første, femte og niende dag efter indpodningen.

20 Tabel 1 viser resultaterne af et antal eksperimenter, i hvilke transplanterede tumorer hos mus blev behandlet med held med en forbindelse fremstillet ifølge opfindelsen.

I tabellen viser kolonne 1 forbindelsens navn, kolonne 2 den transplanterede tumor, kolonne 3 doseringsniveauet, eller doseringsniveauområdet samt antallet af dage, i
 25 hvilket doseringen blev indgivet; kolonne 4 indgivningsmetoden, og kolonne 5 den procentvise inhibering af tumurvæksten eller den procentvise forlængelse af overlevelsestiden, f.eks. for B16. (ROS er en forkortelse for Ridgeways osteogeniske sarcom; GLS for Gardner Lympho-
 30 sarcom; P1534 (J) L1210 er leukæmier; CA755 er en adenocarcinom; og B16 er et melanom).

Tabel I

<u>Forbindelse</u>	<u>Tumor</u>	<u>mg/kg x dage</u>	<u>Indgivelsesvej</u>	Procentvis hæmning eller forlængelse af <u>overlevelsestiden</u>
4'-desoxy-4-desacetyl- 1-desmethyl-1-formyl leurosidinsulfat	B16 GLS	0,15-0,6 x 3 0,6 x 3 0,25-0,40 x 3 0,18 x 3	"	31-62++ Toksisk 94-100 95
4'-desoxy-4-desacetyl- leurosidinsulfat	755	0,6 x 3 0,4 x 3 0,25 x 3	" " "	Toksisk 37 32
	B16	0,6 x 3 0,3 x 3 0,15 x 3	" " "	Toksisk++ 103++ 77++
	GLS	0,9 x 3 0,6 x 3 0,4 x 3	" " "	Toksisk 63 Toksisk

+ 1 eller flere langtidsoverlevende

++ Forsinket behandling: doseret 5^{te}, 9^{ende} og 13^{ende} dag.

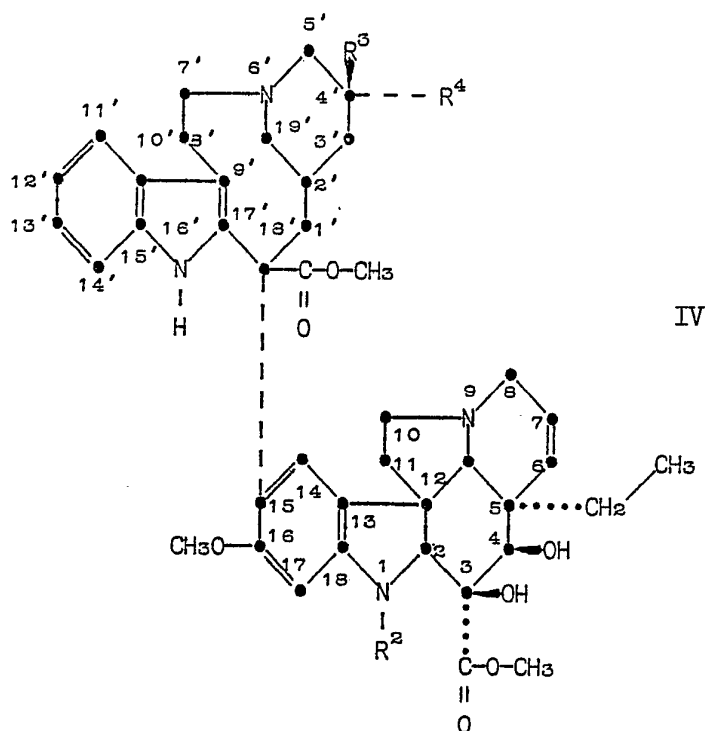
Ved anvendelsen af de omhandlede hidtil ukendte forbindelser som anti-tumormidler kan man indgive dem enten parenteralt eller peroralt. Ved peroraldosering blandes en passende mængde af et farmaceutisk acceptabelt salt af en base dannet med en ikke-toxisk syre, såsom sulfatsaltet med stivelse eller en anden excipiens, og blandingen fyldes på teleskopiske gelatinekapsler hver indeholdende mellem 7,5 og 50 mg aktive bestanddele. Tilsvarende kan det anti-neoplastisk virksomme salt blandes med stivelse, et bindemiddel og et smøremiddel, og blandingen kan slås til tabletter hver indeholdende fra 7,5 til 50 mg salt. Tabletterne kan forsynes med delekærv, dersom mindre eller partielle doseringer skal anvendes. Parenteral indgivning foretrækkes imidlertid. Til dette formål anvendes isotoniske opløsninger indeholdende 1-10 mg/ml salt såsom sulfatsaltet. Forbindelserne indgives i et omfang svarende til fra 0,1 til 1 mg/kg, fortrinsvis fra 0,1 til 1 mg/kg, dyrelegemsvægt en eller to gange om ugen eller hveranden dag afhængig af såvel midlets aktivitet som dets toxicitet. En alternativ metode til fastlæggelse af den terapeutiske dosering er baseret på legemsoverfladearealet, og består i dosering af mellem 0,1 og 10 mg/m² dyrelegemsoverflade hver syvende eller hver fjortende dag.

Ved klinisk anvendelse af en forbindelse fremstillet ifølge opfindelsen vil den behandlende læge i begyndelsen indgive forbindelsen på samme måde og i samme medium og sandsynligvis imod de samme tumortyper, som er anvist for vincristin eller VLB. De anvendte doseringsniveauer ville være udtryk for forskellen i doseringsniveau fundet ved behandlingen af eksperimentalt fremkaldte tumorer hos mus, idet doseringsniveauerne for forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen er betydeligt lavere, end de, der anvendes med vincristin og VLB. Som det er tilfældet ved andre anti-tumormidler, vil man ved kliniske afprøvningsninger være særlig opmærksom på den onkolytiske (svulst-

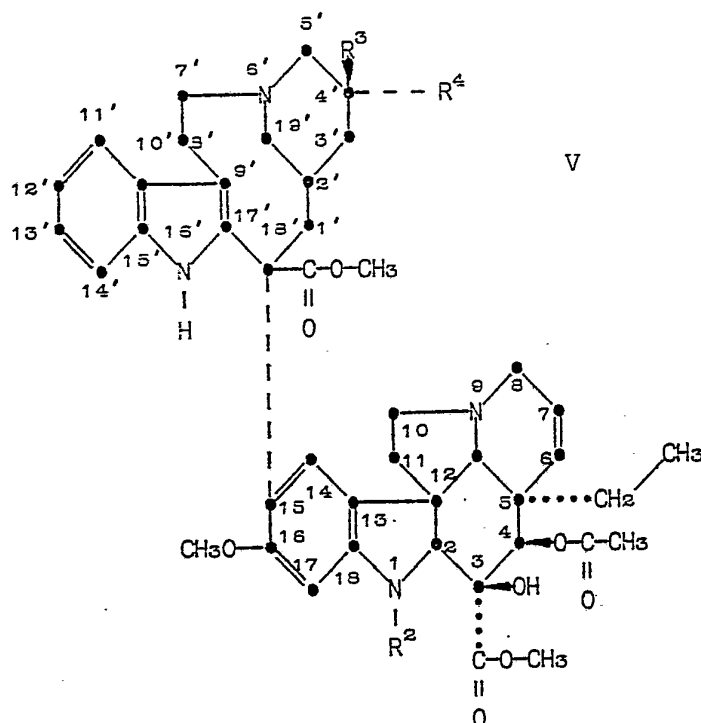
fjernende) virkning af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen overfor de ti anførte "indikator"-tumorer, som er anført på side 266 i "The Design of Clinical Trials in Cancer Therapy", redigeret af Staquet (Futura Publishing Company, 1973).

P a t e n t k r a v :

I. Analogifremgangsmåde til fremstilling af vincaalkaloid-derivater med den almene formel IV



hvor R^2 er CH_3 eller CHO ; og hvori den ene af grupperne R^3 og R^4 er H og den anden er C_2H_5 ; samt farmaceutisk acceptable salte deraf, k e n d e - t e g n e t ved, at man i en reaktionsblanding hydrolyserer et vincaalkaloidderivat med den almene formel V



hvor R^2 , R^3 og R^4 har den ovenfor anførte betydning, og udvinder den frie 4-desacetylbase eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
5 ved, at man hydrolyserer med natriumcarbonat.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g-
n e t ved, at man gennemfører hydrolysen i vandfrit
methanol.

10 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1-3 til fremstilling af 4'-
desoxy-4-desacetyl-l-formyl-leurosidin, k e n d e t e g-
n e t ved, at man hydrolyserer 4'-desoxy-l-formylleuro-
sidin med natriumcarbonat i vandfrit methanol.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4 til fremstilling af 4'-desoxy-4-desacetyl-1-formyl-leurosidinsulfat, k e n d e t e g n e t ved, at man i vandfrit methanol hydrolyserer 4'-desoxy-1-formyl-leurosidin med natriumcarbonat og udvinder produktet som sulfatsaltet.
- 5
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1-3 til fremstilling af 4'-desoxy-4-desacetyl-leurosidin, k e n d e t e g n e t ved, at man i vandfrit methanol hydrolyserer 4'-desoxy-VLB-"B" med natriumcarbonat.
- 10
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6 til fremstilling af 4'-desoxy-4-desacetyl-leurosidinsulfat, k e n d e t e g n e t ved, at man i vandfrit methanol hydrolyserer 4'-desoxy-VLB-"B" med natriumcarbonat og udvinder produktet som sulfatsaltet.

Fremdragne publikationer:

DE offentliggørelsesskrift nr. 2558027.