



⑫ A Terinzagelegging ⑪ 8600432

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 Kristallijne vorm van
7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan en
werkwijze voor het bereiden daarvan.
- ⑤1 Int.Cl⁴: C07D 417/12, A61K 31/40.
- ⑦1 Aanvrager: Bristol-Myers Company te New York, New York, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

- ②1 Aanvraag Nr. 8600432.
- ②2 Ingediend 20 februari 1986.
- ③2 Voorrang vanaf 21 februari 1985.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 703778 .
- ⑥2 - -

- ④3 Ter inzage gelegd 16 september 1986.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

VO 8004

Kristallijne vorm van 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan en werkwijze voor het bereiden daarvan.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een nieuwe, kristallijne vorm van 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan dat zelfs bij temperaturen tot 100°C stabiel is.

Mitomycine C is een anti-bioticum dat geproduceerd wordt door fermentatie en momenteel onder goedkeuring van de Food and Drug Administration te koop is voor de therapie van uitgezaaide adenocarcinoma van de maag of pancreas in zich bewezen hebbende combinaties met andere goedgekeurde chemotherapeutische middelen en als palliatieve behandeling wanneer andere modaliteiten gefaald hebben (Mutamycin[®] Bristol Laboratories, Syracuse, New York 13201, Physicians' Desk Reference 38ste Editie, 1984, blz. 750). Mitomycine C en zijn produktie door fermentatie vormen het onderwerp van het Amerikaanse octrooischrift No. 3.660.578 dat op 2 mei 1972 is verleend onder inroeping van voorrang uit eerdere aanvragen met inbegrip van een in Japan op 6 april 1957 ingediende aanvraag.

De structuren van de mitomycines A, B, C en van porfiromycine zijn voor het eerst gepubliceerd door J.S. Webb et al van Lederle Laboratories Divison American Cyanamid Company, J. Amer. Chem. Soc. 84, 3185 - 3187 (1962). Een van de chemische transformaties, die gebruikt zijn in deze structuurstudie om mitomycine A en mitomycine C met elkaar in verband te brengen, was de omzetting van de eerstgenoemde verbinding 7,9a-dimethoxymitosaan, door een reactie met ammoniak in de laatstgenoemde verbinding, 7-amino-9a-methoxymitosaan. Verdringing van de 7-methoxygroep van mitomycine A is een reactie van aanzienlijk belang gebleken in de bereiding van anti-tumorwerkzame derivaten van mitomycine C. De volgende artikelen en octrooischriften hebben elk betrekking op de omzetting van mitomycine A in een 7-gesubstitueerd aminomitomycine C derivaat met anti-tumorwerkzaamheid.

Matsui et al "The Journal of Antibiotics", XXI, 189 - 198 (1968)
Kinoshita et al "J. Med. Chem." 14, 103 - 109 (1971)
Iyengar et al "J. Med. Chem." 24, 975 - 981 (1981)
Iyengar, Sami, Remers, en Bradner, Abstracts of
Papers - Annual Meeting of the American Chemical Society,
Las Vegas, Nevada, March 1982, Abstract No. MEDI 72.
Sasaki, et al Internat. J. Pharm., 1983, 15, 49.

De volgende octrooischriften hebben betrekking op de bereiding van 7-gesubstitueerde aminomitosaan derivaten door een reactie van mitomycine A, mitomycine B, of een N^{1a}-gesubstitueerd derivaat daarvan met een primair of secundair amine:

- 5 Cosulich et al, Amerikaans octrooi 3.332.944 van 25 juli 1967
Matsui et al, Amerikaans octrooi 3.420.846 van 7 januari 1969
Matsui et al, Amerikaans octrooi 3.450.705 van 17 juni 1969
Matsui et al, Amerikaans octrooi 3.514.452 van 26 mei 1970
10 Nakano et al, Amerikaans octrooi 4.231.936 van 4 november 1980
Remers, Amerikaans octrooi 4.268.676 van 19 mei 1981

Mitomycine C derivaten met een gesubstitueerde amino-substituent op de 7-positie zijn ook bereid door gerichte biosynthese, dat wil zeggen door toevoeging aan fermentatievloeistoffen van een reeks primaire amines, en uitvoering van de conventionele mitomycinefermentatie (C. A. Claridge et al Abst. of the Annual Meeting of Amer. Soc. for Microbiology 1982. Abs. 028).

In het Belgische octrooischrift 896.963 waarvan de inhoud hier door verwijzing opgenomen moet worden geacht, wordt een nieuwe groep beschreven van monoguanidino, of mono- en bis-amidino-analoga van mitomycine C waarin het 7-aminostikstofatoom en/of het N¹⁰ carbamoyl-stikstofatoom van mitomycine C deel uitmaken van een amidino substituent of het 7-aminostikstofatoom deel uitmaakt van een guanidinogroep. Een van die verbindingen, bereid zoals beschreven in de voorbeelden 8 en 15 van dat octrooischrift, is de verbinding 7-(dimethylaminomethyleen) amino-9a-methoxymitosaan met de structuur volgens formule 1. Deze verbinding, verkregen als een amorfe vaste stof, heeft een hoge activiteit tegen P-388 muizen-leukemie, welke die van mitomycine C zowel in termen van maximum effect als van mg-sterkte (vergelijkende doseringsgrootten voor equivalente effecten) overschrijdt. Het is echter in het algemeen bij 25 - 56°C instabiel.

Thans is een kristallijne vorm van 7-(dimethylaminomethyleen) amino-9a-methoxymitosaan gevonden die zelfs bij temperaturen tot 100°C gedurende 6 dagen of langer stabiel is. Het heeft een infra-rood spectrum zoals getoond in fig. 1 en bezit een aanzienlijk grotere bewaarstabiliteit dan amorf 7-(dimethylaminomethyleen) amino-9a-methoxymitosaan.

Amorf 7-(dimethylaminomethyleen) amino-9a-methoxymitosaan wordt bereid volgens de procedures van de voorbeelden 8 en 15 van het Bel-

gische octrooischrift 896.963. Deze procedures worden onderstaand beschreven.

Procedure van voorbeeld 8 van het Belgische octrooischrift 896.963.

Verbinding I, 7-[(dimethylamino)methyleen]amino-N¹⁰-(dimethyl-
5 amino)methyleen-9a-methoxymitosaan werd als volgt bereid:

Aan een suspensie van 500 mg (1,50 mM) mitomycine C in 25 ml
chloroform werd in totaal 9,6 ml (2,4 ml porties na 0, 18, 21 en 23
uur) N,N-dimethylformamidedimethylacetaal toegevoegd en de suspensie
werd gedurende 41 uur bij ongeveer 50°C geroerd. Na verdamping van het
10 oplosmiddel en overmaat reagens onder verminderde druk, werd een donker-
groen residu verkregen; tlc (methyleenchloride/methanol 20 : 1) liet
zien dat mitomycine C afwezig was en toonde de aanwezigheid van twee
nieuwe groene componenten (Rf = 0,16 en 0,22). De belangrijkste component
(Rf = 0,16) werd geïsoleerd door flash chromatografie; (gebruik makend
15 van methyleenchloride/methanol 20 : 1 als eluens) in de vorm van een
groene vaste stof (340 mg, 51,5 %), die na oplossen in diëthylether,
gevolgd door een toevoeging van hexaan, verbinding I gaf in de vorm
van een donkergroen amorf poeder.

NMR (pyridine d₅, δ): 2,18 (s, 3H), 2,70 (bs, 1H), 2,76
20 (s, 3H), 2,82 (s, 3H), 2,86 (s, 6H), 3,22 (s, 3H), 3,30
(bs, 1H), 3,60 (d, J=12Hz), 4,12 (dd, 1H, J=10, 4Hz),
4,43 (d, 1H, J=12Hz), 4,90 (bs, 1H), 5,10 (t, 1H, J=10Hz),
5,52 (dd, 1H, J=10, 4Hz), 7,85 (s, 1H), 8,64 (s, 1H),

25 IR(KBr) ν_{max}, cm⁻¹: 3300, 2930, 1675, 1620, 1545, 1230, 1060

UV(H₂O) λ_{max}, nm: 390 en 244

Analyse: berekend voor C₂₁H₂₈N₆O₅: C: 56,71; H: 6,08;
30 N: 18,90

Gevonden: C: 56,20; H: 6,28; N: 17,88

7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan (II) werd als
volgt bereid:

35 Aan verbinding I (600 mg, 1,35 mM) opgelost in 10 ml methanol,
werd 2,2 ml, 10,8 mM aminodifenylmethaan toegevoegd en de verkregen

oplossing werd gedurende 4 uur bij 54°C geroerd. De voortgang van de reactie werd gevolgd met tlc (methyleenchloride/methanol 90 : 10). Na 4 uur was het uitgangsmateriaal ($R_f = 0,35$) verdwenen en was in de plaats daarvan een overheersende nieuwe groene zone ($R_f = 0,29$) verschenen. De oplossing werd onder verminderde druk geconcentreerd en de verkregen siroop werd aan flash chromatografie onderworpen (25 g silica-gel) waarbij als eluens methyleenchloride/methanol 20 : 1 werd toegepast. Fracties die de groene component ($R_f = 0,29$) bevatten, werden samengebracht, boven Na_2SO_4 gedroogd en geconcentreerd. Verbinding II werd verkregen als een amorfe vaste stof (215 mg, 41 %).

NMR (pyridine d_5 , δ): 2,18 (s, 3H), 2,70 (bs, 1H), 2,80 (s, 3H), 2,88 (s, 3H), 3,08 (bs, 1H), 3,24 (s, 3H), 3,56 (bd, 1H, $J=12\text{Hz}$), 4,00 (dd, 1H), 4,44 (d, 1H, $J=12\text{Hz}$), 5,06 (t, 1H, $J=10\text{Hz}$), 5,56 (dd, 1H, $J=10, 4\text{Hz}$), 7,58 (bs, 2H), 7,88 (s, 1H).

IR (KBr) ν_{max} , cm^{-1} : 3300 - 3450, 2960 - 2910, 1715, 1620, 1535, 1050

UV (H_2O) λ_{max} , nm: 390 en 226

Analyse: berekend voor $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5$: C: 55,48; H: 5,91;
N: 17,98

Gevonden: C: 54,83; H: 5,67; N: 16,90

25

Procedure van voorbeeld 15 van het Belgische octrooischrift 896.963.

Een 0,5 M oplossing van N,N-dimethylchloromethyleeniminiumchloride werd bereid door druppelsgewijze toevoeging van 1,57 g, 12,5 mmol oxalylchloride bij 0°C aan een oplossing van 915 mg, 12,5 mmol dimethylformamide in 25 ml CHCl_3 , gevolgd door 30 minuten roeren bij kamertemperatuur. Afzonderlijk daarvan werd een oplossing van 334 mg, 1 mmol mitomycine C in 5 ml dimethylformamide toegevoegd aan een suspensie van 36 mg, 1,5 mmol NaH in 3 ml dimethylformamide. De oplossing werd gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur geroerd en tot -40 à -50°C afgekoeld en de bovenstaand vermelde oplossing van N,N-dimethylchloromethyleeniminiumchloride (3 ml, 1,5 mmol) werd daarna toegevoegd.

5

10

25

25

30

35

Dit materiaal bleek een infra-rood spectogram te hebben zoals in de figuur wordt getoond. Het infra-rood spectrum werd opgenomen met een monster in een geperste kaliumbromideschijf. Een NMR spectrum werd bepaald bij 90 MHz voor protonen (^1H NMR). Het NMR spectrum had de volgende J-waarden:

	<u>ppm δ</u>	<u>beschrijving</u>	<u>integraal</u>	<u>toegeschreven aan</u>
	1,86	Singlet	3	CH_3 
10	2,73	Doublet van doubletten ($J=1,8$ Hz; 4,4 Hz)	1	C_2H
	2,83	Doublet ($J=4,4$ Hz)	1	C_1H
	2,97	Singlet	3	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$
15	3,01	Singlet	3	
	3,14	Singlet	3	OCH_3
	3,43	Doublet van doubletten ($J=1,8$ Hz; $J=12,8$ Hz)	1	C_3H
	3,54	Doublet van doubletten ($J=4,4$ Hz; $J=10,7$ Hz)	1	C_9H
20	4,10	Doublet ($J=12,8$ Hz)	1	C_3H
	4,42	Triplet ($J=10,7$ Hz)	1	CH_2O
25	4,69	Doublet van doubletten ($J=4,4$ Hz; $J=10,7$ Hz)	1	
	4,76	breed singlet	2	
30	7,21	oplosmiddel singlet (CHCl_3)		NH_2
	7,62	Singlet	1	$\text{H}-\text{C}=\text{N}$

Een ultraviolet spectrum, opgenomen aan een oplossing van 0,01625 g van het materiaal per liter methanol, had de volgende eigenschappen:

<u>λ_{max} (nm)</u>	<u>Absorptiviteit (a)</u>	<u>molaire Absorptiviteit (ϵ)</u>	<u>Log (ϵ)</u>
232	47,8	18610	4,27
386	43,0	16740	4,22

5

Voorbeeld II.

Men suspendeerde 1,0 g amorf 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan vrije-base in 10 ml ethylether. Een kleine hoeveelheid kristallijn 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan, ver-
 10 kregen volgens voorbeeld I (ongeveer 2 mg) werd aan het mengsel toegevoegd, en het mengsel werd in een gesloten systeem gedurende 48 uur bij 20 - 25°C gesuspenseerd. Hierna werden de verkregen donkergroene kristallen door vacuümfiltratie verwijderd. De kristallen werden gewassen met 10 ml ether, 15 ml Skellysolve-B en onder hoog vacuüm gedurende 24 uur
 15 bij 40°C gedroogd. De opbrengst was 0,9 + g. Het kristallijne produkt had dezelfde eigenschappen als het in voorbeeld I verkregen produkt.

De stabiliteit van kristallijn 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan werd met de volgende procedure bepaald: een nauwkeurig bepaalde hoeveelheid van 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan, variërend van 5 - 25 mg, werd in zoveel 1-grams schroefdop-
 20 flesjes gebracht als nodig was. De vereiste hoeveelheden schroefdop-flesjes, die de nauwkeurig afgewogen hoeveelheid 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan bevatten, werden op locaties met verschillende temperaturen neergezet. Na elk tijd-temperatuurinterval, werd een flesje dat het vooraf gewogen 7-(dimethylaminomethyleen)amino-
 25 9a-methoxymitosaan bevatte, aan HPLC-analyse onderworpen. De analyse wordt uitgedrukt in microgram/mg van 7-(dimethylaminomethyleen)-amino-9a-methoxymitosaan activiteit. De resultaten zijn in tabel A vermeld. In deze tabel worden tussen haakjes de procentuele verliezen aangegeven
 30 voor amorf 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan.

TABEL A.

<u>Tijd in dagen</u>		<u>procentueel verlies</u>			
		<u>45°C</u>	<u>56°C</u>	<u>85°C</u>	<u>100°C</u>
5	1				0 - 1
	3			(93)	
	4				0
	5				0 (100)
	6				3,2
10	7		0 (14)		
	14		0 (25)		2,8; 4,8; 9,7
	30	0	0 (41)		

C O N C L U S I E S:

1. Nieuwe kristallijne vorm van 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan met een infra-rood spectrogram volgens fig. 1.
2. Werkwijze voor het bereiden van kristallijn 7-(dimethylamino-methyleen)amino-9a-methoxymitosaan, omvattende het oplossen van amorf
5 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan in een oplosmiddel, zoals aceton of ethanol, liefst aceton en toevoegen van de oplossing aan ether.
3. Werkwijze voor het bereiden van kristallijn 7-(dimethylamino-methyleen)amino-9a-methoxymitosaan, omvattende het suspenderen van amorf
10 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan in ethylether en het daarna toevoegen van een kleine hoeveelheid kristallijn 7-(dimethylamino-methyleen)amino-9a-methoxymitosaan om kristallisatie teweeg te brengen van het amorge 7-(dimethylaminomethyleen)amino-9a-methoxymitosaan.



