



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 301070

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 07 D 407/12, 409/12, A 61 K 31/335

Patentstyret

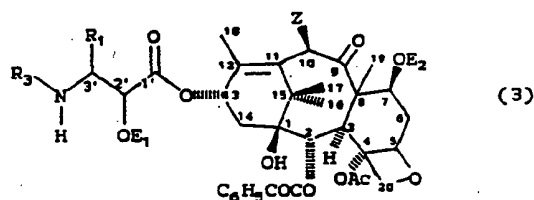
(21) Søknadsnr	923677	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	22.09.92	(85) Videreføringsdag	23.09.91, US, 763805
(24) Løpedag	22.09.92	(30) Prioritet	03.04.92, US, 862819
(41) Alm. tilgj.	24.03.93		
(45) Meddelt dato	08.09.97		
(73) Patenthaver	Florida State University, 2035 East Paul Dirac Drive, Tallahassee, FL 32310, US		
(72) Oppfinner	Robert A. Holton, Tallahassee, FL, US Ronald J. Biediger, Tallahassee, FL, US Hossain Nadizadeh, Tallahassee, FL, US		
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 OSLO		

(54) Benevnelse Taksanderivater og farmasøytiske preparater som inneholder slike

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Taksanderivat med formelen



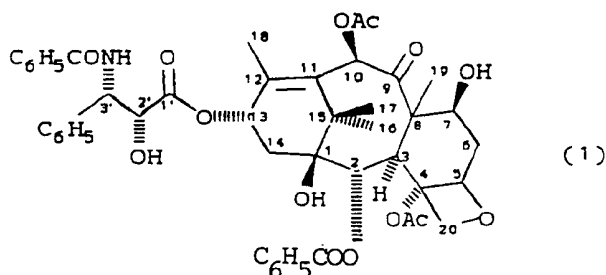
hvor R₁ er  eller 

Z er -OT₁; T₁ er hydrogen, hydroksyl-
beskyttelsesgruppe eller -COT₂; T₂ er H,
C₁-C₆-alkyl, C₁-C₆-alkenyl, C₁-C₆-alkynyl
eller monosyklisk aryl; R₂ er benzoyl,
substituert benzoyl eller C₁-C₆-alkoksy-
karbonyl; Ac er acetyl; og E₁ og E₂ er
uavhengig valgt fra hydrogen og funk-
sjonelle grupper som øker vannoppløse-
ligheten til taksanderivatet. Taksan-
derivatene kan anvendes som antitumor-
midler.

Farmasøytisk preparat som inne-
holder et slikt taksanderivat og ett
eller flere farmakologisk akseptable,
inerte eller fysiologisk aktive for-
tynningsmidler eller adjuvanter.

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot nye taksanderivater som har anvendbarhet som antileukemi- og antitumormidler, og farmasøytiske preparater som inneholder slike.

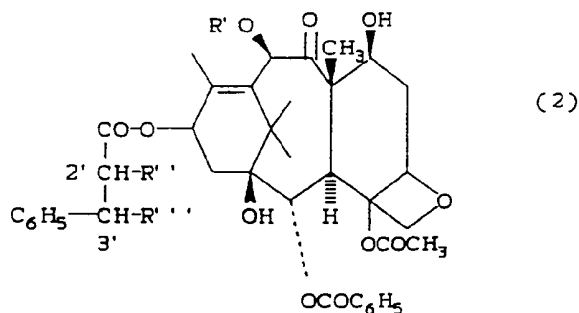
5 Taksanfamilien av terpen, hvor taksol er et medlem, har tiltrukket seg betydelig interesse både innen biologien og kjemien. Taksol er et lovende kjemoterapeutisk middel mot kreft og har et bredt spektrum av antileukemisk og tumorinhiberende aktivitet. Taksol har en 2'R,3'S-konfigurasjon og den
10 følgende strukturformel:



15

hvor Ac er acetyl. På grunn av denne lovende aktivitet
20 gjennomgår taksol for tiden kliniske forsøk både i Frankrike og USA.

Colin et al. rapporterte i US patentskrift nr. 4.814.470 at taksolderivater med strukturformel (2) nedenunder har en aktivitet som er betydelig større enn aktiviteten til
25 taksol (1).



30

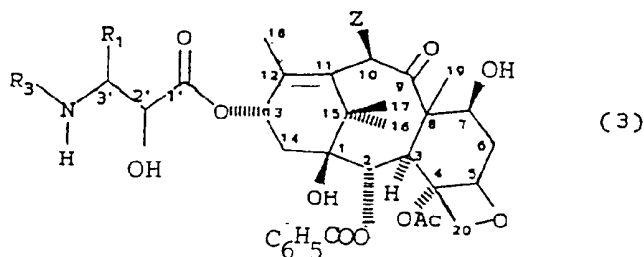
35 R' er hydrogen eller acetyl, en av R'' og R''' er hydroksy, og den andre er tert.-butoksykarbonylamino, og deres stereoisomere former, og blandinger derav. Forbindelsen med formel (2), hvor R'' er hydroksy, R''' er tert.-butoksykarbonylamino med 2'R,3'S-konfigurasjon, henvises vanligvis til som

taksoter.

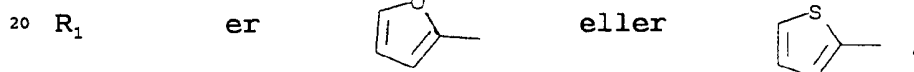
Selv om taksol og taksoter er lovende kjemoterapeutiske midler, er de ikke effektive i alle tilfeller. Det gjenstår følgelig et behov for ytterligere kjemoterapeutiske midler.

Blant formålene ved foreliggende oppfinnelse er derfor tilveiebringelsen av nye taksanderivater som er verdifulle antileukemi- og antitumormidler.

Foreliggende oppfinnelse er således rettet mot taksanderivater med formelen:



hvor



Z er $-OT_1$,

T_1 er hydrogen eller $-COT_2$,

T_2 er H, C_1 - C_6 -alkyl, C_2 - C_6 -alkenyl eller C_2 - C_6 -alkynyl,

R_3 er benzoyl eller C_1 - C_6 -alkoksykarbonyl, og

Ac er acetyl.

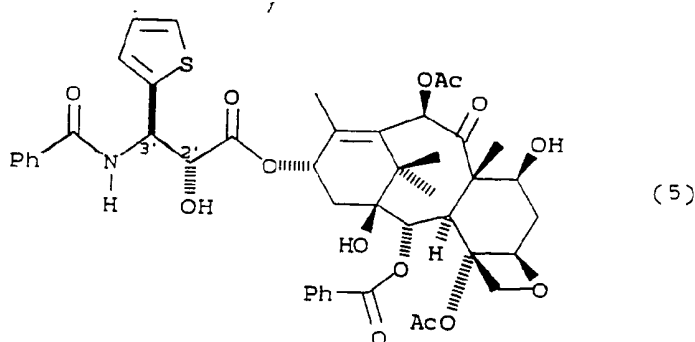
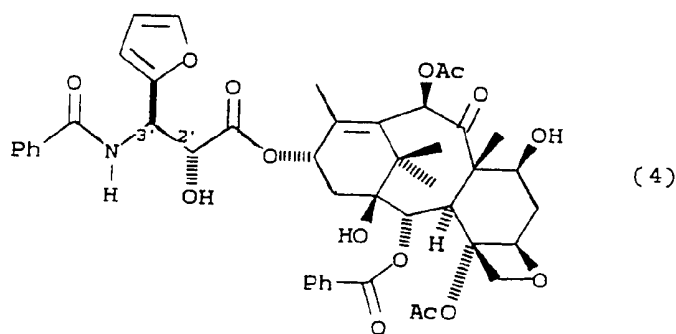
Videre er oppfinnelsen rettet mot farmasøytiske preparater som er kjennetegnet ved at de inneholder et taksanderivat ifølge krav 1 og ett eller flere farmakologisk akseptable, inerte eller fysiologisk aktive fortynningsmidler eller adjuvanter.

I overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse er det blitt oppdaget at forbindelser med strukturformel (3) generelt, og strukturformlene (4) og (5) spesielt, oppviser bemerkelsesverdige egenskaper *in vitro* og er verdifulle antileukemi- og antitumormidler. Deres biologiske aktivitet er blitt bestemt *in vitro* under anvendelse av tubulinanalyser i henhold til metoden til Parness et al., J. Cell. Biology, 91,

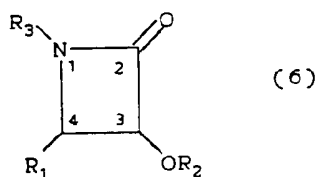
301070

3

s. 479-487 (1981), og humane kreftcellelinjer, og er sammenlignbar med den som oppvises av taksol og taksoter.



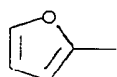
Taksaner med formlene (4) og (5), som har 2'R,3'S-konfigurasjon, kan oppnås ved å omsette et β -laktam med metallalkoksider med den tetrasykliske taksankjerne og en C-13 metallisk oksidsubstituent, hvorved det fås forbindelser med en β -amidoestersubstituent i C-13. β -laktamene har den følgende strukturformel:



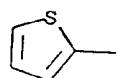
hvor

R_1

er



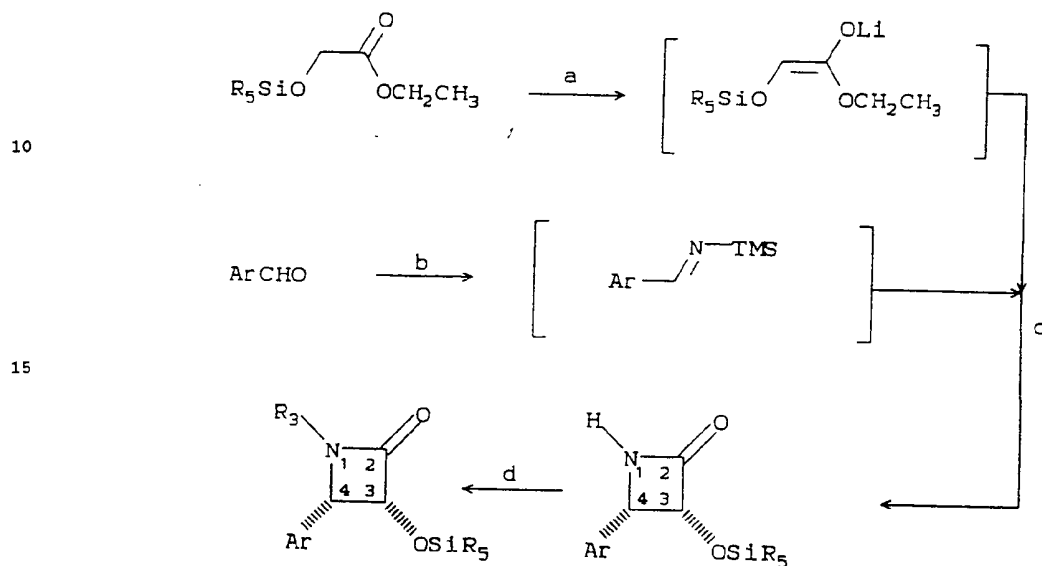
eller



R_2 er en hydroksybeskyttelsesgruppe, og
 R_3 er benzoyl eller C_1 - C_6 -alkoksykarbonyl.

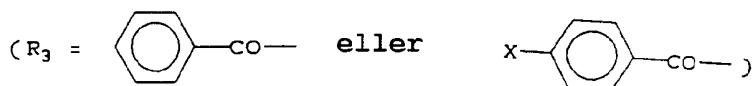
β -laktamer (6) kan fremstilles fra lett tilgjengelige utgangsmaterialer, slik det er illustrert ved hjelp av

5 følgende reaksjonsskjema:



reagenser:

- (a) LDA, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$;
 (b) LHMDs, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $0\text{ }^{\circ}\text{C}$;
 (c) THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 t); og
 (d) trietylamin og et acylklorid
- 25



eller alkylklorformiat (R_3 = alkoksykarbonyl).

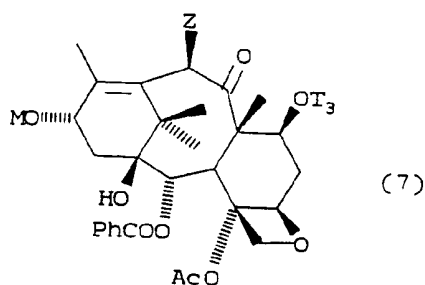
3-hydroksylbeskyttelsesgruppen vist i reaksjonsskjemaet ovenfor er $-\text{SiR}_5$, hvor R_5 er trialkyl eller triaryl, slik som trietyl. 3-hydroksylgruppen kan være beskyttet med
 35 andre standard beskyttelsesgrupper, slik som 1-etoksyetyl eller 2,2,2-trikloretoksymetyl. Ytterligere hydroksybeskyttelsesgrupper og syntesen derav kan finnes i "Protective groups in Organic Synthesis" av T.W. Greene, John Wiley & Sons, 1981.

De racemiske β -laktamer kan oppløses i de rene enantiomerer før beskyttelse ved rekrySTALLISERING av de tilsvarende 2-metoksy-2-(trifluormetyl)-fenyleddiksyreestere. Reaksjonen beskrevet nedenunder, hvor β -amidoestersidekjeden

5 tilknyttes, har imidlertid fordelen ved å være svært diastereoselektiv og muliggjør derved bruken av en racemisk blanding av sidekjedeforløper.

Metallalkoksidene med den tetrasykliske taksankjerne og en C-13 metallisk oksidsubstituent har den følgende strukturformel:

10



hvor

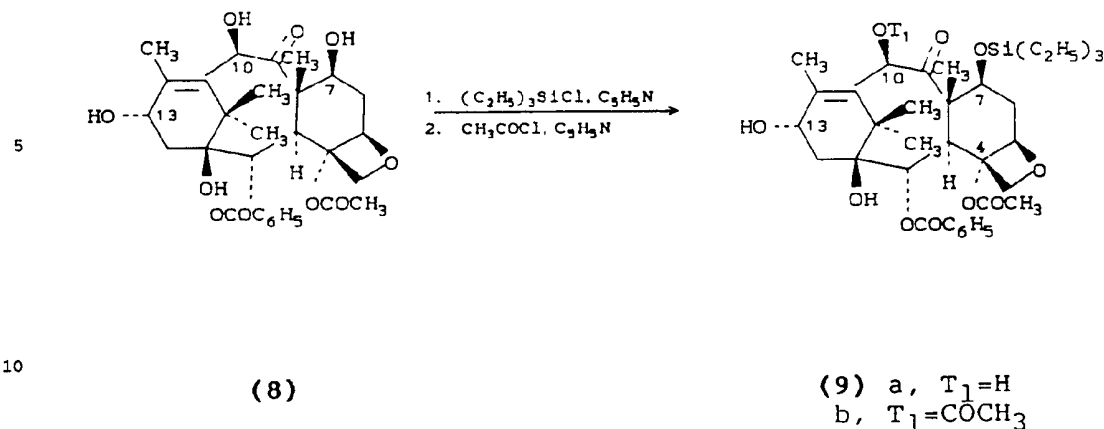
- 20 Z er $-\text{OT}_1$;
 T_1 er hydrogen eller $-\text{COT}_2$;
 T_2 er H, C_1 - C_6 -alkyl, C_2 - C_6 -alkenyl eller C_2 - C_6 -alkynyl;
 T_3 er en hydroksybeskyttelsesgruppe; og
M er et metall, fortrinnsvis valgt fra gruppen omfattende gruppe Ia, gruppe IIA og overgangsmetaller, og
- 25 helst Li, Mg, Na, K eller Ti.

Metallalkoksidene fremstilles ved å omsette en alkohol med den tetrasykliske taksankjerne og en C-13-hydroksylgruppe med en organometallisk forbindelse i et egnet oppløsningsmiddel. Alkoholen er fortrinnsvis et beskyttet baccatin

30 III, særlig 7-O-trietylsilyl-baccatin III (som kan fås som beskrevet av Greene et al. i JACS, 110, s. 5917 (1988), eller ad andre veier) eller 7,10-bis-O-trietylsilyl-baccatin III.

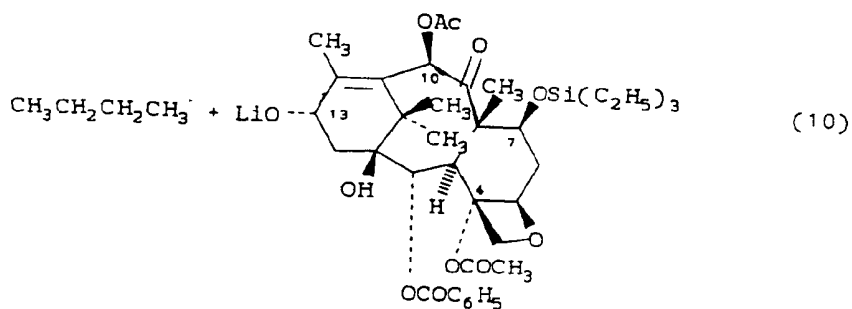
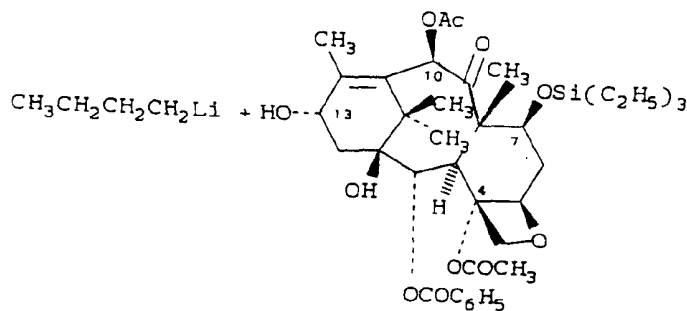
Som rapportert i Greene et al., omdannes 10-deacetyl-

35 baccatin III til 7-O-trietylsilyl-10-deacetyl-baccatin III i henhold til det følgende reaksjonsskjema:



Under det som rapporteres å være forsiktig optimali-
 15 serte betingelser, omsettes 10-deacetyl-baccatin III med
 20 ekvivalenter $(C_2H_5)_3SiCl$ ved 23 °C under argonatmosfære i 20
 timer i nærvær av 50 ml pyridin/mmol 10-deacetyl-baccatin III,
 hvorved man får 7-triethylsilyl-10-deacetyl-baccatin III (9a)
 som et reaksjonsprodukt i 84-86 % utbytte etter rensing.
 20 Reaksjonsproduktet kan så eventuelt acetyleres med 5 ekvi-
 valenter CH_3COCl og 25 ml pyridin/mmol av 9a ved 0 °C under
 argonatmosfære i 48 timer, hvorved man får 86 % utbytte av 7-
 O-triethylsilyl-baccatin III (9b), Greene et al. i JACS, 110,
 s. 5917-5918 (1988).

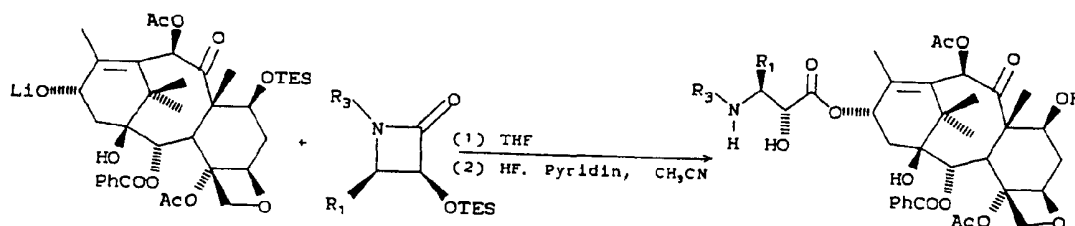
25 Det erholdte 7-O-triethylsilyl-baccatin III (9b) om-
 settes med en organometallisk forbindelse, slik som n-butyl-
 litium, i et oppløsningsmiddel, slik som tetrahydrofuran
 (THF), hvorved metallalkoksidet 13-O-litium-7-O-triethylsilyl-
 baccatin III (10) fås, slik som vist i det følgende reaksjons-
 30 skjema:



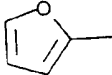
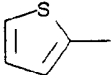
Som vist i det følgende reaksjonsskjema, omsettes 13-O-litium-7-O-triethylsilyl-baccatin III (10) med β -laktam (6),

25 hvor R_2 er triethylsilyl, hvorved man får et mellomprodukt hvor C-7- og C-2'-hydroksylgruppene er beskyttet med en triethylsilylgruppe. Triethylsilylgruppene hydrolyseres så under milde betingelser for ikke å forstyrre esterbindingen eller taksan-

30 substituentene.



hvor

5 R_1 er  eller , og
 R_3 er benzoyl eller C_1-C_6 -alkoksykarbonyl.

Både omdannelsen av alkoholen til metallalkoksidet og
10 den endelige syntese av taksanderivatet kan finne sted i den
samme reaksjonsbeholder. Fortrinnsvis tilsettes β -laktamet til
reaksjonsbeholderen etter dannelse av metallalkoksidet i
denne.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også farma-
15 søytiske preparater som inneholder en forbindelse med formel
(3) generelt, og forbindelsene med formlene (4) og (5)
spesielt, sammen med ett eller flere farmasøytisk akseptable,
inerte eller fysiologisk aktive fortynningsmidler eller adju-
vanser.

20 Disse preparatene kan presenteres i enhver form som
er passende for den påtenkte administrasjonsvei. Den parente-
rale vei, og spesielt den intravenøse vei, er den foretrukne
administrasjonsvei.

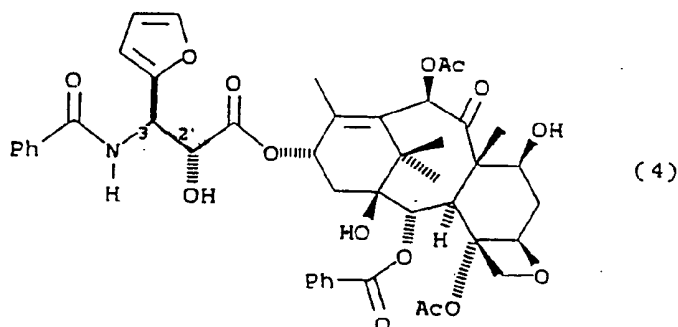
Preparatene ifølge oppfinnelsen for parenteral
25 administrering kan være vandige eller ikke-vandige, sterile
oppløsninger, suspensjoner eller emulsjoner. Propylenglykol,
vegetabiliske oljer, spesielt olivenolje, og injiserbare
organiske estere, f.eks. etyloleat, kan anvendes som oppløs-
ningsmiddel eller bærer. Disse preparatene kan også inneholde
30 adjuvanser, spesielt fuktemidler, emulgeringsmidler eller dis-
pergeringsmidler. Steriliseringen kan utføres på flere måter,
f.eks. ved å bruke et bakteriologisk filter, ved å inkorporere
steriliseringsmidler i preparatet, ved bestråling eller ved
oppvarming. De kan også være i form av sterile, faste prepa-
35 rater som kan oppløses eller dispergeres i sterilt vann eller
i ethvert annet injiserbart, sterilt medium.

Produktene med generell formel (3) brukes nærmere
bestemt ved behandlingen av akutte leukemier og faste tumorer,
ved daglige doser som generelt er mellom 1 og 2 mg/kg ved den

intravenøse vei (perfusjon) for et voksent menneske.

De følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen.

Eksempel 1



15 Fremstilling av 3'-desfenyl-3'-(2-furyl)-taksol

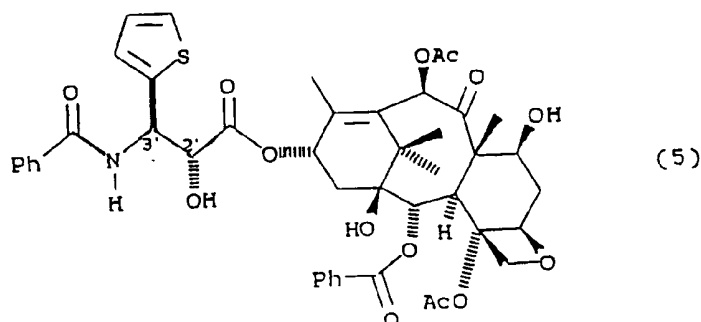
Til en oppløsning av 7-triethylsilyl-baccatin III (100 mg, 0,143 mmol) i 1 ml THF ved -45 °C ble det dråpevis tilsatt 0,087 ml av en 1,63 M oppløsning av nBuLi i heksan. Etter 0,5 time ved -45 °C ble en oppløsning av cis-1-benzoyl-3-triethylsilyloksy-4-(2-furyl)azetidin-2-on (266 mg, 0,715 mmol) i 1 ml THF tilsatt dråpevis til blandingen. Opp-
 20 løsningsen ble varmet opp til 0 °C og holdt ved den tempera-
 turen i 1 time før 1 ml av en 10 % oppløsning av AcOH i THF ble tilsatt. Blandingen ble fordelt mellom mett, vandig
 25 NaHCO₃ og 60/40 etylacetat/heksan. Inndamping av det organiske
 lag gav en rest som ble rensset ved filtrering gjennom silika-
 gel, hvorved man fikk 143 mg av en blanding inneholdende
 (2'R,3'S)-2',7-(bis)triethylsilyl-3'-desfenyl-3'-(2-furyl)-
 taksol og en liten mengde av (2'S,3'R)-isomeren.

30 Til en oppløsning av 143 mg av blandingen erholdt fra
 den tidligere reaksjon i 6 ml acetonitril og 0,3 ml pyridin
 ved 0 °C ble det tilsatt 0,9 ml 48 % vandig HF. Blandingen ble
 omrørt ved 0 °C i 3 timer, så ved 25 °C i 13 timer og fordelt
 mellom mett, vandig natriumbikarbonat og etylacetat. Inn-
 35 damping av etylacetatoppløsningen gav 115 mg materiale som ble
 rensset ved hurtigkromatografi, hvorved man fikk 98 mg (81 %) 3'-desfenyl-3'-(2-furyl)-taksol, som ble rekrystallisert fra metanol/vann.

Sm.p. 174-176 °C; $[\alpha]_{D}^{25} -47,8^{\circ}$ (c 0,045, CHCl₃).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,14 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, benzoat orto), 7,74 (m, 2H, aromatisk), 7,51 (m, 7H, aromatisk), 6,86 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, NH), 6,40 (d, $J = 1,2$ Hz, 2H, furyl), 6,29 (s, 1H, H10), 6,24 (dd, $J = 9,2, 9,2$ Hz, 1H, H13), 5,89 (dd, $J = 9,2, 2,4$ Hz, 1H, H3'), 5,69 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, H2 β), 4,96 (dd, $J = 9,5, 1,8$ Hz, 1H, H5), 4,83 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H2'), 4,42 (dd, $J = 10,7, 6,7$ Hz, 1H, H7), 4,31 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H20 α), 4,20 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H20 β), 3,83 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, H3), 2,56 (m, 1H, H6 α), 2,43 (s, 3H, 4Ac), 2,35 (m, 2H, H14), 2,24 (s, 3H, 10Ac), 1,89 (m, 1H, H6 β), 1,87 (br s, 3H, Me18), 1,87 (s, 1H, 10H), 1,69 (s, 3H, Me19), 1,25 (s, 3H, Me17), 1,15 (s, 3H, Me16).

Eksempel 2



25 Fremstilling av 3'-desfenyl-3'-(2-tienyl)-taksol

Til en oppløsning av 7-triethylsilyl-baccatin III (100 mg, 0,143 mmol) i 1 ml THF ved -45 °C ble det dråpevis tilsatt 0,087 ml av en 1,63 M oppløsning av nBuLi i heksan. Etter 0,5 time ved -45 °C ble en oppløsning av cis-1-(4-benzoyl)-3-triethylsilyloksy-4-(2-tienyl)azetidin-2-on (277 mg, 0,715 mmol) i 1 ml THF tilsatt dråpevis til blandingen. Opp-løsningen ble varmet opp til 0 °C og holdt ved den tempera- turen i 1 time før 1 ml av en 10 % oppløsning av AcOH i THF ble tilsatt. Blandingen ble fordelt mellom mettet, vandig
35 NaHCO_3 og 60/40 etylacetat/heksan. Inndamping av det organiske lag gav en rest som ble renset ved filtrering gjennom silika- gel, hvorved man fikk 169 mg av en blanding inneholdende (2'R,3'S)-2',7-(bis)triethylsilyl-3'-desfenyl-3'-(2-tienyl)-

taksol og en liten mengde av (2'S,3'R)-isomeren.

Til en oppløsning av 169 mg av blandingen erholdt fra den tidligere reaksjon i 6 ml acetonitril og 0,3 ml pyridin ved 0 °C ble det tilsatt 0,9 ml 48 % vandig HF. Blandingen ble
 5 omrørt ved 0 °C i 3 timer, så ved 25 °C i 13 timer og fordelt mellom mettet, vandig natriumbikarbonat og etylacetat. Inn-damping av etylacetatoppløsningen gav 140 mg materiale som ble rensset ved hurtigkromatografi, hvorved man fikk 93 mg (76 %) 3'-desfenyl-3'-(2-tienyl)-taksol, som ble rekrystallisert fra
 10 metanol/vann.

Sm.p. 173-175 °C; $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} -42,1^\circ$ (c 0,515, CHCl_3).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,14 (d, J = 7,1 Hz, 2H, benzoat orto), 7,72 (d, J = 8,7 Hz, 2H, benzamid orto), 7,65-7,35 (m, 6H, aromatisk), 7,31 (dd, J = 5,5, 1,1 Hz, 1H, tienyl),
 15 7,19 (dd, J = 3,9, 1,1 Hz, 1H, tienyl), 7,03 (dd, J = 5,5, 3,9 Hz, 1H, tienyl), 6,96 (d, J = 8,8 Hz, 1H, NH), 6,28 (s, 1H, H10), 6,24 (dd, J = 8,8, 7,7 Hz, 1H, H13), 6,05 (dd, J = 8,8, 1,7 Hz, 1H, H3'), 5,68 (d, J = 7,1 Hz, 1H, H2), 4,95 (dd, J = 9,3, 1,7 Hz, 1H, H5), 4,78 (d, J = 2,2 Hz, 1H, H2'),
 20 4,40 (dd, J = 11,0, 6,6 Hz, 1H, H7), 4,31 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H20 α), 4,20 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H20 β), 3,81 (d, J = 7,1 Hz, 1H, H3), 3,72 (br, s, 1H, 2'OH), 2,54 (m, 1H, H6 α), 2,41 (s, 3H, 4Ac), 2,37 (m, 2H, H14 α , H14 β), 2,23 (s, 3H, 10Ac), 1,88 (m, 1H, H6 α), 1,82 (br s, 3H, Me18), 1,68 (s, 3H, Me19), 1,23
 25 (s, 3H, Me17), 1,14 (s, 3H, Me16).

Eksempel 3

Tubulinbindingsanalyser ble utført ved å bruke forbindelsene (4) og (5) i det vesentlige som angitt i Parness et
 30 al., J. Cell. Biology, 91, s. 479-487 (1981), og det ble sammenlignet med taksol og taksoter. Resultatene er vist i tabell 1.

Tabell 1

Forbindelse (navn/formel)	Tubulinanalyse	
	Opprinnelig topp	Relativ hastighet
4	83	
5	75	
Taksol	100	98
Taksoter	100	--

Eksempel 4

IC₅₀-data ble erholdt *in vitro* på en human kreft-cellelinje (HCT 116), som er tilgjengelig fra National Cancer Institute, og en multilegemiddelresistent cellelinje (HCT/VM46), som er resistent overfor mange forskjellige hydrofobe midler, inkludert taksol. Cytotoksisitet ble fastslått i HCT 116 og HCT VM46 humane tykktarmkarsinomceller ved hjelp av analyse med XTT (2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino)karbonyl]-2H-tetrazolium-hydroksid) (Scudiero et al., "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines", Cancer Res., 48, s. 4827-4833, 1988). Celler ble platet ut ved 4000 celler/brønn i 96-brønners mikrotiterplater, og 24 timer senere ble legemidler tilsatt og seriefortynnet. Cellene ble inkubert ved 37 °C i 72 timer, og på dette tidspunkt ble tetrazoliumfargestoffet XTT tilsatt. Et dehydrogenaseenzym i levende celler reduserer XTT til en form som absorberer lys ved 450 nm, som kan kvantifiseres spektrofotometrisk. Dess større absorbans, dess større antall levende celler. Resultatene er uttrykt som en IC₅₀-verdi, som er den legemiddelkonsentrasjon som er påkrevd for å inhibere celledivisjonen (dvs. absorbans ved 450 nm) til 50 % av proliferasjonen til ubehandlede kontrollceller. Resultatene er vist i tabell 2. Lavere tall indikerer større aktivitet.

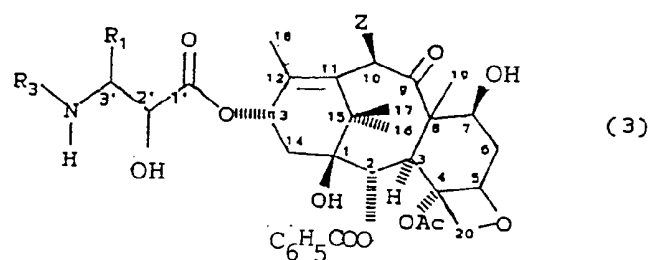
Tabell 2

Forbindelse (navn/formel)	IC ₅₀	
	HCT 116	HCT VM46
4	0,004	0,079
5	0,006	0,110
Taksol	0,004	0,536
Taksoter	0,007	0,246

På bakgrunn av det ovenfor angitte vil det ses at de forskjellige formålene ved oppfinnelsen er oppnådd.

P a t e n t k r a v

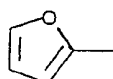
1. Taksanderivat,
karakterisert ved at det har formelen



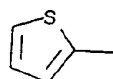
hvor

R₁

er



eller



Z

er -OT₁,

T₁

er hydrogen eller -COT₂,

T₂

er H, C₁-C₆-alkyl, C₂-C₆-alkenyl eller C₂-C₆-alkynyl,

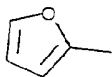
R₃

er benzoyl eller C₁-C₆-alkoksykarbonyl, og

Ac

er acetyl.

2. Taksan ifølge krav 1,
karakterisert ved at R_1 er

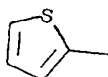


5

og taksanet har 2'R,3'S-konfigurasjon.

3. Taksan ifølge krav 1,
karakterisert ved at R_1 er

10



og taksanet har 2'R,3'S-konfigurasjon.

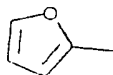
15

4. Farmasøytisk preparat,
karakterisert ved at det inneholder et
taksanderivat ifølge krav 1 og ett eller flere farmakologisk
akseptable, inerte eller fysiologisk aktive fortynningsmidler
eller adjuvanter.

20

5. Preparat ifølge krav 4,
karakterisert ved at det inneholder et
taksanderivat ifølge krav 1 hvor R_1 er

25

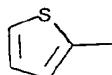


og taksanet har 2'R,3'S-konfigurasjon.

30

6. Preparat ifølge krav 4,
karakterisert ved at det inneholder et
taksanderivat ifølge krav 1 hvor R_1 er

35



og taksanet har 2'R,3'S-konfigurasjon.