



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **392 277 B**

PATENTSCHRIFT

(12)

(21) Anmeldenummer: 2578/87

(51) Int.Cl.⁵ : **C07D 498/06**
A61K 31/42

(22) Anmeldetag: 8.10.1987

(42) Beginn der Patentedauer: 15. 8.1990

(45) Ausgabetag: 25. 2.1991

(73) Patentinhaber:

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
D-6230 FRANKFURT/MAIN (DE).

(54) DIELS-ALDER-ADDUKTE AUS STREPTAZOLIN UND NAPHTHOCHINONEN UND IHRE OXIDATIONSPRODUKTE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG ZUR HERSTELLUNG VON ARZNEIMITTELN

(57) Streptazolin wird in einer Diels-Alder-Reaktion mit Naphthochinonen umgesetzt und das Addukt anschließend oxidiert. Die entstandenen Verbindungen zeigen cytotoxische Aktivität, insbesondere gegen Leukämiezellen, und wirken antimikrobiell sowie gegen Protozoen.

AT 392 277 B

Krebs-Erkrankungen stellen derzeit eine der größten Herausforderungen an die Medizin dar. Chirurgisch-operative Eingriffe bzw. Strahlentherapie reichen bei der Mehrzahl der Krebspatienten nicht mehr aus, da durch Metastasenbildung eine lokale Bekämpfung des Tumors sinnlos ist. Nur die Krebs-Chemotherapie bietet in diesem Stadium der Krankheit noch eine Chance auf Heilung. Daher besteht ein gesteigertes Interesse an neuen geeigneten Verbindungen mit möglichst geringen Nebenwirkungen. Nach einer Zusammenstellung des National Cancer Institute, USA, befinden sich zur Zeit etwa 50 Naturstoffe bzw. Naturstoffderivate zur Krebschemotherapie im klinischen Einsatz und etwa weitere 100 in den verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung. Ein besonderes Interesse besitzen dabei die Anthracycline, die hinsichtlich ihrer cytotoxischen Wirksamkeit seit ca. 25 Jahren systematisch untersucht werden.

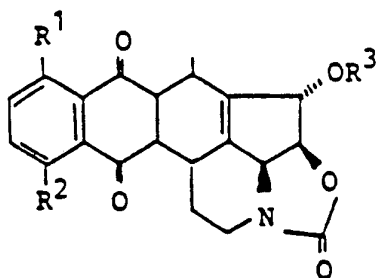
In der vorliegenden Erfindung werden Verbindungen mit cytotoxischen Eigenschaften beschrieben, die durch Derivatisierung von Streptazolin hergestellt werden.

Streptazolin (Verbindung der Formel IV, $R^3 = H$) wurde von Zähler et al. [Helv. Chim. Acta 64, 1752 (1981)] als sekundärer Metabolit aus Streptomyces viridochromogenes isoliert und von Keller-Schierlein et al. [Helv. Chim. Acta 65, 1432, (1982)] in seiner Struktur aufgeklärt. Die Totalsynthese von Streptazolin wurde von Kozikowski et al. beschrieben [JACS 107, 1763, (1984)].

Streptazolin ist nur ein sehr schwaches Antibiotikum und hat keine cytotoxische Wirkung. Durch Umsetzung der Verbindung oder ihrer Derivate entsprechend der Formel mit Naphthochinonen entstehen Produkte, die sich weiter in 1,4-Dihydroanthrachinon- bzw. Anthrachinonderivate oxidieren lassen. Sowohl die Diels-Alder-Addukte als auch ihre Oxidationsprodukte besitzen cytotoxische und antimikrobielle Eigenschaften bzw. Wirkung gegen Protozoen.

Die Erfindung betrifft somit:

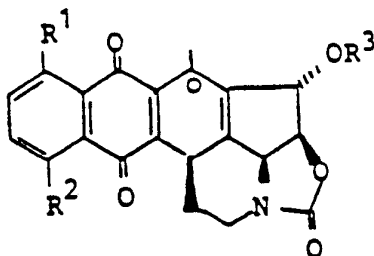
1. Die Verbindung der allgemeinen Formel I,



I

in der R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten.

2. Die Verbindung der allgemeinen Formel II,

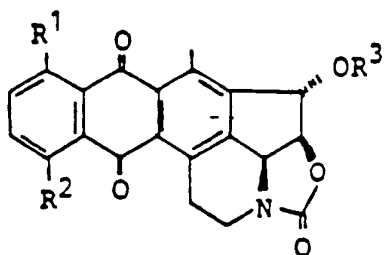


II

bei der an der mit "o" gekennzeichneten Position die beiden möglichen Epimeren auftreten und in der

R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und
 R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten.

3. Die Verbindung der allgemeinen Formel III,

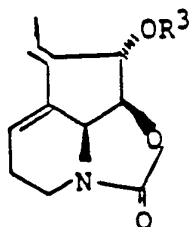


III

in der

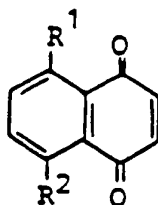
R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und
 R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten.

4. Ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung der allgemeinen Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist,
 daß man die Verbindung der Formel IV



IV

in der R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeutet,
 mit der Verbindung der allgemeinen Formel V,



V

in der R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl bedeuten, miteinander zur Reaktion bringt.

5 5. Ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln II und III, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Verbindung der allgemeinen Formel I oxidiert wird.

6. Die Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II und/oder III als cytotoxisch wirkendes Agens, wobei die therapeutische Behandlung des Menschen ausgenommen ist.

10 7. Die Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II und/oder III als antimikrobiell und gegen Protozoen wirkendes Agens, wobei die therapeutische Behandlung des Menschen ausgenommen ist.

8. Die Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel I und/oder II und/oder III zur Herstellung eines Arzneimittels.

15 Streptazolin $R^3 = H$ kann nach an sich bekannten Methoden aus Streptomyceten gewonnen werden. Diese Verbindung und dessen Derivate, die in der allgemeinen Formel IV dargestellt sind, werden als konjugiertes Dien in einer Diels-Alder-Reaktion an das Dienophil der allgemeinen Formel V addiert. Die Reaktion läuft im verschlossenen Gefäß bei erhöhten Temperaturen von ungefähr 60 bis 140 °C in inerten
20 Lösungsmitteln ab und ist nach einem Verlauf von 4 bis 15 Stunden beendet. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise Toluol, Nitrotoluol, Xylol, Benzol, Tetrahydrofuran oder Chloroform. Besonders gute Ergebnisse erzielt man, wenn die Reaktionspartner bei 100 bis 120 °C in Toluol zusammengebracht werden. Alternativ können die Reaktionspartner IV und V auch in Methylenchlorid oder Chloroform unter Zusatz von Lewis-Säuren wie beispielsweise Aluminiumtrichlorid oder Titan-tetrachlorid bei Temperaturen zwischen -20 bis +10 °C
25 umgesetzt werden, wenn R^1 und R^2 nicht Hydroxyl bzw. R^3 nicht Wasserstoff sind. Die Reaktionsgemische werden anschließend von den betreffenden Lösungsmitteln und Katalysatoren befreit. Die Verbindung I kann mit Hilfe chromatographischer Methoden gereinigt werden.

Die Verbindung der allgemeinen Formel I dient als Zwischenprodukt zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln II und III. Diese erhält man durch Oxidation der regio- bzw. diastereomeren Verbindung der
30 allgemeinen Formel I in alkalischen Mischungen aus (C_1 - C_4)-Alkoholen und Wasser. Besonders bevorzugt verläuft die Oxidation im allgemeinen mit Luftsauerstoff bei Temperaturen von 10 bis 40 °C in einer Lösung aus Wasser und Methanol, deren Mischungsverhältnis im Bereich 20 : 1 bis 1 : 20 liegt. Mit einer Lauge, insbesondere Natronlauge, Kalilauge und Carbonatlösungen, Pyridin bzw. Ammoniak wird der pH auf einen Wert zwischen 9 und 14 eingestellt.

35 Unter den beschriebenen Bedingungen bildet sich bevorzugt, wie durch NOE-Messungen festgestellt werden konnte, die Verbindung II in der dargestellten Konfiguration, wobei an der mit "o" gekennzeichneten Position beide Epimere auftreten können.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Verbindung der allgemeinen Formel II kein Zwischenprodukt auf dem Weg zur Verbindung der allgemeinen Formel III darstellt, da sich III nicht durch nochmalige Anwendung der
40 oben beschriebenen oxidierenden Bedingungen aus II herstellen läßt.

Die Verbindungen der allgemeinen Formeln I, II und III zeigen cytotoxische Wirkung, insbesondere gegen Leukämiezellen. Die Verbindungen zeigen ferner antimikrobielle, insbesondere antifungische Wirkung, besonders bevorzugt gegen Candida albicans sowie Wirkung gegen Protozoen, insbesondere gegen Trichomonas vaginalis.

45 In den folgenden Beispielen wird die Erfindung detailliert erläutert. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht.

Beispiel 1:

400 mg Streptazolin ($R^3 = H$) (1,93 mMol) und 367 mg Naphthazarin ($R^1 = R^2 = OH$) (1,93 mMol) werden
50 in 100 ml Toluol 10 bis 12 Stunden bei 100 bis 120 °C in einem verschlossenen Gefäß gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand an Kieselgel 60 (Fa. Merck) in Chloroform/Methanol (95/5) chromatographiert. Neben nicht umgesetztem Streptazolin und Naphthazarin erhält man 500 mg eines Gemisches der farblosen und bei 366 nm stark fluoreszierenden Diels-Alder-Addukte. Die Umsetzung kann vervollständigt werden, wenn das Dienophil in doppeltem Überschuß
55 eingesetzt wird.

Beispiel 2:

Man verfährt gemäß Beispiel 1, setzt jedoch Naphthochinon ($R^1 = R^2 = H$) statt Naphthazarin ein. Man erhält die entsprechenden Diels-Alder-Addukte in analogen Ausbeuten.

60

Beispiel 3:

Die aus Beispiel 1 erhaltenen Diels-Alder-Addukte werden in einer Mischung aus 20 ml Wasser, 60 ml Methanol und 20 ml 2N Natronlauge über einen Zeitraum von 10 bis 15 Minuten an der Luft bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird diese Lösung mit wäßriger Salzsäure auf den pH-Wert 1 eingestellt und 3 mal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 450 mg (59 % bezogen auf Streptazolin) der Verbindung der Formel II, in der R¹ und R² Hydroxyl und R³ Wasserstoff bedeuten, und 30 mg (4 %, bezogen auf Streptazolin) der Verbindung der Formel III, in der R¹, R² und R³ die genannte Bedeutung haben. Abbildung 1 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung II mit R¹ = R² = Hydroxyl und R³ = Wasserstoff.

Beispiel 4:

Man verfährt gemäß Beispiel 3, setzt jedoch die aus Beispiel 2 erhaltenen Diels-Alder-Addukte ein. Man erhält 233 mg (31 % bezogen auf Streptazolin) der Verbindung der Formel II, in der R¹, R² und R³ Wasserstoff bedeuten, und 149 mg (20 % bezogen auf Streptazolin) der Verbindung III, in der R¹, R² und R³ die genannte Bedeutung haben. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die ¹H-NMR-Spektren der genannten Verbindungen.

Beispiel 5:

400 mg Streptazolin-dimethyl-tertiärbutyl-silylether (1,24 mmol) und 196,11 mg (1,24 mmol) 1,4-Naphthochinon und 165,34 mg AlCl₃ werden in 40 ml Methylenchlorid bei 0 °C 30 Minuten in einem geschlossenen Gefäß gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung zwischen H₂O und Methylenchlorid verteilt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wird der Rückstand an Kieselgel 60 in Chloroform/Methanol (95 : 5) chromatographiert. Man erhält 535 mg Diels-Alder-Addukte. (90 % bezogen auf Streptazolin-dimethyl-tertiärbutyl-silylether.)

Beispiel 6:

Die gemäß Beispiel 5 erhaltenen Diels-Alder-Addukte werden in einer Mischung aus 200 ml Methanol und 15 ml 2N Natronlauge über einen Zeitraum von 15 Minuten an der Luft bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird diese Lösung mit wäßriger Salzsäure auf pH 3 eingestellt und 3 mal mit Chloroform extrahiert. Nach der Trocknung über Na₂SO₄ erfolgt die Chromatographie an Kieselgel 60 in Chloroform/Methanol (95 : 5).

Man erhält 477 mg der Verbindung III (R¹ = R² = H, R³ = Dimethyltertiärbutylsilyl, 90 % bezogen auf die eingesetzten Diels-Alder-Addukte).

Beispiel 7:Nachweis der cytotoxischen Wirkung:

Die cytotoxische Wirkung der Verbindungen kann in verschiedenen Testsystemen wie z. B. im Soft-Agar-Kolonietest an Leukämiezellen der Maus in vitro festgestellt werden.

Koloniebildung von L1210-Leukämiezellen in Soft-Agar:

Diese Methode dient zum Nachweis eines Einflusses der Testsubstanzen auf das Wachstumsverhalten der Zellen über mehrere Generationen (bei einer Zellzykluszeit von 10-12 Stunden werden in der Testzeit von 7 Tagen ca. 14 aufeinanderfolgende Generationen beobachtet). Zytostatisch wirksame Substanzen bewirken in diesem Test eine Reduktion der zu beobachtenden Koloniezahl gegenüber einer unbehandelten Kontrolle. Im einzelnen wurde der Test wie folgt durchgeführt:

500 L1210-Leukämiezellen pro Platte werden mit unterschiedlichen Konzentrationen der gemäß Beispiel 3 erhaltenen Verbindung der Formel II als Testsubstanz 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit McCoy-5A-Medium gewaschen und schließlich in Petrischalen nach Zusatz von 0,3 % Agar ausgegossen. Kontrollen werden lediglich mit frischem Medium inkubiert. Anstelle der einstündigen Inkubation werden außerdem unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanz der oberen Agarschicht zugemischt, um so eine kontinuierliche Exposition der Zellen über die gesamte Inkubationszeit zu erreichen. Nach Erstarren des Agars werden die Platten im Brutschrank 7 Tage bei 37 °C inkubiert (5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit). Anschließend wird die Zahl der entstandenen Kolonien mit einem Durchmesser von > 60 µ gezählt. Die Ergebnisse werden ausgedrückt als der Quotient der Koloniezahl in behandelten Agarplatten und der Koloniezahl in der unbehandelten Kontrolle. Aus der so erhaltenen Dosis-Wirkungskurve wurde die IC₅₀ als Maß für die Wirksamkeit der Testsubstanz ermittelt. Als Vergleichssubstanz dient bei diesem Test das Zytostatikum Adriamycin. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle

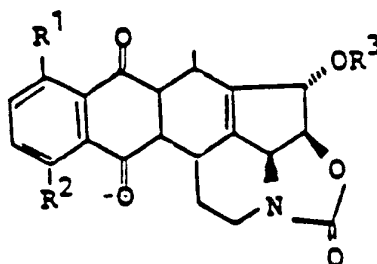
Substanz	Stammzellassay cont. IC ₅₀ (µg/ml)	Stammzellassay 1 h IC ₅₀ (µg/ml)
Testsubstanz	0,04	0,26
Streptazolin	10	10
Adriamycin	0,02	0,04

Beurteilung:

Wie die Tabelle zeigt, ist die gemäß Beispiel 3 erhaltene Verbindung der Formel II hinsichtlich ihrer Zytotoxizität mit Adriamycin vergleichbar, während Streptazolin, die Ausgangsverbindung, keine nennenswerte Zytotoxizität zeigt.

PATENTANSPRÜCHE

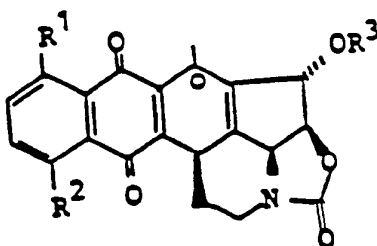
1. Die Verbindung der allgemeinen Formel I,



, I

in der R¹ und R² unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R³ Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylylsilyl bedeuten.

2. Die Verbindung der allgemeinen Formel II,



, II

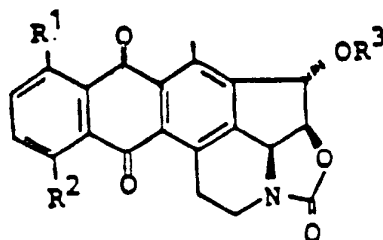
bei der an der mit "o" gekennzeichneten Position die beiden möglichen Epimeren auftreten und in der R¹ und R²

unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten.

3. Die Verbindung der allgemeinen Formel III,

5

10



, III

15

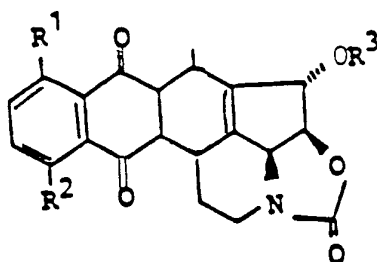
20

in der R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten.

4. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der allgemeinen Formel I,

25

30



, I

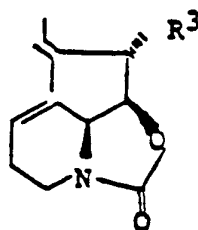
35

40

in der R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten, dadurch gekennzeichnet, daß man die Verbindung der Formel IV,

45

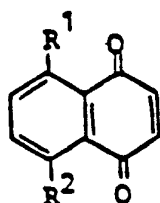
50



, IV

55

60 in der R^3 die oben genannte Bedeutung hat, mit der Verbindung der allgemeinen Formel V,



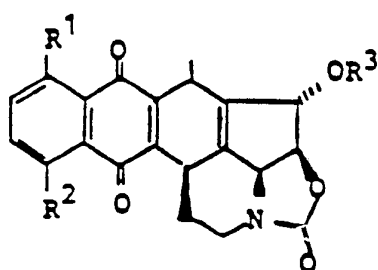
, V

in der R^1 und R^2 die oben genannte Bedeutung haben, miteinander zur Reaktion bringt.

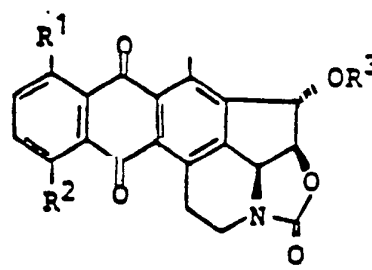
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Reaktion in Toluol bei 100 bis 120 °C durchführt.

6. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Reaktion unter Zusatz von Lewis-Säuren bei -20 bis +10 °C in Methylenchlorid durchführt.

7. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln II und III,

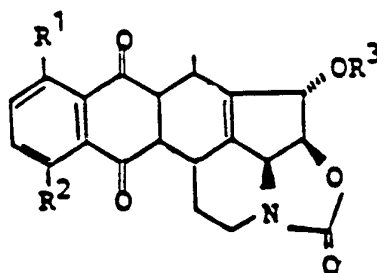


II



III

in denen R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel I,



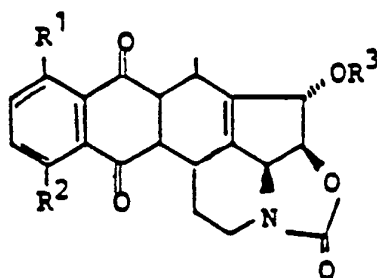
, I

in der R^1 , R^2 und R^3 die oben genannte Bedeutung haben, oxidiert werden.

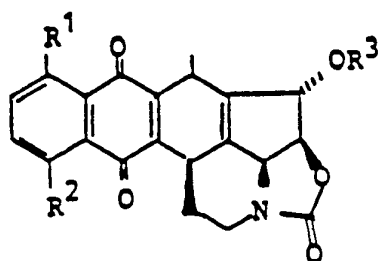
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Oxidation mit Luftsauerstoff in einer Mischung aus Wasser und einem (C_1 - C_4)-Alkohol bei pH-Werten von 9 bis 14 durchgeführt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Oxidation in wasserfreiem Methanol mit Pyridin und reinem Sauerstoff erfolgt.

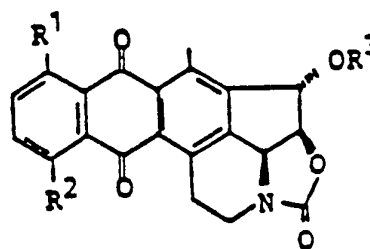
10. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II und/oder III,



, I



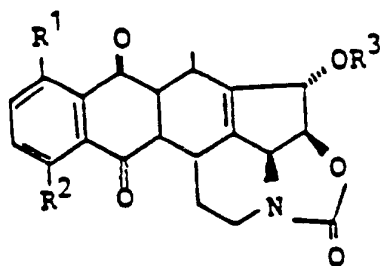
II



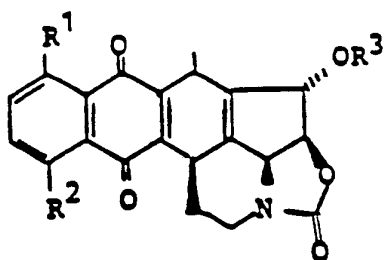
III

in denen R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten, als cytotoxisch wirkendes Agens, wobei die therapeutische Behandlung des Menschen ausgenommen ist.

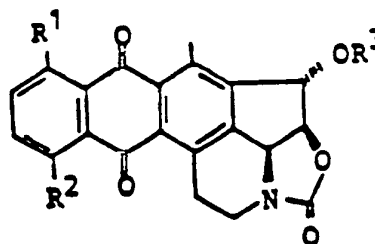
11. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II und/oder III,



, I



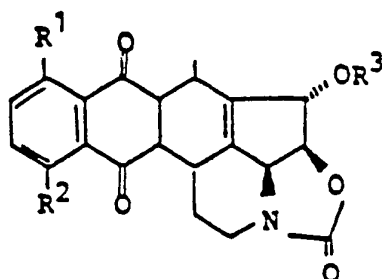
II



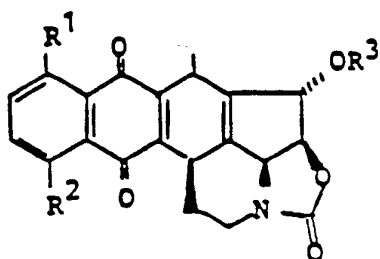
III

in denen R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten, als antimikrobiell und gegen Protozoen wirkendes Agens, wobei die therapeutische Behandlung des Menschen ausgenommen ist.

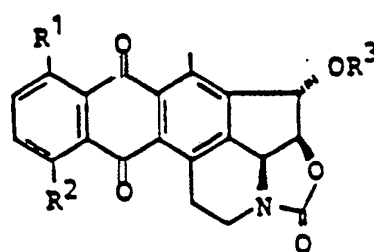
12. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II und/oder III,



, I



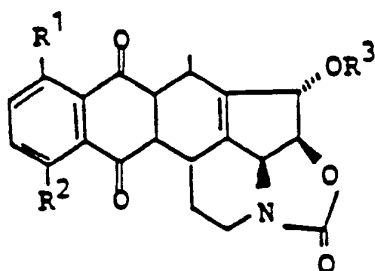
II



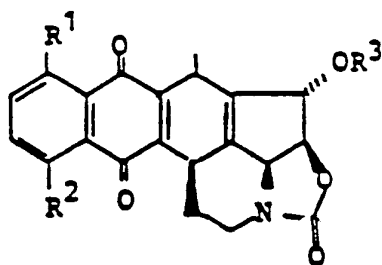
III

in denen R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten, zur Herstellung eines Arzneimittels.

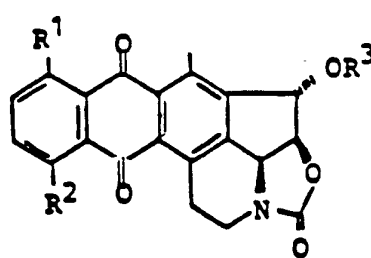
13. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II und/oder III,



, I



II



III

AT 392 277 B

in denen R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Hydroxyl und R^3 Wasserstoff oder Dimethyltertiärbutylsilyl bedeuten, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von infektiösen Krankheiten und Tumoren.

5

Hiezu 3 Blatt Zeichnungen

