

(19) DANMARK



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **146803 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4821/75

(51) Int.Cl.³: C 07 H 15/24

(22) Indleveringsdag: 27 okt 1975

(41) Alm. tilgængelig: 30 apr 1976

(44) Fremlagt: 09 jan 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 29 okt 1974 GB 46644/74

(71) Ansøger: SOCIETA *FARMACEUTICI ITALIA S.P.A.; I-20121 Milano, IT.

(72) Opfinder: Federico *Arcamone; IT, Alberto *Bargiotti; IT, Giuseppe *Cassinelli; IT, Aurelio di *Marco; IT.

(74) Fuldmægtig: Nørrejysk Patentbureau ApS

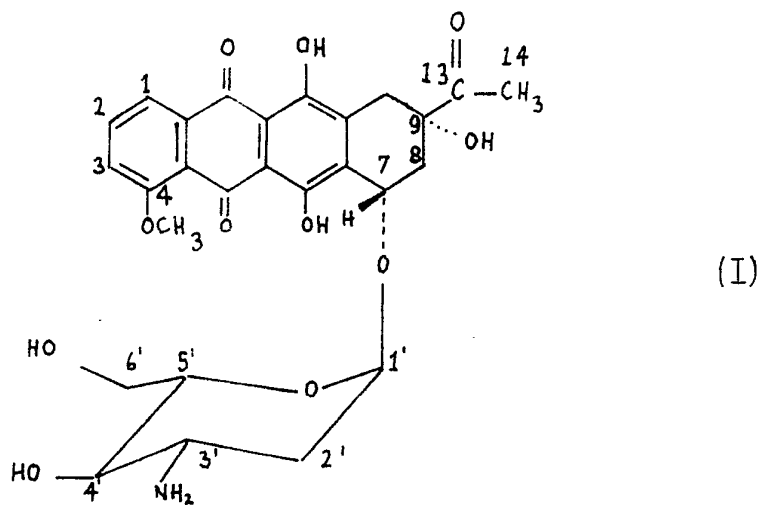
(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af 4'-e-
pi-6'-hydroxydaunomycin eller hydrochloridet
deraf**

DK 146803 B

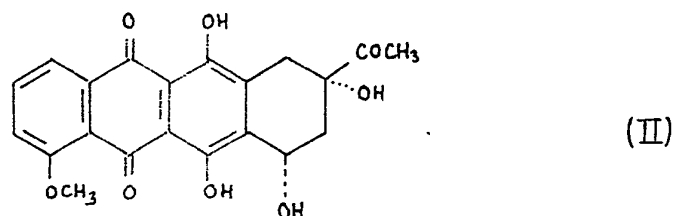
Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt antitumorglycosid, 4'-epi-6'-hydroxydaunomycin.

5 Det omhandlede glycosid udviser antimitotisk aktivitet både "in vivo" og "in vitro" og er et nyttigt terapeutisk stof ved behandlingen af tumor og virussygdomme hos mennesker.

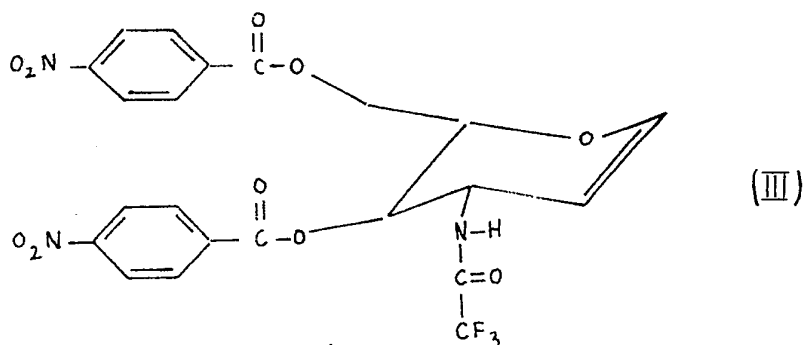
Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af 4'-epi-6'-hydroxydaunomycin (I)



10 eller hydrochloridet deraf er ejendommelig ved, at daunomycinon (II)

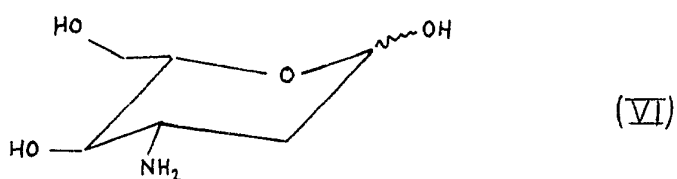


omsættes i et egnet organisk opløsningsmiddel og i tilstedeværelse af en syrekatalysator med 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluor-acetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III)

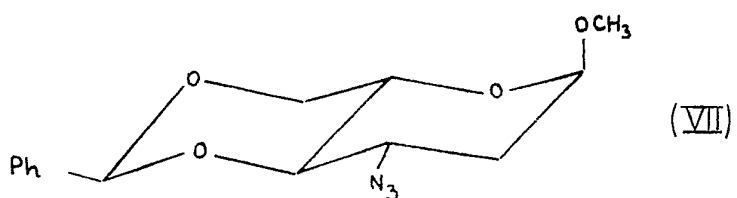


- 5 hvorefter de beskyttende grupper i det dannede beskyttede glycosid, 7-O-[4',6'-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3'-trifluor-acetamido- α -L-arabino]-daunomycinon, fjernes ved alkalisk behandling, og det ønskede produkt isoleres som hydrochloridet deraf. Det er et meget vigtigt faktum, at praktisk taget kun α -glycosidet dannes ved denne fremgangsmåde, idet β -anomeren kun forefindes i en meget lille mængde i reaktionsblandingen.
- 10

Den reaktive, beskyttede forbindelse (III), som kondenseret med daunomycinon (II) er et nyt mellemprodukt som udledes af 3-amino-2,3-dideoxy-L-arabino-hexose (VI),

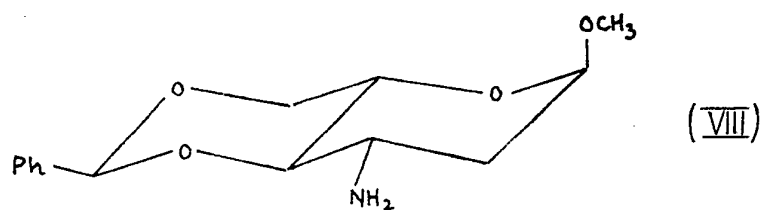


Denne aminosukker var tidligere ukendt i L-serien og er for første gang blevet fremstillet af os efter følgende fremgangsmåde. L-glucose er blevet omdannet til methyl-3-azido-4,6-O-benzyliden-2,3-dideoxy- α -L-arabino-hexopyranosid (VII)

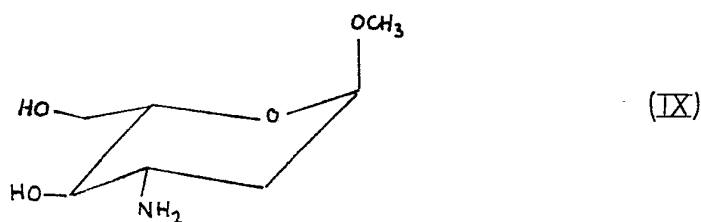


ifølge de fremgangsmåder der er kendt i litteraturen for D-isomeren (G.N. Bollenback : "Methods in carbohydrate chemistry" II, 326, 1963. Acad. Press. L.F. Wiggins, *ibid*, II, 188, 1963. A.C. Richardson : Carbohydrate Research, 4, 422, (1967)).

Denne forbindelse omdannes ved katalytisk hydrogenering til 3-amino derivatet (VIII),

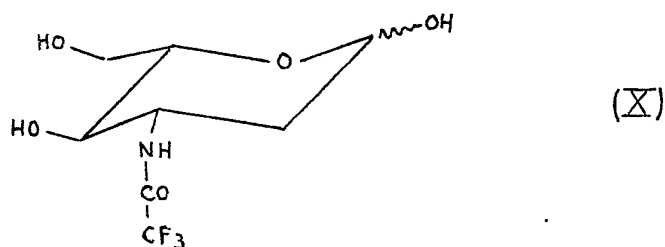


Efter at benzylidensubstituenten er fjernet, ved hjælp af hydrogenchlorid i methanol, fremkommer en methyl-3-amino-2,3-dideoxy- α -L-arabino-hexopyranosid (IX),



tidligere ukendt også i D-serien, som omdannes ved behandling med syre til den ønskede forbindelse (VI) der isoleres som hydrochlorid.

Forbindelsen (VI) behandles med trifluoreddikesyreanhydrid, og derefter med en lavere alifatisk alkohol, hvorved N-trifluoracetylderivatet (X) fremkommer,



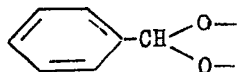
som til slut omsættes med p-nitrobenzoylchlorid i pyridin, efterfulgt af behandling med en svag base, hvorved der fremkommer 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III) i godt udbytte.

Fremstilling af mellemproduktet 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III)

2,85 g methyl-3-azido-4,6-O-benzyliden-2,3-dideoxy- α -L-arabino-hexopyranosid (VII) opløses i 40 ml vandfrit methanol og hydrogeneres ved 4,2 kp/cm² ved stuetemperatur i tilstedeværelse af Raney-nikkel i 3 timer. Katalysatoren filtreres fra og filtratet inddampes til tørhed i vacuo.

Remanensen omkrystalliseres fra ethylacetat, hvorved der fremkommer 2,17 g methyl-3-amino-4,6-O-benzyliden-2,3-dideoxy- α -L-arabino-hexopyranosid (VIII). Smp. 95-96°C; $[\alpha]_D^{20} = +86^\circ$ (c = 0,5 CHCl₃). Udbytte 84%;

p.m.r. (CDCl₃) : 1,3-2,3 δ (m, 2H, C(2)H₂),
 1,4 δ (bred s, 2H, NH₂),
 3,2-4,4 δ (flere m, 5H, C(3)H, C(4)H,
 C(5)H, C(6)H₂),
 3,37 δ (s, 3H, CH₃O),
 4,76 δ (dd, J = 3,5 Hz og J < 1 Hz, 1H,
 C(1)H),
 5,57 δ (s, 1H),



7,2-7,7 δ (m, 5H, C₆H₅) ;

massespekter : m/e 265 (M^+),
 m/e 234 ($M-OCH_3$),
 m/e 162 ($\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{H}_5\text{C}_6 \end{array} \right]^+$)
 m/e 149 ($C_6H_5-CH=O^+-CH_2-CHO$)
 m/e 105 ($C_6H_5-CO^+$)

5

2,15 g af forbindelsen (VIII) opløses i 40 ml 0,5 N hydrogenchlorid i methanol og blandingen omrøres ved stuetemperatur i 1 time. Opløsningen inddampes til det halve volumen, vandfrit ether tilsættes og de resulterende krystaller opsamles ved vacuumfiltrering og vaskes med en lille mængde tør ether, hvorved der fremkommer 1,5 g methyl-3-amino-2,3-dideoxy- α -L-arabino-hexopyranosid (IX), smp. 120°C dec. ; $[\alpha]_D^{20} = +92^\circ$ (C = 0,4 H₂O) Udbytte 87%,

10

15 p.m.r. (D₂O) : 1,5-2,5 δ (m, 2H, C(2)H₂),
 3,2-4,0 δ (flere m, 5H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(6)H₂),
 3,41 δ (s, 3H, CH₃O-),
 4,98 δ (dd, J = 3 Hz og J = 1,5 Hz, 1H, C(1)H);

20

massespekter : m/e 178 ($M + 1$),
 m/e 146 ($M-31$)
 m/e 86 ($H_2N^+ = \overset{3}{CH}-\overset{2}{CH}=\overset{1}{CH}-OCH_3$),
 m/e 72 ($H_2N^+ = CH-CH_2-CHO$),
 25 m/e 59 ($H_2N^+ = CH-CH-OH$),
 m/e 44 ($\begin{array}{c} \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H}^+ \end{array}$)

1,5 g af aminoglycosidet (IX) koges med N saltsyre under tilbageløbskøling i 5 timer. Opløsningen omrystes ved stuetemperatur med "Amberlite" IR 45 (OH⁻) ionbytter indtil

pH-værdien er 5. Ionbytteren filtreres fra og filtratet inddampes i vacuo til det halve volumen og frysetørres derefter. Remanensen omkrystalliseres fra methanol-ethyl-acetat, hvorved der fremkommer 1,33 g 3-amino-2,3-dideoxy-
 5 -L-arabino-hexose (VI) som hydrochlorid, smp. 155-157° C
 dec. $[\alpha]_D^{20} = + 55^\circ$ (c = 0,5 H₂O). Udbytte 95%;

p.m.r. (D₂O) : 1,7-2,7 δ (m, 2H, C(2)H₂),
 3,3-4,1 δ (flere m, 5H, C(3)H, C(4)H,
 C(5)H, C(6)H₂),
 10 5,06 δ (dd, J = 10 Hz og J = 2 Hz,
 0,4 H, C(1)H_{ax}),
 5,46 δ (bred s, W_{1/2}H = 7 Hz, 0,6 H,
 C(1)H_{eq}).

Til en suspension af 1,25 g af forbindelsen (VI) i tør
 15 ether sættes 7,6 ml trifluoreddikesyreanhydrid under af-
 køling og omrøring. Blandingen omrøres ved stuetemperatur
 i 20 timer og den resulterende klare opløsning inddampes
 in vacuo. Den faste remanens opløses i 20 ml vandfri me-
 thanol og henstilles ved stuetemperatur i 20 timer. Efter
 20 at opløsningsmidlet er fjernet omkrystalliseres remanensen
 fra acetone-chloroform, hvorved der fremkommer 1,72 g
 2,3-dideoxy-3-trifluoracetamido-L-arabino-hexose (X), smp.
 177°C, $[\alpha]_D^{20} = + 58^\circ$ (c = 0,5 dioxan). Udbytte 90%.

massespekter : m/e 242 (M-OH),
 25 m/e 169 ($\left[\begin{array}{c} \text{CF}_3 - \text{C} - \text{NH} - 3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \right. \begin{array}{c} \text{HO} \\ \triangle \\ \text{2} \end{array} \left. \right]^+$),
 m/e 155 (HO-CH-CH=NH-COCF₃),
 m/e 140 (CF₃-CO-N⁺ <),
 H
 m/e 114 (CF₃-CO-N⁺H₃).

1,1 g af forbindelsen (X) sættes, i små portioner i løbet af 30 minutter under omrøring og ved stuetemperatur, til en opløsning af 3,17 g p-nitrobenzoylchlorid i 30 ml tør pyridin og omrøringen fortsættes ved stuetemperatur i 20 timer. Til opløsningen, afkølet til 0°C, sættes en isafkølet opløsning af 1,44 g natriumhydrogencarbonat i 20 ml vand og blandingen hældes derefter i 350 ml isvand.

Bundfaldet fjernes ved filtrering, vaskes med vand og tørres over phosphorpenntaoxid. Det tørre produkt omkrystalliseres fra dichlormethan-ether, hvorved der fremkommer 2,3 g af det ønskede produkt : 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III), smp. 214-215°C, $[\alpha]_D^{20} = +117^\circ$ (c = 0,5 CHCl₃). Udbytte 95%.

p.m.r. (CDCl₃ - DMSO - d₆ 3:1) :

4,3-5,6 δ (flere m, 4H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(2)H),

4,52 δ (bred s, W_{1/2} H, 2H, C(6)H₂),

6,57 δ (bred s, W_{1/2} H = 5 Hz, 1H, C(1)H),

8,21 δ (s, 4H aromatisk),

8,35 δ (s, 4H aromatisk),

9,27 δ (s, 1H, NH).

Det følgende eksempel belyser fremgangsmåden ifølge opfindelsen nærmere.

Fremstilling af 4'-epi-6'-hydroxydaunomycin (I) (IMI 23)

200 mg daunomycinon (II) opløses i 100 ml vandfrit benzen, til denne opløsning sættes 540 mg 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III) og 20 mg p-toluensulfonsyre. Reaktionsblandingen omrøres ved 55°C i 20 timer og efter afkøling til stuetemperatur filtreres det dannede bundfald fra og omkrystalliseres fra ethanol, hvorved man får 340 mg af den beskyttede 7-O-[4',6' -di-O-(p-nitrobenzoyl)-3'-tri-fluoracetamido-α-L-arabino]-daunomycinon ; Smp. 282°C. $[\alpha]_D^{20} =$

+260° ± 5° (c = 0,05 CHCl₃).

Det beskyttede glycosid opløses i 20 ml dioxan og behandles, efter afkøling til 0°C, med 0,2 N vandig natriumhydroxidopløsning. Efter 1 time ved 0°C indstilles opløsningens pH til 4,5 med 1 N saltsyre og dioxan fjernes ved inddampning in vacuo. Den resulterende vandige opløsning indstilles, efter vask med chloroform, til pH 8,5 med 0,2 N vandig natriumhydroxid og ekstraheres med chloroform. Ekstraktet tørres over vandfrit natriumsulfat og koncentrerer til et lille volumen.

En ækvivalent saltsyre i methanol tilsættes, hvorved man får 160 mg 4'-epi-6'-hydroxy-daunomycin som hydrochlorid, smp. 199-201°C, $[\alpha]_D^{20} = +388^\circ \pm 5^\circ$ (c = 0,05 CH₃OH); udbytte 56%.

Biologisk aktivitet

15 Materialer og metoder

In vitro forsøg

HeLa celler blev udsat for de forbindelser, der skulle afprøves i 2-8-24 timer, derefter blev forbindelserne fjernet og cellerne blev udsået på 5 mm Falcon plastik skåle (200 celler/skål) i vækstmedium. Koloniantal blev bestemt mikroskopisk 5 døgn senere. Museembryofibroblaster (MEF) blev udsået på 35 mm Falcon (varemærke) plastik skåle, inficeret 24 timer senere med Moloney virus (MSV), og behandlet i 3 døgn med forskellige koncentrationer af forbindelserne. Antal foci af transformerede celler blev mikroskopisk bestemt 5 døgn efter infektionen. Uinficerede MEF blev behandlet på lignende måde; i slutningen af eksperimentet blev cellerne talt i et hæmocytometer.

I alle forsøgene blev cellerne incuberet i en 5% CO₂ incubator ved 37°C. Forbindelserne blev opløst i destilleret vand og derefter fortyndet i kulturmedium.

Resultaterne er opgivet som ID₅₀ (Inhibitor-dosis 50%), beregnet efter dosis/effekt kurver.

In vivo forsøg.

Antitumoraktiviteten for de undersøgte forbindelser blev undersøgt på ascites Sarcoma 180. 3 måneder gamle CD 1 mus blev anvendt. Sarcoma 180 ascites celler blev intraperitonealt inoculeret (10^6 celler/mus).

Forbindelserne blev opløst i destilleret vand og derefter fortyndet i Ringer opløsning, og anvendt intraperitonealt 1 døgn efter tumorimplantationen (10 ml/kg legemsvægt). Den toksiske virkning blev bestemt ved makroskopisk autopsiske resultater, hovedsageligt som reduktion af miltstørrelsen. Sammenligning af forbindelsernes effektivitet blev baseret på maksimal forøgelse af middelloverlevelsestid, sammenlignet med ubehandlede kontroller, over det anvendte dosisområde. Antallet af langtidsoverlevende (LTS) henviser til tumorfri mus ved slutningen af forsøget (60 dage).

Resultater

Aktiviteten af den undersøgte forbindelse sammenlignet med den respektive stamforbindelse, daunomycin, på de undersøgte "in vitro" systemer er angivet i tabel 1.

4'-epi-6'-hydroxydaunomycin viste en lavere aktivitet end stamforbindelsen på HeLa celler, på MSV foci og på MEF proliferation.

Tabel 2 angiver den observerede effekt på ascites Sarcoma 180. Den optimale antitumordosis (det er den dosis, hvor maksimal antitumoreffekt blev fundet) var på 10 mg/kg.

Ved den optimale dosis var antitumoraktiviteten, bedømt ud fra forøgelsen af levetiden af behandlede mus sammenlignet med kontrollerne, lavere end den der blev observeret efter daunomycin-behandling.

Med hensyn til den toksiske virkning, en betydningsfuld og ofte afgørende faktor som må tages i betragtning efter en

forlænget behandling med store kumulative doser af antitumorantibiotika, kan det iagttages at det nye afprøvede derivat er afgørende mindre toksisk end stamforbindelsen.

Tabel 1

5 "In vitro" aktivitet af 4'-epi-6'-hydroxy-daunomycin ID₅₀
(ng/ml)

Laboratoriekode	Forbindelse	HeLa celler			MSV foci-dannelse	MEF proliferation
		kloneffektivitet				
10	Exponeringstid for lægemiddel (timer)	2	8	24	72	72
	Daunomycin ^o	30	13	3	5,5	9
15	IMI 23 4'-epi-6'-hydroxydaunomycin	I*	I*	1300	100	250

* = ikke aktiv ved den maximale dosis, der blev testet (10 µg/ml)

o = gennemsnitsværdi for flere eksperimenter

Tabel 2

Aktivitet af 4'-epi-6'-hydroxy-daunomycin på ascites
Sarcoma 180^x.

5	Laborato- rie kode	Forbindelse	Dosis (mg/kg)	T/C ^o %	LTS ⁺	Toks. [†]
10	IMI 23	Daunomycin [□]	0,5 1 2 5 8	146 172 192 176 78	3/20 8/55 11/68	14/50 7/10
		4'-epi-6'-hy- droxydaunomycin	2 10 50	100 167 137		1/10

x = 1 behandling i.p. på 1. dag

15 o = middelloverlevelsestid i % over kontrollerne

+ = langtidsoverlevende ved 60 døg

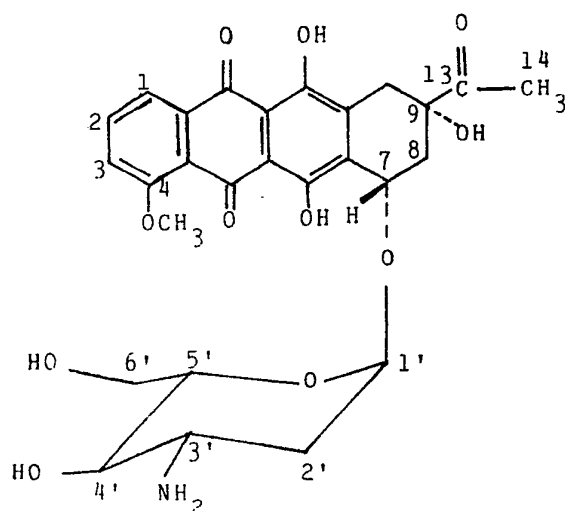
† = mus som døde af toksiske virkninger sammenlignet med
det totale antal

□ = gennemsnitsdata for et antal forsøg

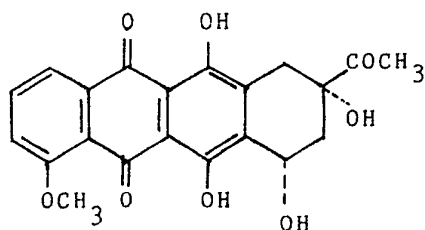
20 Optimale doser er understreget.

Patentkrav

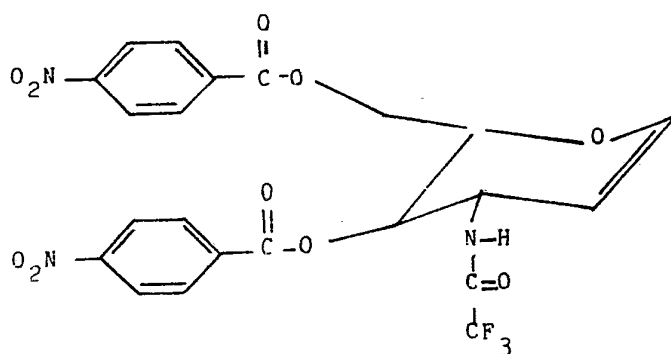
Analogifremgangsmåde til fremstilling af 4'-epi-6'-hydroxydaunomycin med formelen I



eller hydrochloridet deraf
 k e n d e t e g n e t v e d , a t d a u n o m y c i n o n m e d
 5 f o r m l e n I I



omsættes i et egnet organisk opløsningsmiddel og i tilstedeværelse af en syrekatalysator med 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose med formelen III



- 5 hvorefter de beskyttende grupper i det dannede beskyttede glycosid, 7-O-[4',6'-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3'-trifluoracetamido- α -L-arabino]-daunomycinon, fjernes ved alkalisk behandling, og det ønskede produkt isoleres som hydrochloridet deraf.

Fremdragne publikationer:
