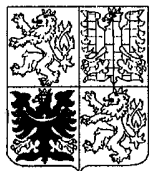


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.05.1998**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.05.1997**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/204197**
(33) Země priority: **CA**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/CA98/00401**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/50378**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 89

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 305/14

(71) Přihlašovatel:
LIU Jian, Fredericton, CA;

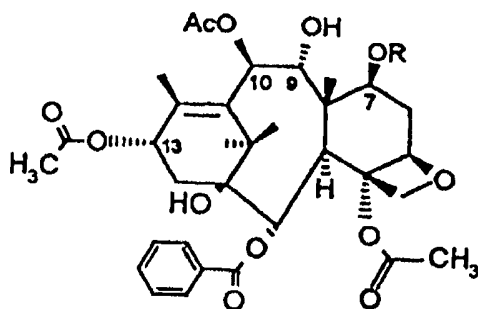
(72) Původce:
Liu Jian, Fredericton, CA;

(74) Zástupce:
Vandělková Jana Ing., Petráská 12, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Postup konverze 9-dihydro-13-acetylbaecatinu
III na taxol a jeho deriváty**

(57) Anotace:

Je popsán postup přípravy taxolu, jeho analogů a jejich meziproduktů. Postup sestává z ochrání hydroxyskupiny C-7 ve sloučenině 9-dihydro-13-acetylbaecatinu III vhodnou ochrannou skupinou; oxidace hydroxyskupiny na C-9; a addice vhodného postranního řetězce do polohy C-13). Mezi produkty patří sloučenina obecného vzorce (I) v níž se R vybírá ze skupiny sestávající z benzylu, substituovaného benzylu, benzylformiátu, substituovaného benzylformiátu, tosyly, substituovaného tosyly, dihydropyranu, methoxymethylu, benzoylu a substituovaného benzoylu.



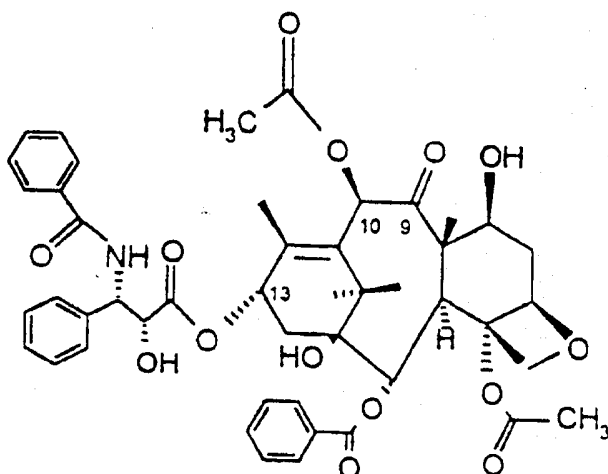
Postup konverze 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III na taxol a jeho deriváty

Oblast techniky

Předložený vynález se týká konverze 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III na taxol a zvláště se týká postupu konverze 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III na taxol, baccatin III, 10-deacetylbaccatin III a jejich meziprodukty.

Dosavadní stav techniky

Paclitaxel (taxol) představovaný strukturním vzorcem



je potenciální protinádorovou sloučeninou. Paclitaxel představuje jedinečný mechanismus pro předcházení růstu rakovinových buněk ovlivněním mikrotubulů, které hrají důležitou úlohu při dělení buněk a dalších buněčných funkcí. Na počátku buněčného dělení se vytvoří velké množství mikrotubulů a jakmile dělení skončí,

mikrotubuly normálně prasknou. Taxol zabraňuje mikrotubulům v praskání, což má za následek koagulaci rakovinových buněk do té míry, že buňky přestanou růst a dělit se.

Taxol je klinicky účinný při léčbě rakoviny vaječníků a prsů vzdorujících léčbě a představuje slibné působení proti velkému počtu jiných typů rakoviny jako je rakovina jater, pobřišnice, krku, prostaty, tračnicku a jícnu.

Taxol se nejprve extrahuje z pacifického tisu *Taxus brevifolia*. Naneštěstí rostou tisy velmi pomalu, přibližně osm palců za rok a strom je tudíž jen omezeným zdrojem taxolu. To vedlo výzkumníky k hledání alternativních způsobů výroby taxolu a jeho analogů, které mohou disponovat vynikajícím protinádorovým působením.

Podstata vynálezu

Jednou stránkou předloženého vynálezu je postup přípravy taxanu obsahující krok oxidace polohy C-9 v 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III vhodným oxidačním činidlem jakým je tetra-n-propylamoniumperruthenát, Collinovo činidlo nebo aktivovaný methylsulfoxid (DMSO).

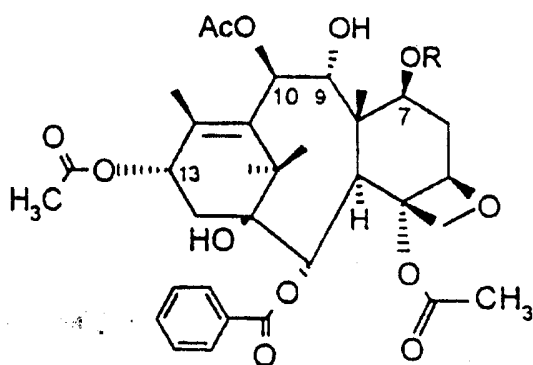
Další stránkou předloženého vynálezu je zabezpečení postupu přípravy taxolu a jeho derivátů spočívající v těchto krocích:

- (a) chránění C-7 hydroxy skupiny 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III vhodnou chránicí skupinou pro získání chráněného produktu; a
- (b) oxidaci C-9 hydroxy skupiny chráněného produktu.

Ochranná skupina se přednostně vybírá ze skupiny sestávající z benzylu, substituovaného benzylu, benzylformiátu, substituovaného benzylformiátu, tosyly, substituovaného tosyly, dihydropyranu, methoxymethylu, benzoylu a substituovaného benzoylu.

Postup může dále obsahovat stupně deacetylace polohy C-13 a zrušení chránění polohy C-7 k získání baccatinu III. Po deacetylaci polohy C-13 lze alternativně deacetylovat polohu C-10 a lze zrušit chránění polohy C-7 k získání 10-deacetylbaaccatinu III. Alternativně je možné po deacetylaci C-13 přidat k poloze C-13 vhodný postranní řetězec a u výsledného meziproduktu selektivně zrušit chránění a získat požadovaný produkt taxol. K získání taxolu se zrušení ochrany provádí na poloze C-7 a poloze 2'. Vhodnými postranními řetězci jsou (2R,2S)-N-benzoyl-O-(1-ethoxyethyl)-3-fenylisoserin a (3R,4S)-3-(1-ethoxyethoxy)-4-(fenyl)-N-benzoyl-2-azetidinon.

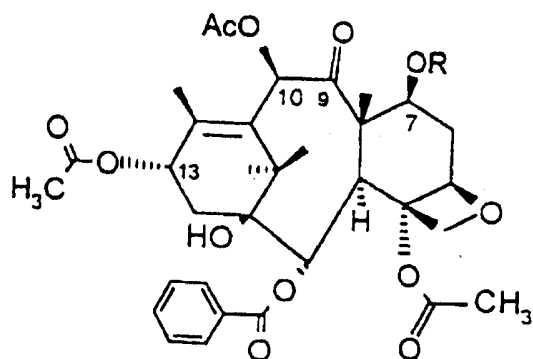
Pohlíženo jinak na předložený vynález, jde o sloučeninu následující chemické struktury:



(I)

kde se R vybírá ze skupiny sestávající z benzylu, substituovaného benzylu, benzylformiátu, substituovaného benzylformiátu, tosyly, substituovaného tosyly, dihydropyranu, methoxymethylu, benzoylu, substituovaného benzoylu, benzoylmethylu a substituovaného benzoylmethylu.

Pohlíženo jinak na předložený vynález, jde o se sloučeninu obecného vzorce :



(II)

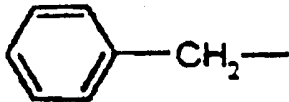
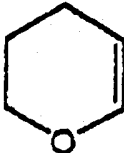
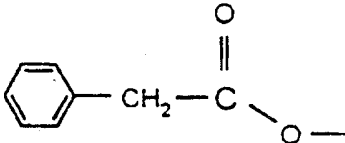
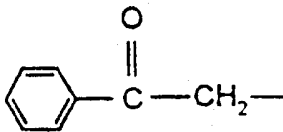
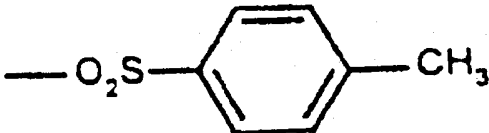
kde se R vybírá ze skupiny sestávající z benzylu, substituovaného benzylu, benzylformiátu, substituovaného benzylformiátu, tosyly, substituovaného tosyly, dihydropyranu, methoxymethylu, benzoylu, substituovaného benzoylu, benzoylmethylu a substituovaného benzoylmethylu.

Příklady provedení

Podrobný popis vynálezu

Tabulka 1 uvádí seznam chemických struktur sloučenin zde použitých a jejich definice a chemické struktury, které budou v průběhu popisu tohoto vynálezu používány.

Tabulka 1. Definice a chemické struktury

Název	Definice /chemická struktura
Funkční skupina	atom nebo skupina atomů mající charakteristickou chemickou reaktivitu
Benzyl	
Substituovaný benzyl	benzylová skupina podle výše uvedené definice substituované jednou nebo více funkčními skupinami
Dihydropyran	
Benzylformiát	
Substituovaný benzylformiát	benzylformiát podle výše uvedené definice substituované jednou nebo více funkčními skupinami
Methoxymethyl	- CH ₂ - O - CH ₃
Benzoylmethyl	
Substituovaný benzoylmethyl	benzoylmethyl podle výše uvedené definice substituované jednou nebo více funkčními skupinami
Tosyl	
Substituovaný tosyl	tosyl podle výše uvedené definice substituované jednou nebo více funkčními skupinami

28.04.00

PV 2000 - 89

Č. J. 31797

- 6 -

Výchozí látku 9-dihydro-13-acetylbaccatin III lze získat různými způsoby včetně extrakce z druhu tisu (*Taxus*) popsané v přihlášce kanadského patentu č. 2,203,844 podané 28. dubna 1997 a publikované na konci října 1998. Ve stručnosti: izolační postup vyžaduje sběr rostlinného materiálu jako jsou větvičky a jehličí, rozemletí a extrakci materiálu v methanolu. Extrakce se provádí po dobu 24 hodin, výsledná směs se filtruje a extrakt odebírá. Extrakt se koncentruje na přibližně 10 % původního objemu odpařením a dále se zředí vodou. Vodný roztok se několikrát extrahuje hexanem za vzniku vodné vrstvy a nevodné vrstvy. Vodná vrstva se několikrát extrahuje chloroformem nebo dichlormethanem. Chloroformové nebo dichlormethanové extrakty se zkoncentrují do sucha a zbytek se rozpustí ve směsi chloroformu, methanolu a acetonu (10:1:0,5) a frakcionuje suchou chromatografickou kolonou za získání frakcí taxolu a 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III. Frakce se sloučí, extrahují a 9-dihydro-13-acetylbaccatin III se nechá vykristalizovat.

Taxol a jeho deriváty lze syntetizovat z 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III mnoha kroky spočívajícími v chránění, oxidaci, reakci a zrušení chránění. Podle postupů znázorněných například ve schématech 1 - 3 se 9-dihydro-13-acetylbaccatin III nejprve chrání na poloze C-7 přidáním ochranné skupiny jako je methoxybenzyllová nebo tosylová skupina za vzniku chráněného meziprojektu jako je sloučenina 2, 7 nebo 16. Dalšími vhodnými ochrannými skupinami jsou substituovaný benzyl, dihydropyran, benzylformiát (CBZ), substituovaný benzylformiát, methoxymethyl (MOM), benzoylmethyl (BOM) a substituovaný benzoylmethyl.

Chráněný meziprodukt se v poloze C-9 oxiduje vhodným oxidačním činidlem jako je například tetra-n-propylamoniumperruthenát (TPAP), Collinovo činidlo (oxid chromový a pyridin v dichlormethanu) nebo aktivovaným methylsulfoxidem (DMSO) za získání oxidovaného meziproduktu jako je sloučenina 3, 8 nebo 17. Oxidovaný meziprodukt může být deacetylován v poloze C-13 například reakcí s butyllithiem v hexanu nebo methyllithiem za získání analogu baccatinu III jako je sloučenina 4 nebo 9. V závislosti na požadovaném produktu může být analog baccatinu III zbaven chránicí skupiny například 2,3-dichlor-5,6-dikyanbenzochinonem (DDQ) za vzniku baccatinu III (15) nebo dále ponechán reagovat za případného získání 10-deacetylbaccatinu III (13) nebo taxolu (18) nebo jiných požadovaných produktů.

Pro získání 10-deacetylbaccatinu se analog baccatinu III (4) dále deacetyluje v poloze C-10 reakcí například s triethylaminem v hydridu sodíku na sloučeninu 12, u které se pak zruší ochrana. K získání taxolu se postranní řetězec taxolu v poloze C-13 adduje na analog baccatinu III reakcí například s (2R,2S)-N-benzoyl-O-(1-ethoxyethyl)-3-fenylisoserinem a lithium hexamethyldisilazidem za vzniku analogu taxolu jako je sloučenina 5 nebo 10. U analogu taxolu se dále odstraní chránění v poloze 2' reakcí například s 1 % kyselinou chlorovodíkovou a v poloze C-7 reakcí například s triethylaminem a UV zářením za vzniku taxolu. Jiné vhodné postranní řetězce na C-13 jako je (3R,4S)-3-(1-ethoxyethoxy)-4-(fenyl)-N-benzoyl-2-azetidinon mohou být k získání analogů taxolu použity také.

Odborníci si jistě uvědomí, že k získání stejných výsledků lze použít i jiných reakčních činidel a výchozích látek, a že kroky chránění, oxidace a zrušení ochrany mohou být provedeny podle potřeby v různém pořadí nebo jiným počtem kroků, a že schémata 1-3 mají na mysli tyto možnosti.

Chemical reaction scheme showing the synthesis of compound 13 from compound 1:

1. Compound 1 reacts with $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{Cl}$ in the presence of NaH and $n\text{-Bu}_4\text{NI}$ to form compound 2.

2. Compound 2 is converted to compound 3 using TPAP , NMO , and RT .

3. Compound 3 is converted to compound 4 using CH_3Li and -44°C .

4. Compound 4 is converted to compound 15 using DDQ and $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ (18:1).

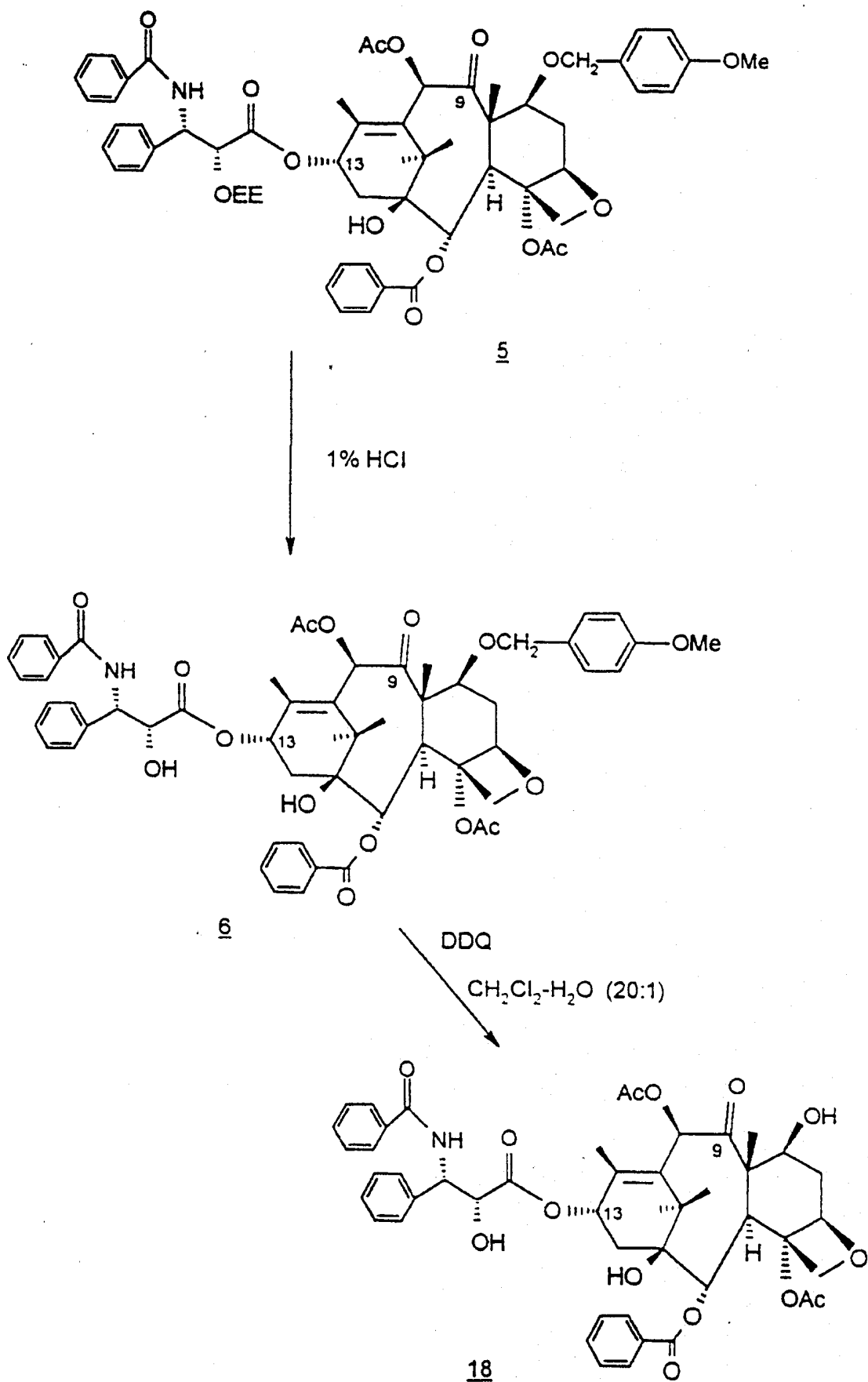
5. Compound 15 is converted to compound 12 using Et_3N and NaH .

6. Compound 12 is converted to compound 13 using DDQ and $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ (20:1).

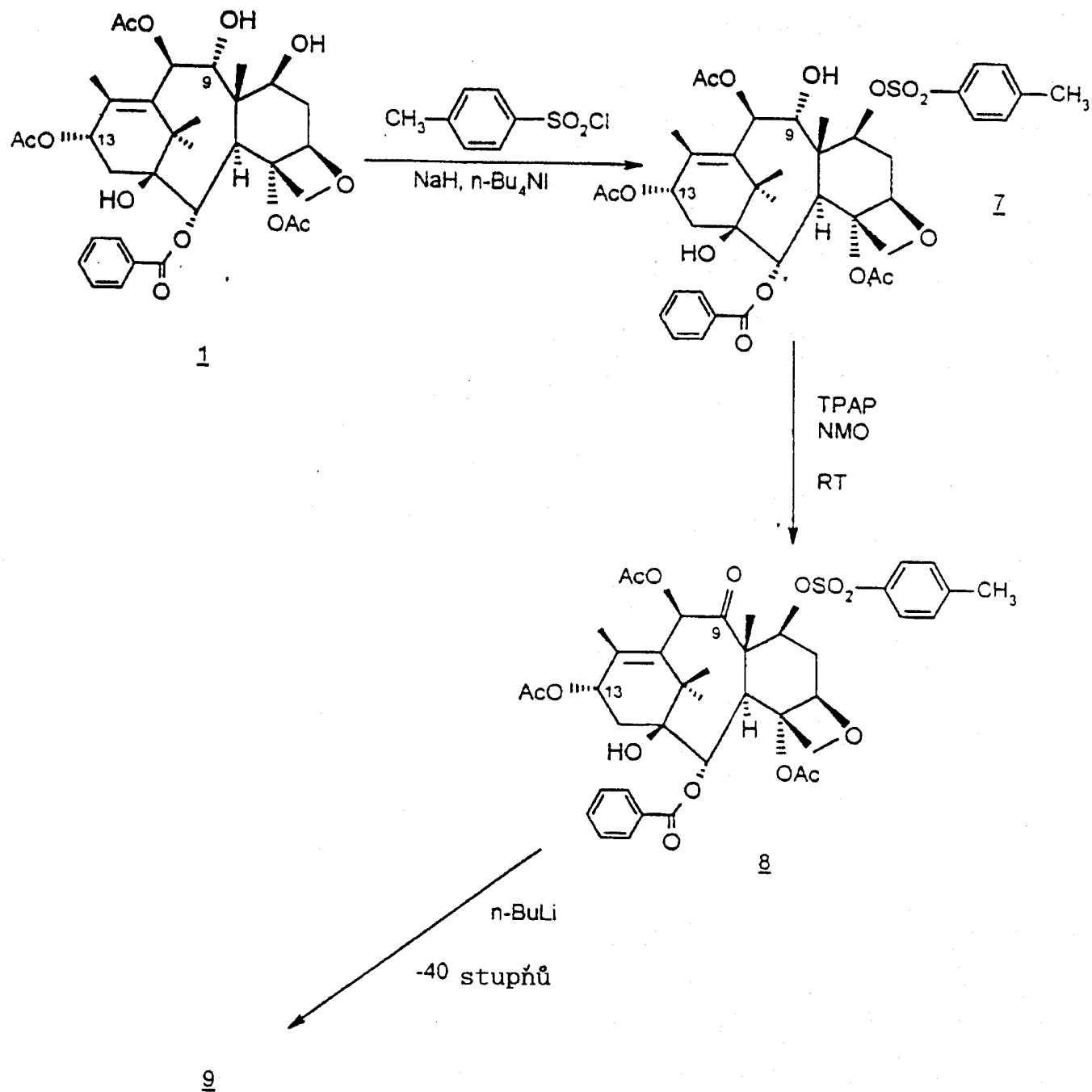
7. Compound 3 is also converted to compound 5 using LiHMDS .

8. A side reaction shows compound 3 reacting with a chiral auxiliary (nebo) to form a cyclic intermediate.

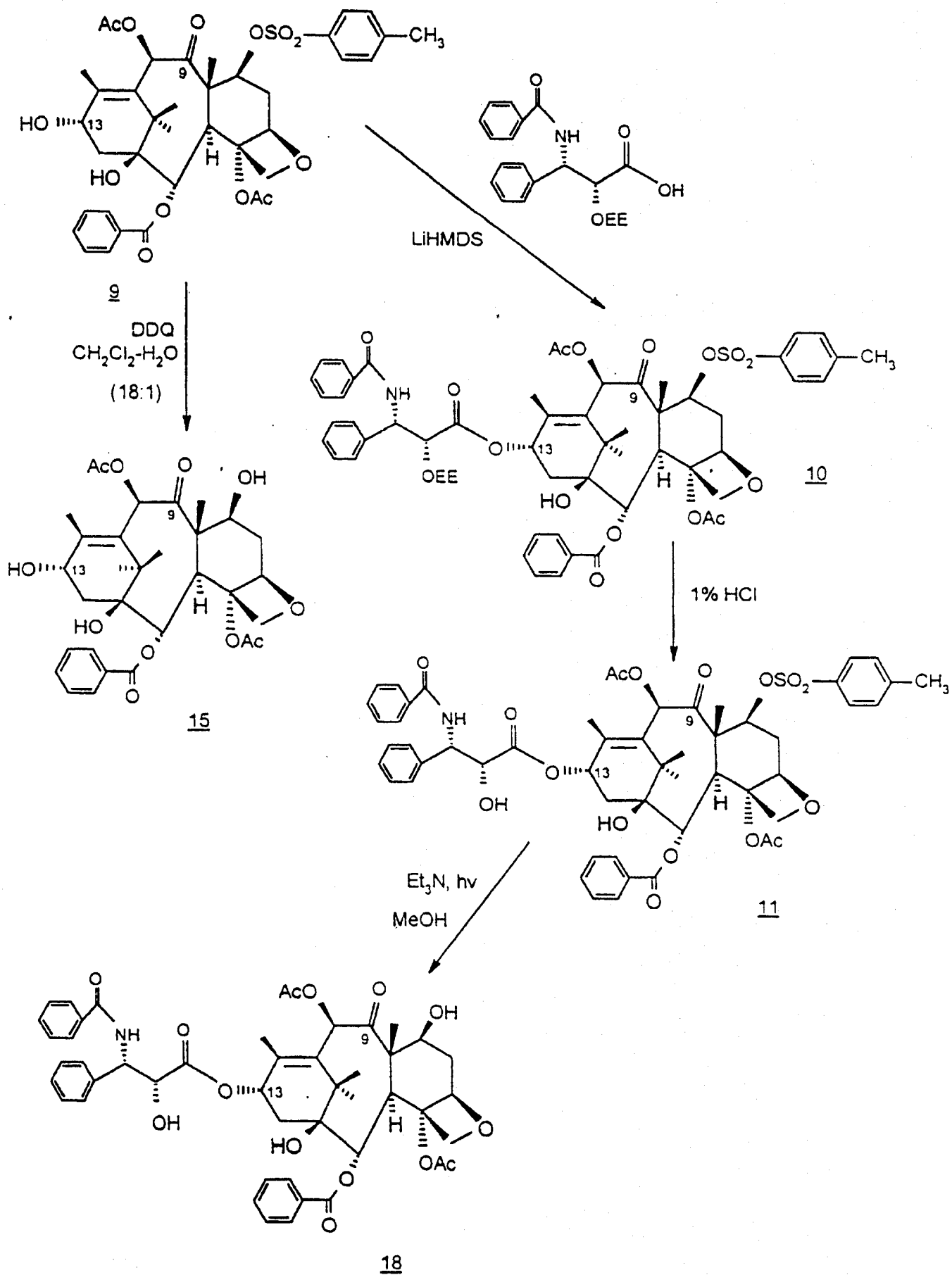
Schema 1 pokračování.



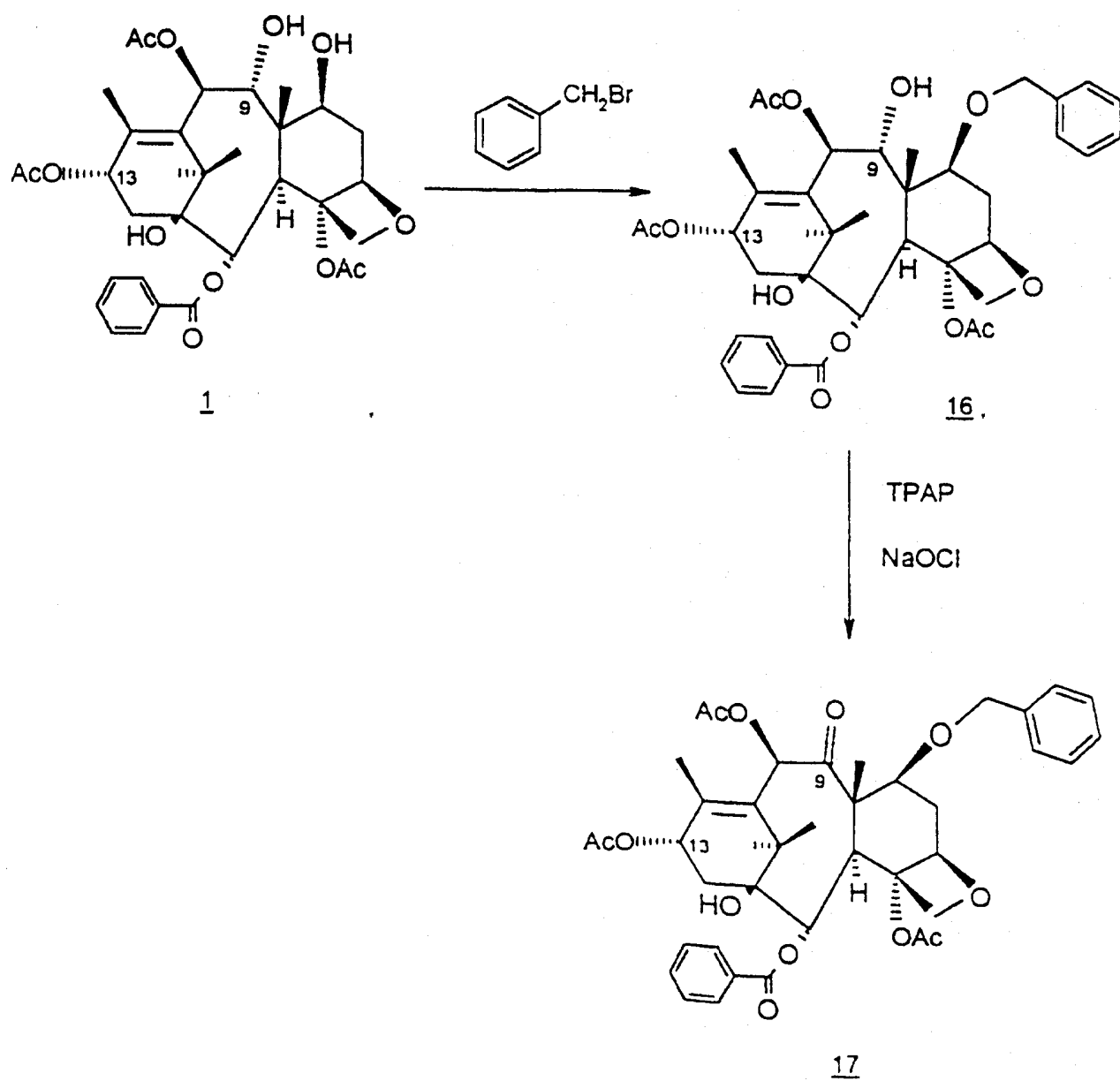
Schema 2



Schema 2 pokračování



Schema 3



28.04.00

- 13 -

PV 2000-88
Č. J. 31797

- 1 9-dihydro-13-acetylbaccatin III
- 2 7-O-p-methoxybenzyl-9-dihydro-13-acetylbaccatin III
- 3 7- O-p-methoxybenzyl-13-acetylbaccatin III
- 4 7- O-p-methoxybenzylbaccatin III
- 5 7-O-p-methoxybenzyl-(2'-ethoxyethyl)taxol
- 6 7-O-p-methoxybenzyltaxol
- 7 7-O-tosyl-9-dihydro-13-acetylbaccatin III
- 8 7-O-tosyl-13-acetylbaccatin III
- 9 7-O-tosylbaccatin III
- 10 7-O-tosyl-(2'-ethoxyethyl)taxol
- 11 7-O-tosyltaxol
- 12 10-deacetyl-7- O-p-methoxybenzylbaccatin III nebo 7- O-p-methoxybenzyl-10-deacetylbaccatin III
- 13 10-deacetylbaccatin III
- 15 baccatin III
- 16 7-O-benzyl-9-dihydro-13-acetylbaccatin III
- 17 7-O-benzyl-13-acetylbaccatin III
- 18 taxol nebo paclitaxel

Materiály

Všechna činidla byla získána od Aldrich Chemicals, USA

Příklad 1

Příprava taxolu

Krok 1(a): 7-O-p-methoxybenzyl-9-dihydro-13-acetylbaccatin III (2)

20 mg 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III (1) a 100 mg n-tetrabutylamoniumjodidu bylo rozpuštěno ve 3 ml dichlormethanu (CH_2Cl_2) ve 25 ml baňce s kulatým dnem. Bylo přidáno 23 mg hydridu sodného (NaH) a za laboratorní teploty směs míchána po dobu pěti minut. Po kapkách bylo během 5 minut přidáváno 0,1 ml p-methoxybenzylchloridu a teplota zvýšena na 45°C. Směs byla míchána po dobu 24 hodin a po této době bylo k zastavení reakce přidáno 30 ml destilované vody. Produkt byl extrahován dichlormethanem, přečištěn preparativní chromatografií na tenké vrstvě (TLC) a podle identifikace NMR spektroskopii získáno 17 mg 7-O-p-methoxybenzyl-9-dihydro-13-acetylbaccatinu III, sloučeniny 2.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ : 8,10 (d, Ar-H-2, H-6); 7,60 (t, Ar-H-4); 7,50 (t, Ar-H-3, H-5); 7,21 (d, 2Ar-H); 6,90 (d, 2Ar-H); 6,30 (d, H-10); 6,17 (t, H-13); 5,80 (d, H-2); 4,92 (d, H-5); 4,75 (dd, H-7), 4,50 (d, H-9); 4,31 (d, H-20a); 4,29 (d, H-20b); 4,15 (s, - OCH_2); 3,80 (s, OCH_3); 3,01 (s, H-3); 2,59 (m, H-6); 2,26 (s, $\text{CH}_3\text{C=O}$); 2,18 (s, $\text{CH}_3\text{C=O}$); 2,10 (H-14a); 2,02 (s, $\text{CH}_3\text{C=O}$); 1,97 (s, CH_3); 1,85 (H-14b); 1,77 (s, CH_3); 1,75 (s, CH_3); 1,26 (s, CH_3) ppm.

Krok 1(b): 7- O-p-methoxybenzyl-13-acetylbaccatin III (3)

Ve 25 ml baňce s kulatým dnem bylo k 10,8 mg 4-methylmorfolin-N-oxidu (NMO) přidáno 10 mg produktu z kroku 1(a), sloučeniny 2 a směs rozpuštěna ve 3 ml dichlormethanu. Ke směsi bylo přidáno molekulové síto 4A a mícháno po dobu 5 minut. Dále bylo přidáno 3,5 mg tetra-n-propylamonium perruthenátu (TPAP) a směs za laboratorní teploty míchána po dobu 6 hodin, po které byla teplota zvýšena na 40°C. Při této teplotě byla směs k dovršení reakce ponechána přes noc. Jakmile reakce skončila, byla směs vylita na krátkou kolonu se silikagelem. Kolona byla eluována 50 ml chloroformu (CHCl_3) a získána chloroformová frakce, která byla zkoncentrována do sucha. Zbytek byl přečištěn preparativní TLC za získání 2 mg bílých jehliček, které byly NMR spektroskopií identifikovány jako 7- O-p-methoxybenzyl-13-acetylbaccatin III, sloučenina 3.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 8,10 (d, Ar-H-2, H-6); 7,60 (t, Ar-H-4); 7,49 (t, Ar-H-3, H-5); 7,22 (s, 4Ar-H); 6,28 (s, H-10); 6,18 (t, H-13); 5,65 (d, H-2); 5,60 (dd, H-7); 5,27 (s, $-\text{OCH}_3$); 4,95 (d, H-5); 4,33 (d, H-20a); 4,17 (d, H-20b); 3,95 (s, $-\text{OCH}_2$); 3,81 (d, H-3); 2,60 (m, H-6); 2,35 (s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$); 2,22 (dd, H-14a); 2,20 (s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$); 2,15 (s, CH_3); 2,05 (s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$); 2,01 (H-14b); 1,96 (s, CH_3); 1,24 (s, CH_3); 1,18 (s, CH_3) ppm.

Krok 1 (c): 7- O-p-methoxybenzylbaccatin III (4)

50 mg produktu z kroku 1(b) sloučeniny 3 bylo rozpuštěno v 5 ml tetrahydrofuranu při -44°C a k odstranění acetylové skupiny C-13 po kapkách přidáváno 5 molekvivalentů methyllithia. Po ukončení deacetylační reakce byla směs roztřepána mezi 50 ml směsí nasyceného ústojného roztoku chloridu amonného a dichlormethanu (1 : 1).

Organická vrstva byla zkoncentrována a přečištěna flash chromatografií na koloně se silikagelem, eluováno směsí dichlormethanu a methanolu (97:3) a získáno 22 mg 7-O-p-methoxybenzylbaccatinu III jako bílá tuhá látka.

Krok 1(d): 7-O-p-methoxybenzyl-(2'-ethoxyethyl)taxol (5)

15 mg produktu z kroku 1(c)(4) bylo spojeno se 6 mol ekvivalenty (2R,2S)-N-benzoyl-O-(1-ethoxyethyl)-3-fenylisoserinu nebo 5 mol ekvivalenty (3R,4S)-3-(1-ethoxyethoxy)-4-(fenyl)-N-benzoyl-2-azetidinonu a 3 molekvivalenty lithiumhexamethyldisilazidu (LiHMDS) v 5 ml tetrahydrofuranu při -78°C po dobu přibližně 20 minut ve 25 ml baňce s kulatým dnem. Reakční směs byla zahřáta a udržována na teplotě 0°C po dobu 6 hodin, nebo až do ukončení reakce, což se potvrzovalo TLC analýzou. Po ukončení reakce se směs vysolila 30 ml ústojného roztoku o pH 7 a produkt byl extrahován dichlormethanem, vysušen a přečištěn na koloně se silikagelem flash chromatografií za použití elučního činidla dichlormethanu a methanolu (97:3) a získáno 16 mg 7-O-p-methoxybenzyl-(2'-ethoxyethyl)taxolu.

Krok 1(e): 7-O-p-methoxybenzyltaxol

10 mg produktu z kroku 1(d) bylo za laboratorní teploty rozpuštěno v ethanolu v 5 ml baňce s kulatým dnem. Byl přidán přebytek 1 % kyseliny chlorovodíkové a ponecháno reagovat přibližně 4 hodiny. Reakční produkt byl vylit do 25 ml dělicí nálevky a přidáno 50 ml směsi ústojného roztoku o pH 7 a dichlormethanu (1:1). Organická vrstva byla odpařena k suchu a získán zbytek.

Krok 1(f): taxol nebo paclitaxel (18)

Ke zbytku získanému v kroku 1(e) bylo přidáno 5 ml dichlormethanu a vmícháno 0,25 ml vody. V tomto případě byl poměr vody k dichlormethanu 1:20. Ke směsi bylo přidáno 1,0-1,5 molekvivalentů 2,3-dichlor-5,6-dikyanbenzochinonu (DDQ) a teplota udržována na laboratorní teplotě nebo 5°C. Po ukončení reakce bylo k reakční směsi přidáno 10 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3) a tato směs extrahována 10 ml dichlormethanu. Extrakt byl promyt 5 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a vysušeno nad síranem sodným (Na_2SO_4). Rozpouštědlo bylo odpařeno, zbytek přečištěn na koloně se silikagelem a získáno 3,5 mg taxolu.

Příklad 3

Příprava taxolu

Krok 2(a): 7-O-tosyl-9-dihydro-13-acetylbaccatin III (7)

1,0 g 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III (1) bylo vloženo do 50 ml baňky s kulatým dnem se 454 mg p-toluensulfonylchloridu a 589 mg tetrabutylamoniumjodidu. Směs byla rozpuštěna v 15 ml dichlormethanu a za laboratorní teploty míchána po dobu 5 minut. Ke směsi bylo pomalu přidáváno 57 mg hydridu sodného a směs za laboratorní teploty míchána po dobu 2 hodin, po kterých bylo přidáno 100 ml vody. Směs byla extrahována 70 ml dichlormethanu. Organická vrstva byla zkoncentrována k suchu, zbytek přečištěn flash chromatografií na koloně se silikagelem, eluováno směsí dichlormethanu a methanolu (97:3) a získáno 1,1 g 7-O-tosyl-9-dihydro-13-acetylbaccatinu III.

Krok 2(b): 7-O-tosyl-13-acetylbaccatin III (8)

400 mg produktu sloučeniny 7 z kroku 2(a) bylo umístěno v 50 ml baňce s kulatým dnem a k tomu přidáno 126 mg 4-methylmorpholin-N-oxidu. Směs byla rozpuštěna v 5 ml acetonitrilu (CH_3CN) a přidáno 126 mg molekulového síta 4A. Směs byla za laboratorní teploty míchána po dobu přibližně 10 minut a potom přidáno 18 mg TPAP. Směs byla za laboratorní teploty míchána po dobu 5 hodin a prolita krátkou kolonou se silikagelem a eluováno dichlormethanem. Frakce byla dále na koloně se silikagelem přečištěna flash chromatografií, eluováno směsí ethylacetátu (EtOAc) a hexanu (7:3) a získáno okolo 350 mg bílých krystalů, které byly identifikovány jako 7-O-tosyl-13-acetylbaccatin III o čistotě 98 %.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 8,05 (dd, 2H, Ar-H); 7,74 (d, 2H, tosyl); 7,60 (ddd, Ar-H₄); 7,47 (dd, 2H, Ar-H); 7,30 (d, 2H, tosyl); 6,69 (s, H₁₀); 6,16 (t, H₁₃); 5,66 (dd, H₂); 5,30 (dd, H₇); 4,85 (dd, H-5); 4,30 (d, H-20a); 4,10 (d, H-20b); 3,00 (s, 3H, tosyl); 3,92 (d, H-3); 2,60 (m, H-6a); 2,42 (s, $-\text{OCH}_3$); 2,33 (s, $-\text{OCH}_3$); 2,30 (dd, H-14a); 2,21 (s, $-\text{OCH}_3$); 2,13 (s, CH_3); 2,10 (dd, H-14b); 1,77 (s, CH_3); 1,20 (s, CH_3); 1,17 (s, CH_3) ppm.

Krok 2(c): 7-O-tosylbaccatin III (9)

100 mg produktu z kroku 2(b) (sloučenina 8) bylo rozpuštěno v 10 ml tetrahydrofuranu ve 25 ml baňce s kulatým dnem. Baňka byla potom umístěna do kontejneru, kde byla udržována teplota -43°C . Roztok byl míchán a po kapkách přidáno během 3 minut 0,4 ml n-butyllithia v hexanu. Směs byla míchána po dobu 30

minut za vzrůstu teploty na přibližně 0°C a dále převedena do 500 ml dělicí nálevky obsahující 100 ml vody a extrahováno 150 ml dichlormethanu. Produkt byl přečištěn preparativní TLC a získáno 62 mg bílých krystalků, které byly identifikovány jako 7-O-tosylbaccatin III.

Krok 2(d): 7-O-tosyl-(2'-ethoxyethyl)taxol (10)

100 mg sloučeniny 8 bylo umístěno do 25 ml baňky s kulatým dnem a pomalu přidáváno 6 molekvivalentů (2R,2S)-N-benzoyl-O-(1-ethoxyethyl)-3-fenylisoserinu rozpuštěného v 5 ml tetrahydrofuranu při -78°C. Pomalu byly přidávány 3 molekvivalenty LiHMDS. Směs byla míchána při -78°C po dobu přibližně 20 minut, potom ohřáta na přibližně 0 až 20°C. Průběh reakce byl až k dokončení reakce sledován TLC. Jakmile reakce skončila, byla tato reakční směs vysolena ústojným roztokem o pH 7 a extrahováno 40 ml dichlormethanu. Organická vrstva byla za vakua zkoncentrována k suchu, zbytek přečištěn preparativní TLC a získáno 85 mg bílých krystalků, které byly identifikovány jako 7-O-tosyl-(2'-ethoxyethyl)taxol.

Krok 2(e): 7-O-tosyl-taxol (11)

50 mg produktu sloučeniny 10 z kroku 2(d) bylo umístěno do 25 ml baňky s kulatým dnem a za laboratorní teploty rozpuštěno v 15 ml ethanolu. Byl přidán přebytek 1 % kyseliny chlorovodíkové a směs udržována na laboratorní teplotě po dobu přibližně 5 hodin. Potom byla reakční směs vysolena 20 ml vody a 40 ml dichlormethanu. Organická vrstva byla za vakua odpařena k suchu a získán 7-O-tosyl-taxol.

Krok 2(f): taxol nebo paclitaxel (18)

Zbytek získaný v kroku 2(e) byl rozpuštěn v 10 ml 0,02 M roztoku triethylaminu v methanolu a ozářeno UV zářením po dobu přibližně 6 hodin nebo do doby, kdy reakce podle analýzy TLC skončila. Po ozáření bylo triethylaminové rozpouštědlo za vakua odpařeno. Zbytek byl přečištěn flash chromatografií na koloně se silikagelem, eluováno směsí dichlormethanu a methanolu (97:3) a získáno 25 mg taxolu, který byl charakterizován jako surový taxol.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 8,12; 7,73; 7,61; 7,51; 7,41; 7,38; 6,97; 6,27; 6,23; 5,78; 5,67; 4,94; 4,79; 4,40; 4,30; 4,19; 3,79; 3,54; 2,51; 2,46; 2,38; 2,36; 2,28; 2,24; 1,89; 1,89; 1,79; 1,68; 1,24; 1,14 ppm.

Příklad 3

Příprava 10-deacetylbaecatinu III

Krok 3(a): 7-O-p-methoxybenzyl-10-deacetylbaecatin III (12)

70 mg produktu sloučeniny 4 z kroku 1(c) bylo umístěno do 25 ml baňky s kulatým dnem společně s 5 ml dichlormethanu. Bylo přidáno 1,5 molekvivalentu hydridu sodného a potom 3 ml triethylaminu a směs byla míchána magnetickým míchadlem po dobu 2 až 3 hodin. Průběh reakce byl sledován TLC. Po ukončení deacetylce byl roztok nalit do 25 ml vody a extrahováno 30 ml dichlormethanu. Organická vrstva byla za vakua zkoncentrována k suchu. Zbytek byl přečištěn na koloně flash chromatografií a získáno 42 mg 7-O-p-methoxybenzyl-10-deacetylbaecatinu III jako bílá tuhá hmota.

Krok 3(b): 10-deacetylbaccatin III (13)

30 mg sloučeniny 12, tj. 7-O-p-methoxybenzyl-10-deacetylbaccatinu III bylo umístěno do 25 ml baňky s kulatým dnem společně s 5 ml dichlormethanu, který obsahoval malé množství vody v poměru vody k dichlormethanu 1:20. Byl přidán 1,0 molekvivalent 2,3-dichlor-5,6-dikyanbenzochinonu (DDQ) a směs za laboratorní teploty míchána po dobu 3 hodin. Po ukončení reakce bylo přidáno 15 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a směs extrahována 20 ml dichlormethanu. Extrakt byl vysušen nad síranem sodným. Dichlormethanový extrakt byl odpařen, zbytek přečištěn na koloně se silikagelem a získáno 16 mg 10-deacetylbaccatinu III.

Příklad 4

Příprava baccatinu III

25 mg sloučeniny 4 (7-O-p-methoxybenzylbaccatin III) nebo 9 (7-O-tosylbaccatin III) obsahující malé množství vody bylo umístěno do 25 ml baňky s kulatým dnem a přidáno 5 ml dichlormethanu. V tomto případě byl poměr vody k dichlormethanu 1:18. Ke směsi bylo přidáno 1,0 až 1,5 molekvivalentu DDQ a mícháno za laboratorní teploty nebo při 5°C. Po ukončení reakce bylo přidáno 20 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, směs extrahována 30 ml dichlormethanu a vysušeno nad síranem sodným. Rozpouštědlo bylo odpařeno, zbytek přečištěn na koloně flash chromatografií, eluováno směsí dichlormethanu a methanolu (96:4) a získáno 17 mg sloučeniny 15, baccatinu III jako bílá tuhá hmota.

Příklad 5

Příprava meziprojektu 7-O-benzyl-13-acetylbaecatínu III

Krok 4(a): 7-O-benzyl-9-dihydro-13-acetylbaecatín III (16)

10 mg 9-dihydro-13-acetylbaecatínu III, sloučeniny 1, bylo v 5 ml baňce s kulatým dnem rozpuštěno ve 3 ml tetrahydrofuranu (THF) a přidáno 20 mg n-tetrabutylamoniumjodidu. Směs byla míchána po dobu 5 minut a přidáno 12 mg hydridu sodného. Po kapkách bylo přidáno 170 mg benzylbromidu a směs míchána při 40°C. V míchání se pokračovalo přes noc. K zastavení reakce bylo přidáno 40 ml vody. Produkt byl extrahován chloroformem. Chloroformový roztok byl odpařen, zbytek přečištěn preparativní TLC a získáno 8 mg 7-O-benzyl-9-dihydro-13-acetylbaecatínu III.

Krok 4(b): 7-O-benzyl-13-acetylbaecatín III (17)

Podobným způsobem jako v kroku 1(b) lze připravit sloučeninu 17. V tomto případě se činidlo methylnorfin-N-oxid (NMO) zamění za chlornan sodný (NaOCl).

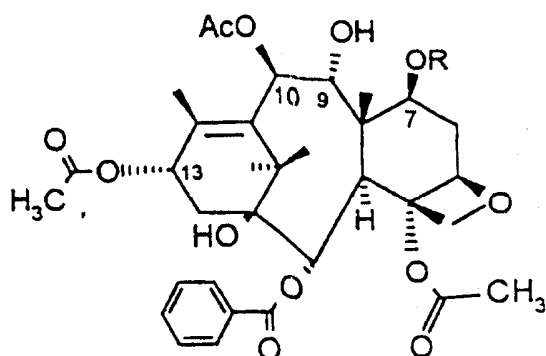
Taxol, 10-deacetylbaecatín III a baecatín III lze získat ze 7-O-benzyl-13-acetylbaecatínu III podobným způsobem jako je to popsáno v předchozích příkladech.

Patentové nároky

1. Postup konverze 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III na taxan vyznačující se tím, že se provede oxidace polohy C-9 látky 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III.
2. Postup podle nároku 1 vyznačující se tím, že se oxidace dosáhne přidavkem oxidačního činidla vybraného ze skupiny látek sestávající z tetra-n-propylamonium perruthenátu, Collinova činidla a aktivovaného methylsulfoxidu.
3. Postup přípravy taxolu a jeho derivátů vyznačující se tím, že spočívá v
 - (a) chránění hydroxyskupiny C-7 v 9-dihydro-13-acetylbaccatinu III vhodnou chránicí skupinou k získání chráněného produktu; a
 - (b) oxidaci hydroxyskupiny C-9 chráněného produktu.
4. Postup podle nároku 3 vyznačující se tím, že se chránicí skupina vybírá ze skupiny sestávající z benzylu, substituovaného benzylu, benzylformiátu, substituovaného benzylformiátu, tosyly, substituovaného tosyly, dihydropyranu, methoxymethylu, benzoylu a substituovaného benzoylu.
5. Postup podle nároku 3 vyznačující se tím, že se oxidace dosáhne přidavkem oxidačního činidla vybraného ze skupiny látek sestávající z tetra-n-propylamonium perruthenátu, Collinova činidla a aktivovaného methylsulfoxidu.
6. Postup podle nároku 3 vyznačující se tím, že obsahuje krok deacetylce polohy C-13.

7. Postup podle nároku 6 vyznačující se tím, že obsahuje k získání baccatinu III ještě krok zrušení ochrany polohy C-7.
8. Postup podle nároku 6 vyznačující se tím, že obsahuje ještě krok deacetylce polohy C-10.
9. Postup podle nároku 8 vyznačující se tím, že obsahuje k získání 10-deacetylbaaccatinu III ještě krok zrušení ochrany polohy C-7.
10. Postup podle nároku 6 vyznačující se tím, že obsahuje k získání požadovaného produktu ještě krok addice vhodného řetězce do polohy C-13 a selektivního zrušení ochrany.
11. Postup podle nároku 10 vyznačující se tím, že se pro získání taxolu provádí zrušení ochrany na poloze C-7 a 2'.
12. Postup podle nároku 10 vyznačující se tím, že se postranní řetězec vybírá ze skupiny sestávající z (2R,2S)-N-benzoyl-O-(1-ethoxyethyl)-3-fenylisoserinu a (3R,4S)-3-(1-ethoxyethoxy)-4-(fenyl)-N-benzoyl-2-azetidinonu.

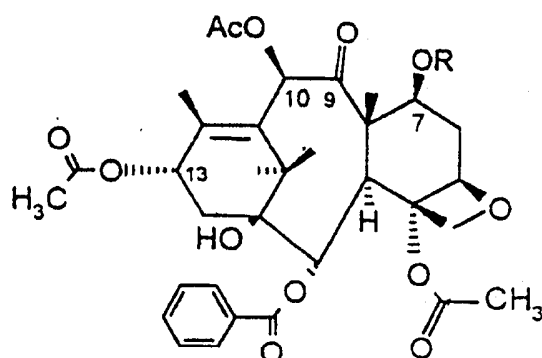
13. Sloučenina obecného vzorce



kde se R vybírá ze skupiny obsahující benzyl, substituovaný benzyl, tosyl, substituovaný tosyl, dihydropyran, methoxymethyl, benzoyl a substituovaný benzoyl.

14. Sloučenina podle nároku 13 vyznačující se tím, že benzyl je benzylformiát a benzoyl je benzoylmethyl.

15. Sloučenina obecného vzorce



kde se R vybírá ze skupiny obsahující benzyl, substituovaný benzyl, tosyl, substituovaný tosyl, dihydropyran, methoxymethyl, benzoyl a substituovaný benzoyl.

16. Sloučenina podle nároku 15 vyznačující se tím, že benzyl je benzylformiát a benzoyl je benzoylmethyl.