



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

218583
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 519/04

(22) Přihlášeno 19 04 79

(21) (PV 2678-79)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 20 04 78
(899032) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 30 11 81

(45) Vydáno 15 03 85

(72)

Autor vynálezu

CULLINAN GEORGE JOSEPH, TRAFALGAR, GERZON KOERT,
INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

(73)

Majitel patentu

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby C₃-karboxhydrazidů 4-deacetylvinkaleukoblastinu

1

Vynález se týká způsobu výroby nových C₃-karboxhydrazidů 4-deacetylvinkaleukoblastinu, vykazujících účinnost proti zhoubným nádorům.

Bylo zjištěno, že některé přírodní alkaloidy, získávané z rostlin druhu *Vinca rosea*, jsou účinné při léčbě experimentálních nádorových onemocnění živočichů. Mezi tyto sloučeniny náleží leurosin (viz americký patentový spis č. 3 370 057), vinkaleukoblastin (vinblastin) — dále označovaný jako VLB (viz americký patentový spis číslo 3 097 137), leuroformin (viz belgický patentový spis č. 811 110), leurosidin (vinrosidin) a leurokristin (dále označovaný jako vinkristin) (oba viz americký patentový spis č. 3 205 220), deoxy-VLB „A“ a „B“ [viz Tetrahedron Letters, 783 (1958)], 4-deacetoxyvinblastin (viz americký patentový spis č. 3 954 773), 4-deacetoxy-3'-hydroxyvinblastin (viz americký patentový spis číslo 3 944 554), leurokolombin (viz americký patentový spis č. 3 890 325) a vinkadiolin (viz americký patentový spis č. 3 887 565). Dva z těchto alkaloidů, a to VLB a vinkristin, jsou v současné době na trhu jako prostředky k léčení nádorových onemocnění, zejména leukémií a příbuzných chorob člověka. Tyto dva komerční alkaloidy se obvykle podávají intravenózně.

2

Chemické modifikace alkaloidů z rostlin druhu *Vinca rosea* byly poněkud omezeny určitými okolnostmi. V první řadě je třeba vzít v úvahu, že struktura molekuly těchto látek je neobyčejně složitá, a že je tedy neobyčejně obtížné vyvinout chemické reakce, kterými by byla modifikována jedna konkrétní funkční skupina v molekule bez ovlivnění jiných skupin. V druhé řadě pak přichází v úvahu skutečnost, že z frakcí získaných z rostlin druhu *Vinca rosea* nebo z alkaloidů z těchto rostlin byly izolovány nebo vyrobeny dimerní alkaloidy postrádající žádané chemoterapeutické vlastnosti a stanovení jejich struktury vedlo k závěru, že tyto „neaktivní“ sloučeniny jsou úzce příbuzné s aktivními alkaloidy, od nichž se často liší jen stereochemií na jediném místě molekuly. Anti-neoplastická účinnost se tedy zdála omezená na velmi specifické základní struktury a v souladu s tím se naděje na získání účinnějších léčiv modifikací těchto struktur zdály jen velmi malé. Mezi úspěšné modifikace fyziologicky účinných alkaloidů náleží příprava 6,7-dihydro-VLB (viz americký patentový spis číslo 3 352 868) a náhrada acetylové skupiny na C₄ (uhlík v poloze 4 cyklického systému VLB — viz níže uvedené číslování) vyšší alkanoylovou skupinou nebo nepřibuznými

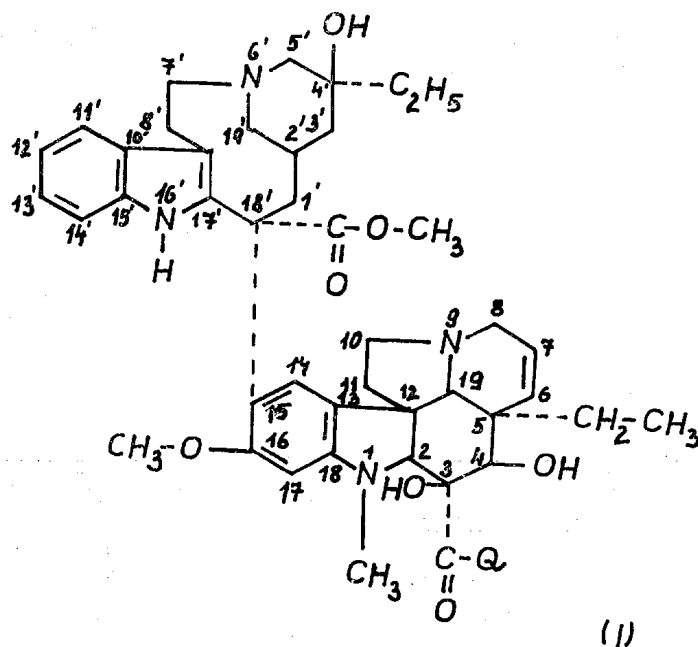
acylovými skupinami (viz americký patentový spis č. 3 392 173). Některé z těchto C₄-derivátů jsou schopné prodloužit život myši inokulovaných leukémií P1534. Jeden z těchto C₄-derivátů, v němž je C₄-acetylová skupina VLB nahrazena chloracetylovou skupinou, je rovněž užitečným meziproduktem pro přípravu strukturně modifikovaných derivátů VLB, v nichž C₄-acetylovou skupinu VLB nahrazuje N,N-dialkylglycylová skupina (viz americký patentový spis číslo 3 387 001).

Byly rovněž připraveny C₃-karboxamidové a -karboxhydrazidové deriváty VLB, vinkristinu, vinkadiolinu apod. a bylo zjištěno, že jsou účinné proti nádorovým onemocněním (viz belgický patentový spis č. 813 168). Tyto sloučeniny jsou neobyčejně zajímavé, protože například 3-karboxamidy VLB jsou účinnější proti Ridgewayovu osteogennímu sarkomu a Gardnerovu lymfosarkomu než

samotný VLB, tedy než základní alkaloid, z něhož byly odvozeny. Určité z těchto amidoderivátů se co do účinnosti přibližují účinnosti vinkristinu proti stejným nádorům. Jeden z těchto amidů, a to C₃-karboxamid 4-deacetyl-VLB nebo vindesin, je v současné době v klinických zkouškách na lidech, a bylo zjištěno, že je účinný u různých forem leukémie. Zdá se, že u člověka vindesin vykazuje nižší neurotoxicitu než vinkristin a je zřetelně účinný proti leukémiím resistantním na vinkristin.

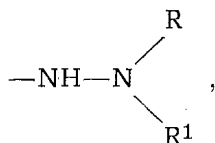
C₃-karboxhydrazid 4-deacetyl-VLB je popsán v belgickém patentovém spisu číslo 813 168 jako prostředek účinný proti transplantovaným nádorům u myši. Bylo prokázáno, že tato látka je účinná proti Ridgewayovu osteogennímu sarkomu, Gardnerovu lymfosarkomu a leukémií P 1534 [J].

Předmětem vynálezu je způsob výroby nových sloučenin obecného vzorce I,



ve kterém

Q představuje zbytek vzorce



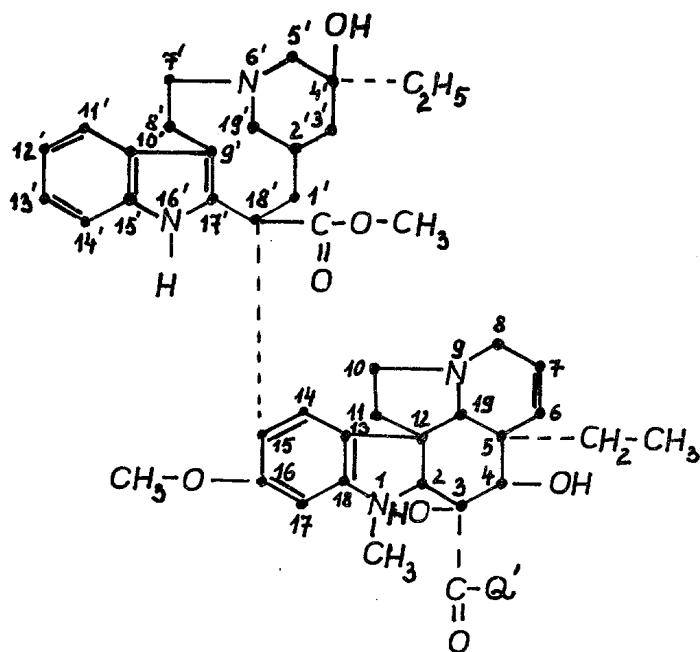
kde

R znamená alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, a

R¹ představuje atom vodíku nebo

R a R¹ společně tvoří alkyldenovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku,

vyznačující se tím, že se C₃-derivát 4-deacetyl-vinkaleukoblastinu, obecného vzorce IA,



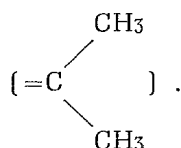
(IA)

ve kterém

Q' znamená zbytek —NHNH_2 , nechá reagovat v roztoku s formaldehydem, acetaldehydem, acetonem nebo propionaldehydem, popřípadě s následující hydrogenací.

Symbol R ve sloučenině obecného vzorce I může znamenat methylovou, ethylovou, n-propylovou nebo isopropylovou skupinu.

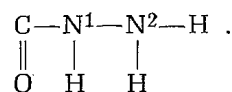
Mezi alkylidenové skupiny s 1 až 3 atomy uhlíku, tvořené symboly R a R¹ společně, náleží methylidenová skupina ($=\text{CH}_2$), ethylidenová skupina ($=\text{CH—CH}_3$), n-propylidenová skupina ($=\text{CH—C}_2\text{H}_5$) a isopropylidenová skupina



Sloučeniny obecného vzorce I jsou pojmenovány jako deriváty C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB. Systematický název těchto sloučenin by měl zahrnovat výraz „3-demetoxycarbonyl“, tento výraz je však vypouštěn, protože z pojmenování „C₃-karboxhydrazid“ jednoznačně vyplývá, že C₃-methoxykarbonylová skupina VLB byla nahrazena odpovídající jinou skupinou. K označení sloučenin podle vynálezu by bylo možno použít i jiného názvoslovného systému. Tak například je možno tyto sloučeniny pojmenovat jako deriváty 23-demethoxy-23-hydrazidu 4-deacetyl-VLB, z kteréhožto názvu vyplývá náhrada C₂₃-methoxyskupiny hydrazidovým seskupením. Přednost se však

něméně dává pojmenování těchto sloučenin jako derivátů C₃-karboxhydrazidu.

Hydrazin obsahuje 2 dusíkové atomy, které jsou v hydrazidu číslovány následovně:



Hydrazidovými deriváty podle vynálezu jsou vesměs N²-deriváty.

Sloučeniny shora uvedeného obecného vzorce I je možno připravit několika alternativními postupy. Výhodný postup spočívá v tom, že se nejprve připraví C₃-karboxhydrazid 4-deacetyl-VLB, a to působením hydrazinu na VLB, za použití postupu popsaného v belgickém patentovém spisu 813 168. Při této reakci se VLB a hydrazin zahřívají v uzavřené reakční nádobě za použití bezvodého ethanolu jako rozpouštědla. Alternativně je možno 4-deacetyl-VLB podrobit za stejných podmínek reakci s bezvodým hydrazinem. Reakce hydrazinu se samotným VLB slouží k hydrolýze acetoxyskupiny na C₄ a produktem reakce je tedy vždy C₃-karboxhydrazid 4-deacetyl-VLB bez ohledu na to, zda se jako výchozí materiál použije VLB nebo 4-deacetyl-VLB. Sloučeniny obecného vzorce I se připravují způsobem podle vynálezu za použití C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB jako výchozího materiálu, připraveného libovolným způsobem.

Reakcí C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB s formaldehydem, acetaldehydem, propionaldehydem nebo acetonem se získá příslušný alkylidenový derivát obecného vzorce I, v němž R a R¹ společně

tvorí alkyldenovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku. Tyto alkyldenové deriváty lze pak hydrogenovat, jako působením redukčního činidla hydridového typu, například natriumborohydridu, za vzniku odpovídající sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R znamená alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku a R¹ představuje atom vodíku.

Přípravu sloučenin obecného vzorce I, jakož i potřebných výchozích látek ilustrují následující příklady provedení, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

Příprava výchozí látky

C₃-karboxhydrazid 4-deacetyl-VLB

4-deacetyl-VLB se v bezvodém ethanolu zahřívá s nadbytkem bezvodého hydrazinu cca 18 hodin v uzavřené reakční nádobě na teplotu zhruba 60 °C. Reakční nádoba se ochladí, otevře se, její obsah se vyjme a těkavé složky se odpaří ve vakuu. Zbytek, tvořený C₃-karboxhydrazidem 4-deacetyl-VLB, se vyjme methylenchloridem, methylenchloridový roztok se promyje vodou, vysuší se a methylenchlorid se odpaří ve vakuu. Odparek se rozpustí ve směsi stejných dílů chloroformu a benzenu a chromatografuje se na silikagelu. Jako eluční činidlo se používá směs benzenu, chloroformu a triethylaminu. Počáteční chromatografické frakce obsahují nezreagovaný 4-deacetyl-VLB. Další frakce obsahují C₃-karboxhydrazid 4-deacetyl-18'-demethoxykarbonyl-VLB, který popsali Neuss a spol. v Tetrahedron Letters, 1968, 783. Následující frakce, které podle chromatografie na tenké vrstvě obsahují C₃-karboxhydrazid 4-deacetyl-VLB, se spojí a rozpouštědla se odpaří ve vakuu. Výsledný pevný produkt taje za rozkladu zhruba při 219 až 220 °C.

Příprava finálních produktů

Příklad 1

Příprava C₃-N²-ethylidenkarboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB

1 mmol (768 mg) C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB se rozpustí v 50 ml dichlormethanu a k roztoku se přidá 200 mg acetaldehydu. Reakční nádoba se uzavře a nechá se přes noc stát při teplotě místnosti. Výsledný roztok se odpaří na červenožlutý amorfni práškovitý zbytek, který se k odstranění nadbytku acetaldehydu rozdělí mezi dichlormethan a vodu. Dichlormethanový roztok se vysuší a odpaří se k suchu. Zbýlý červenožlutý práškový zbytek je tvořen C₃-N²-ethylidenkarboxhydrazidem 4-deacetyl-VLB s následujícími fyzikálními konstantami:

Hmotnostní spektrum:
m/e = 794 (M⁺).

IČ: ν = 1680 cm⁻¹ (—CON),
1710 cm⁻¹ (COO).

Příklad 2

Příprava C₃-N²-ethylkarboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB

C₃-N²-ethylidenkarboxhydrazid 4-deacetyl-VLB z příkladu 1 se rozpustí ve 100 ml absolutního ethanolu a přidá se 500 mg 96% natriumborohydridu. Reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti, načež se k ní až do vzniku čirého roztoku přidává 1 N kyselina chlorovodíková. Po přidání vody se výsledný roztok zalkalizuje koncentrovaným hydroxidem amonným a dvakrát se extrahuje dichlormethanem. Dichlormethanové extrakty se vysuší a odpaří se k suchu. Ve výtěžku 49 mg se získá červenožlutý amorfni prášek, tvořený C₃-N²-ethylkarboxhydrazidem 4-deacetyl-VLB, s následujícími fyzikálními konstantami:

Hmotnostní spektrum:
m/e = 796 (M⁺).

IČ: = 3460 cm⁻¹ (N—H),
1656 cm⁻¹ (CON),
1715 cm⁻¹ (COO).

Příklad 3

Příprava C₃-N²-methylidenkarboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB

768 mg C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB se rozpustí ve 100 ml tetrahydrofuranu a k roztoku se přidá 20 ml 37% vodného formaldehydu. Reakční nádoba se uzavře a reakční směs se přes noc míchá při teplotě místnosti. Výsledný roztok se odpaří na gelovitý zbytek, který se rozpustí v absolutním ethanolu. K ethanolickému roztoku se přidá dichlormethan a výsledný roztok se extrahuje vodou. Dichlormethanový roztok se oddělí a po vysušení se odpaří k suchu. Zbýlý červenožlutý amorfni práškový odparek je tvořen C₃-N²-methylidenkarboxhydrazidem-4-deacetyl-VLB s následujícími fyzikálními charakteristikami:

Hmotnostní spektrum:
m/e = 780 (M⁺), 439, 355, 154.

IČ: široký pás pro karbonyly při ν = 1650 až 1740 cm⁻¹.

NMR: dva nové signály při δ 4,63 a 4,89.

Příklad 4

Příprava C₃-N²-isopropylidenkarboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB

400 mg C₃-karboxyhydrazidu 4-deacetyl-VLB se rozpustí ve 25 ml acetonu a reakční směs se 3 dny míchá za vyloučení přístupu světla při teplotě místnosti. Odpařením výsledného roztoku se získá cca 400 mg C₃-N²-isopropylidenkarboxyhydrazidu 4-deacetyl-VLB s následujícími fyzikálními charakteristikami:

Hmotnostní spektrum:

m/e = 808 (M⁺), 822, 836, 777, 750, 751, 467, 355, 154, 124.

IČ (chloroform:

ν = 1730 cm⁻¹ (—COOCH₃),
1710 cm⁻¹ (—N=C—),
1685 cm⁻¹ (—COONH—).

Sloučeniny obecného vzorce I inhibují růst transplantovaných nádorů u myši nebo/a prodlužují dobu přežití myši inokulovaných nádorem. K průkazu účinnosti těchto látek se používá postup umožňující aplikaci testované sloučeniny, obvykle intrape-

ritoneální aplikaci, v dané dávce po dobu 7 až 10 dnů. Tam, kde testovaná sloučenina inhibuje růst nádoru, se třetího nebo sedmého dne změří velikost nádoru. V případech, kdy jde o prodloužení doby života, se zjistí doba přežití ošetřených zvířat v porovnání s kontrolními zvířaty.

V následující tabulce 1 jsou uvedeny výsledky pokusů, při nichž byly myši s transplantovanými nádory úspěšně léčeny sloučeninami obecného vzorce I. V prvním sloupci tabulky 1 je uveden název testované sloučeniny, v druhém sloupci transplantovaný nádor, v třetím sloupci dávka nebo rozmezí dávek a počet dnů, kdy byla dávka podána, a ve čtvrtém sloupci inhibice růstu nádoru v procentech nebo prodloužení doby přežití v procentech, například u B16.

Jednotlivé pokusné nádory jsou označovány zkratkami s následujícím významem: ROS znamená Ridgewayův osteogenní sarkom, GLC znamená Gardnerův lymfosarkom a B16 malígní melanom.

TABULKA 1

Testovaná sloučenina	Nádor	Dávka mg/kg × dny	Inhibice růstu nádoru v % nebo prodloužení doby přežití v %	
			3 dny	7 dnů
C ₃ -N ² -ethylkarboxyhydrazid 4-deacetyl-VLB	GLS	0,5 × 10	toxická dávka	toxická dávka
		0,25 × 10	100 ⁽⁺⁾	toxická dávka
C ₃ -N ² -isopropylidenkarbox- hydrazid 4-deacetyl-VLB	ROS	0,05 × 10	33	
		0,1 × 10	42	
		0,15 × 10	74	
		0,2 — 1,0 × 10	toxická dávka	
C ₃ -N ² -ethylidenkarboxyhydrazid 4-deacetyl-VLB	GLS	0,4 × 9	toxická dávka	
		0,2 × 9	100	
	ROS	0,4 × 9	toxická dávka	
		0,2 × 9	100	
C ₃ -N ² -methylidenkarbox- hydrazid 4-deacetyl-VLB	GLS	0,5 × 10	toxická dávka	toxická dávka
		0,25 × 10	100	100
		0,125 × 10	91	91
		0,15 × 10		74
C ₃ -N ² -isopropylidenkarbox- hydrazid 4-deacetyl-VLB	ROS	0,15 × 10		

Podle očekávání se sloučeniny obecného vzorce I co do spektra protinádorové účinnosti liší od VLB, vinkristinu a vindesinu, jakož i od C₄-N,N-dialkylglycylesterů VLB, a to stejně jako se tyto sloučeniny liší co do spektra své protinádorové účinnosti mezi sebou navzájem (některé jsou účinnější proti určitým nádorům nebo druhům nádorů a méně účinné proti jiným). Při klinickém použití sloučenin obecného vzorce I bude však ošetřující lékař podávat tyto sloučeniny zpočátku stejným způsobem, ve stejných nosných látkách a proti stejným typům nádorů, jako se klinicky používají vinkristin a VLB. Odchytky v dávkování budou pochopitelně založeny na relativní účinnosti mezi vinkristinem nebo VLB a novou sloučeninou proti stejnému experimentálnímu nádoru u myši.

Při použití nových hydrazidoderivátů obecného vzorce I jako antineoplastických prostředků se bude používat parenterálního způsobu podání. K tomuto účelu se používají isotonické roztoky obsahující 1 až 10 mg/ml sloučeniny obecného vzorce I. Účinné látky se podávají v dávce od 0,01 do 1 mg/kg, s výhodou od 0,1 do 1 mg/kg tělesné hmotnosti savce, a to jednou nebo dvakrát týdně, nebo každé dva týdny, v závislosti jak na účinnosti, tak na toxicitě účinné látky. Alternativní způsob, jak dospět k terapeutické dávce, je založen na ploše povrchu těla ošetřovaného savce, přičemž se aplikuje dávka v rozmezí od 0,1 do 10 mg/m² plochy povrchu těla savce každých 7 nebo 14 dnů.

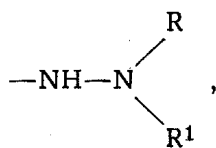
Klinické zkoušky sloučenin obecného vzorce I se budou provádět podle postupu na-

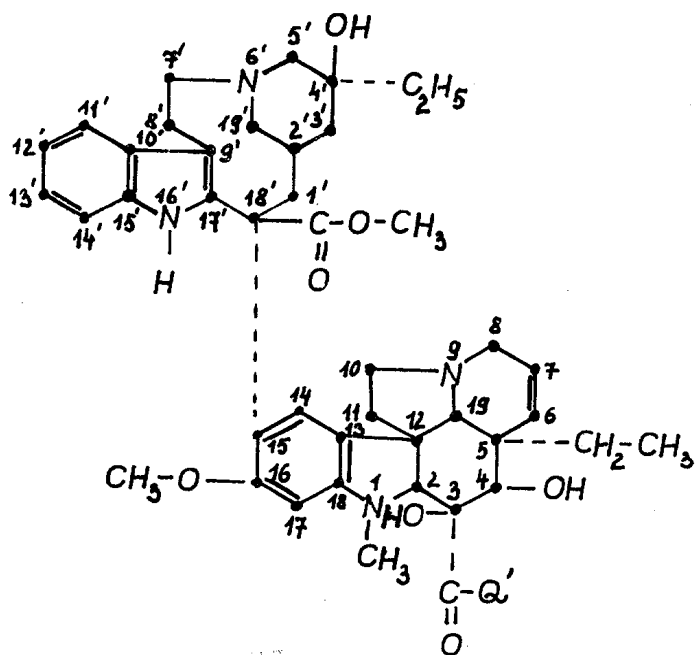
stranách 242 až 289 knihy „The Design of Clinical Trials in Cancer Therapy“ (ed. Maurice Staquet, Futura Publishing Co., New York, 1973).

1. Způsob výroby C₃-karboxyhydrazidů 4-deacetyl-vinkaleukoblastinu obecného vzor-
ce I



vyznačující se tím, že se C₃-derivát 4-de-acetylvinkaleukoblastinu obecného vzorce IA,





(IA)

ve kterém

Q' znamená zbytek —NHNH_2 , nechá reagovat v roztoku s formaldehydem, acetaldehydem, acetonem nebo propionaldehydem, popřípadě s následující hydrogenací.

2. Způsob podle bodu 1 k výrobě C₃-N²-ethylidenkarboxhydrazidu 4-deacetylvin-kaleukoblastinu, vyznačující se tím, že se C₃-karboxhydrazid 4-deacetylvin-kaleukoblastinu nechá reagovat s acetaldehydem.

3. Způsob podle bodu 1 k výrobě C₃-N²-ethylkarboxhydrazidu 4-deacetylvin-kaleukoblastinu, vyznačující se tím, že se C₃-kar-

boxhydrazid 4-deacetylvin-kaleukoblastinu nechá reagovat s acetaldehydem a výsledný produkt se podrobí hydrogenaci.

4. Způsob podle bodu 1 k výrobě C₃-N²-methylidenkarboxhydrazidu 4-deacetylvin-kaleukoblastinu, vyznačující se tím, že se C₃-karboxhydrazid 4-deacetylvin-kaleukoblastinu nechá reagovat s formaldehydem.

5. Způsob podle bodu 1 k výrobě C₃-N²-isopropylidenkarboxhydrazidu 4-deacetylvin-kaleukoblastinu, vyznačující se tím, že se C₃-karboxhydrazid 4-deacetylvin-kaleukoblastinu nechá reagovat s acetonem.