

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET  
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 154220 B



(21) Patentansøgning nr.: 3128/85

(51) Int.Cl.<sup>4</sup> C 07 H 17/04

(22) Indleveringsdag: 09 jul 1985

(41) Alm. tilgængelig: 10 jan 1987

(44) Fremlagt: 24 okt 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: \*NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA; 11-2 Fujimi 1-chome; Chiyoda-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Tadashi \*Fujii; JP, Yukio \*Chikui; JP

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af etoposid

(56) Fremdragne publikationer

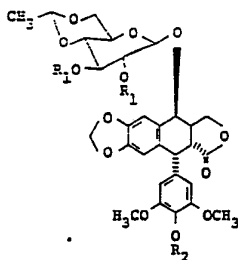
DK ans. nr. 4255/83

(57) Sammendrag:

betegner  $-\text{COCHX}_2$  eller  $-\text{COCX}_3$ , hvori X betegner et halogenatom, med en alkohol, en amin og/eller ammoniak til fjernelse af halogenacetylgrupperne, kan udføres i et trin og giver etoposid med et meget lille indhold af urenheder.

3128-85

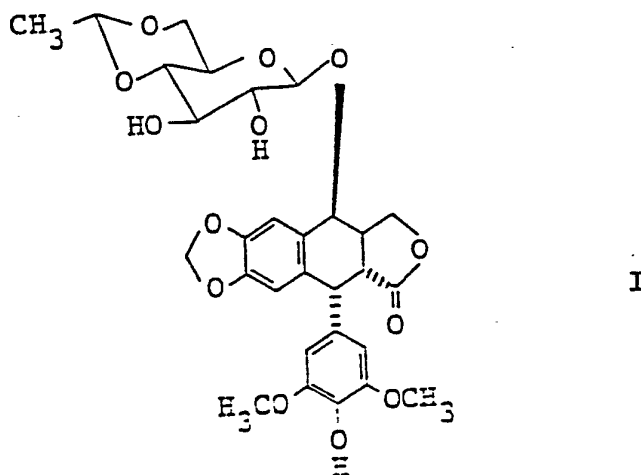
En fremgangsmåde til fremstilling af etoposid ved hvilken man omsætter et 4'-halogenacetyl-4'-demethyl-epipodophyllotoxin-8-D-2,3-di-O-halogenacetyl-4,6-O-ethylidenglucosid med den almene formel:



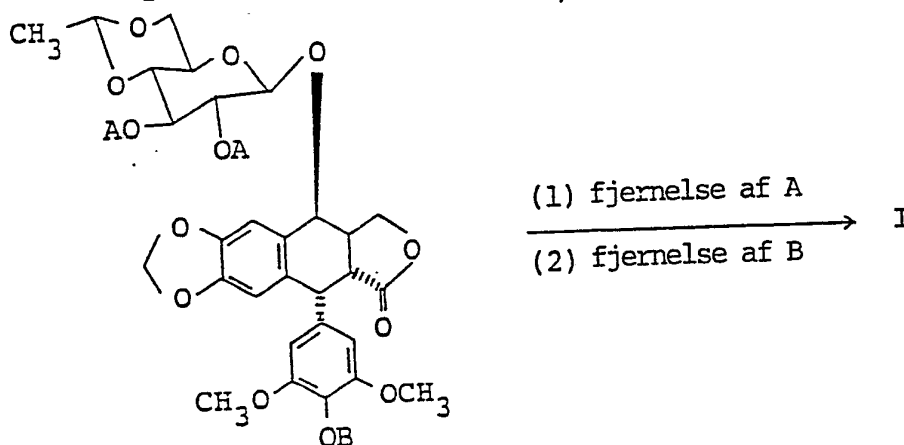
hvor  $R_1$  og  $R_2$  som kan være ens eller forskellige, hver

DK 154220 B

En fremgangsmåde til fremstilling af etoposid, der har formelen :



omfattende de følgende trin 1 og 2 kendes allerede (se canadisk patentskrift nr. 956939):

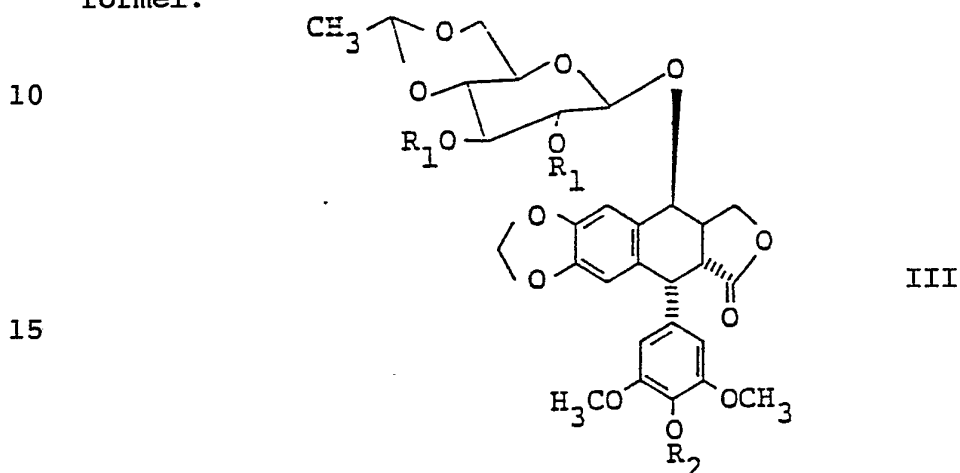


hvor A betegner formyl eller acetyl, og B betegner benzyloxycarbonyl.

Den ovennævnte fremgangsmåde har imidlertid de ulemper, at der kræves to trin, nemlig et trin til fjernelse af A og et efterfølgende trin til fjernelse af B, at fjernelsen af A er tidsforbrugende (reaktionen kan f.eks. ikke afsluttes selv på 20 til 30 timer), og at kvaliteten af det fremstillede etoposid er dårlig på grund af den store mængde dannede biprodukter, såsom farvede produkter, og ubyttet er lavt.

Som et resultat af en række forskellige undersøgelser vedrørende en hidtil ukendt fremgangsmåde til

fremstilling af etoposid, har det nu vist sig, at nede-  
 nævnte  $R_1$  og  $R_2$  kan fjernes samtidig til opnåelse af  
 etoposid med lavt indhold af urenheder, således at det  
 let kan renses, ved en fremgangsmåde, der ifølge opfin-  
 5 delsen er ejendommelig ved, at man omsætter et 4'-halo-  
 genacetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- $\beta$ -D-2,3-di-O-  
 halogenacetyl-4,6-O-ethylidenglucosid med den almene  
 formel:



20 hvori  $R_1$  og  $R_2$ , som kan være ens eller forskellige, hver  
 betegner  $-\text{COCHX}_2$  eller  $-\text{COCX}_3$ , hvori X betegner et  
 chloratom, med en  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -alkohol med 1-3 hydroxylgrupper  
 i tilstedeværelse af et ammoniumsalt af en organisk  
 carboxylsyre ved en temperatur på  $-10$  til  $100^\circ\text{C}$  til  
 25 fjernelse af halogenacetylgrupperne.

Opfindelsen er blevet til på basis af den oven-  
 stående erkendelse.

Opfindelsen vil i det følgende blive beskrevet  
 mere detaljeret. Som eksempler på  $R_1$  og  $R_2$  kan dichlor-  
 30 acetyl og trichloracetyl nævnes.

Som eksempler på de alkoholer, som anvendes iføl-  
 ge opfindelsen, kan der nævnes  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -alkoholer med 1 til  
 3 hydroxylgrupper, især lavere monovalente alkoholer,  
 såsom methanol, ethanol, propanol og butanol, lavere  
 35 polyvalente alkoholer, såsom ethylenglycol og glycerol,  
 blandt hvilke lavere monovalente alkoholer, såsom metha-

nol og ethanol er ønskelige. Det er ønskeligt at anvende disse alkoholer som opløsningsmidler ved reaktioen ifølge opfindelsen, men andre alkoholer end disse kan anvendes. I dette tilfælde er det hensigtsmæssigt, at alkoholen sædvanligvis anvendes i en mængde, der mindst er ligeså stor som mængden af forbindelsen III.

Ifølge opfindelsen kan de nævnte alkoholer anvendes alene eller som en blanding af mindst to af disse. Når de anvendes i form af en blanding, er det hensigtsmæssigt, at en alkohol anvendes som opløsningsmiddel.

Anvendelsen af andre forbindelser end alkoholerne som opløsningsmiddel er ikke begrænset specielt, for såvidt de ikke påvirker reaktionen ugunstigt. Som eksempler på andre forbindelser kan chloroform, ether, 1,2-dichlorethylen, dimethylformamid og pyridin nævnes.

Reaktionen ifølge opfindelsen forløber glat, når et ammoniumsalt af en organisk carboxylsyre tilsættes som katalysator til reaktionssystemet. Som sådanne carboxylsyresalte kan der nævnes (1) ammoniumsalte af mindst monovalente alifatiske carboxylsyrer, f.eks. ammoniumformiat, -acetat, -malonat og -succinat og alkylammoniumacetat, (2) ammoniumsalte af aromatiske carboxylsyrer, f.eks. ammoniumisonicotinat, ammoniumbenzoat, ammoniumanthranilat og alkylammoniumbenzoat og (3) svagt sure kationbytterharpikser med carboxylgrupper som aktive grupper og på ammoniumsaltform. Blandt disse foretrækkes ammoniumsalte af mættede fede syrer med 1 til 3 C-atomer, især ammoniumacetat og ammoniumformiat, og mængder af disse forbindelser er ca. 5-100 vægt%, fortrinsvis 30-50 vægt%, baseret på forbindelsen med den almene formel III.

Temperaturen for reaktionen ifølge opfindelsen varierer med hvilket opløsningsmiddel, der anvendes, og hvilken katalysator, der anvendes, men er fra -10 til 100°C, hensigtsmæssigt fra 0 til 90°C, især 20 til 70°C, og reaktionen afsluttes indenfor 0,1 til 7 timer.

En fremgangsmåde, der er beslægtet med fremgangsmåden ifølge opfindelsen kendes fra dansk patentansøgning nr. 4255/83. Ved denne kendte fremgangsmåde fremstilles etoposid ved omsætning af monohalogenacetylderivatet af etoposid med en amin, såkaldt ammonolyse, eller med en alkohol i tilstedeværelse af et metalsalt, såkaldt alkoholyse, mens etoposid ifølge opfindelsen fremstilles ved omsætning af di- eller trihalogenacetylderivatet med formlen III med en lavere C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkohol i tilstedeværelse af et ammoniumsalt af en carboxylsyre, dvs. ved alkoholyse.

Det har uventet vist sig, at etoposid kan fremstilles i højere udbytte og med højere renhed ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen end ved den kendte fremgangsmåde.

Således er udbyttet af isoleret etoposid ved fremgangsmåden ifølge eksempel 2-10 i ansøgning 4255/83, ved hvilken monohalogenacetylderivatet omsættes med en alkohol i tilstedeværelse af calciumacetat kun 67,3%.

Ifølge eksempel 2-1 i nævnte ansøgning fremstilles etoposid i et udbytte på 83,1% i tilstedeværelse af zinkchlorid. Ved sammenligningsforsøg nr. 2, der følger senere i beskrivelsen var udbyttet ved en sådan fremgangsmåde imidlertid kun 66,5% ved den første og 11,2% ved den anden opsamling at etoposid, dvs. ialt kun 77,7%. Desuden var renheden dårlig, 95,7% efter første og 94,5% efter anden opsamling.

Fremgangsmåden ifølge DK-ansøgning nr. 4255/83, ved hvilken der anvendes en amin (en såkaldt ammonolyse), er en helt anden end fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er en alkoholyse. Udbyttet ved anvendelse af ethylamin er i eksempel 1-1 i nævnte ansøgning angivet til 83,1%. Ved sammenligningsforsøg nr. 3, der følger senere i beskrivelsen og angår samme fremgangsmåde, var udbyttet imidlertid kun 55,2% efter første og 9,1% efter anden opsamling, dvs. ialt 64,3%.

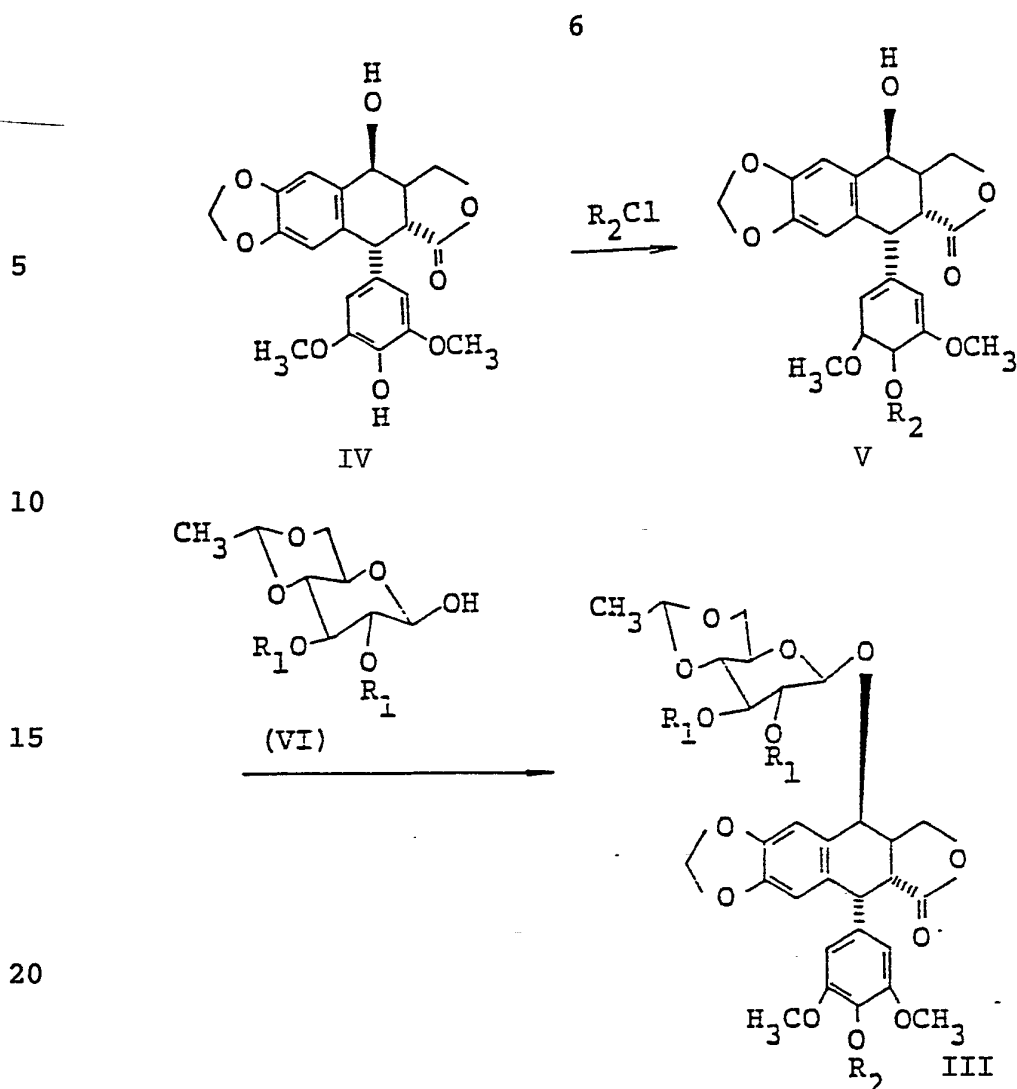
Som det fremgår af sammenligningsforsøg nr. 1, opnåedes etoposid ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen i et højere udbytte. Udbyttet efter første opsamling af etoposid var 86,6% og efter anden 11,0%, dvs. ialt så højt som 97,6%. Endvidere var renheden ved denne fremgangsmåde 99%, 99,2% efter første og 99,1% efter anden opsamling af etoposid.

Udbyttet baseret på den dannede mængde etoposid i reaktionsblandingen var 87,8% ved sammenligningsforsøg nr. 2, 76,7% ved forsøg nr. 3 og 97,8% ved forsøg nr. 1 ifølge opfindelsen.

Af de ovenfor refererede resultater ses det, at etoposid fremstilles i udbytter på kun 77,7% og 66,5%, inkl. udbyttet ved den anden opsamling, ifølge DK-ansøgning nr. 4255/83, mens det fremstilles i et udbytte på 97,6% ifølge opfindelsen. Følgelig kan etoposidudbyttet øges med mere end 20% ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Selv hvis etoposid kunne opnås i et udbytte på 83,1% ifølge den kendte metode, ville udbyttet stadig blive øget med mere end 14%.

Som det fremgår af sammenligningsforsøg nr. 4 bliver udbyttet, når monochloracetylderivatet behandles under de samme betingelser som i eksempel 1, kun 3,7%. Dette viser, at det høje etoposidudbytte ifølge opfindelsen er uventet og kan tilskrives anvendelsen af specifikke reaktionsbetingelser og di- eller trichloracetylderivatet som udgangsmateriale.

Forbindelsen med formlen III, som anvendes som udgangsmateriale ifølge opfindelsen er en hidtil ukendt forbindelse, der ikke er beskrevet i litteraturen, og den kan fremstilles ved anvendelse af det velkendte 4'-demethylepipodophyllotoxin (IV) (se US-patentskrift nr. 3524844) som udgangsmateriale og omsætning heraf f.eks. ved de følgende reaktioner:



i hvilke formler  $R_1$  og  $R_2$  er som defineret ovenfor. Forbindelsen I kan således opnås ved omsætning af 4'-demethylepipodophyllotoxin (IV) med et dihalogen- eller trihalogenacetylchlorid ( $R_2Cl$ ) i et inert opløsningsmiddel og kondensations af det opnåede 4'-halogenacetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (V) med en 4,6-O-ethyliden-2,3-di-O-halogenacetyl- $\beta$ -D-glycopyranose (VI) ved en

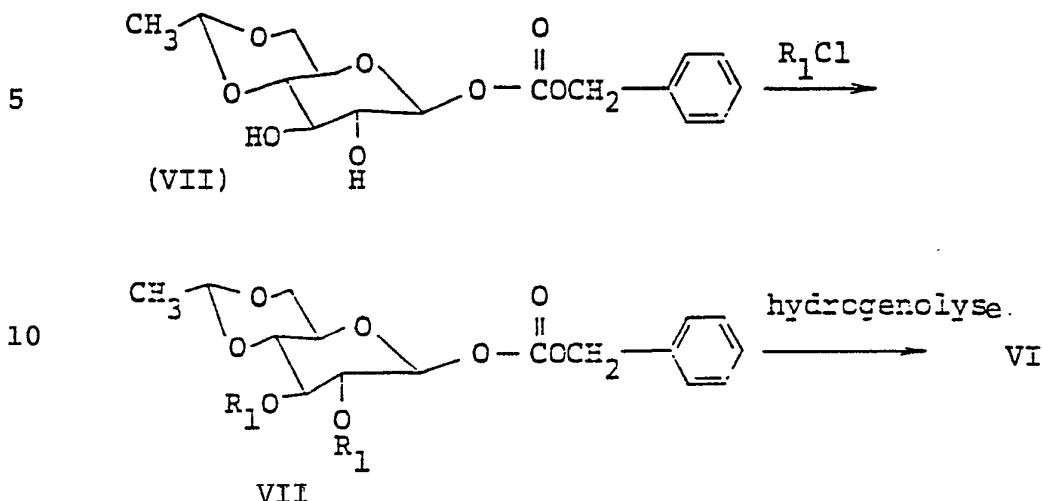
25

30 temperatur, der er lavere end  $0^\circ C$ , i et inert opløsningsmiddel i tilstedeværelse af bortrifluorethyletherat. Det er hensigtsmæssigt, at glucopyranosen med almene formel IV anvendes i en mængde på mindst ét ækvivalent pr. ækvivalent af forbindelsen med den almene formel V.

35 Forbindelsen VI er hidtil ukendt og kan fremstilles ved anvendelse af en velkendt 4,6-O-ethyliden-

7

1-O-benzyloxycarbonyl- $\beta$ -D-glucopyranose (VII) som udgangsmateriale, f.eks. ved den følgende reaktionsvej:



i hvilke formler R<sub>1</sub> er som defineret ovenfor. Forbindel-

15 sen VI kan således opnås ved omsætning af 4,6-O-ethyliden-1-O-benzyloxycarbonyl- $\beta$ -D-glucopyranose (VII) med et dihalogen- eller trihalogenacetylchlorid i et inert opløsningsmiddel og ved at udsætte den opnåede 4,6-O-ethyliden-1-O-benzyloxycarbonyl-2,3-di-O-halogenacetyl- $\beta$ -D-

20 glucopyranose (VIII) for hydrogenolyse. Skønt dannelsen af en lille mængde af  $\alpha$ -isomeren ikke kan undgås under hydrogenolysen, har forbindelsen VI sådanne egenskaber, at adskillelsen af  $\alpha$ -isomeren fra  $\beta$ -isomeren er let, idet kun  $\beta$ -isomeren udkrystalliserer selektivt fra reaktionsopløsningen. Endvidere har  $\beta$ -isomeren af forbindelsen VI god stabilitet, og den undergår i det væsentlige ingen isomerisation til  $\alpha$ -isomeren, hvorfor den kan opbevares i lang tid.

Ifølge opfindelsen kan fjernelsen af halogenacetylgrupperne udføres under milde betingelser, f.eks. ved

30 25°C eller stuetemperatur, indenfor et kort tidsrum, således at dannelsen af biprodukter, såsom farvede produkter, er lille, og det er muligt at opnå etoposid ud fra forbindelsen III i højt udbytte. Derfor er rensningen efter reaktionen, f.eks. fjernelse af farvede produkter, let, og rent etoposid kan f.eks. opnås ved til-

35

sætning af et hydrofobt opløsningsmiddel, såsom chloroform, til reaktionsopløsningen, vaskning af opløsningen med vand, afdrivning af opløsningsmidlet og omkrystallisation af remanensen i et opløsningsmiddel. Det opnåede etoposid har et så usædvanligt lavt indhold af uorganisk materiale, at dets forbrændingsrest (en rest, der bliver tilbage efter forbrænding af etoposidet) er 0,1 vægt% eller mindre. Når en alkohol omsættes i tilstedeværelse af et ammoniumsalt af en lavere fed syre, såsom ammoniumacetat, ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, afsluttes reaktionen endvidere indenfor et kort tidsrum ved stuetemperatur, og etoposidet kan udvindes blot ved opkoncentrering af reaktionsopløsningen, således at udførelsen af reaktionen og efterbehandlingen efter reaktionen er let, og fremgangsmåden er overordentligt fordelagtig som en industriel produktionsproces.

Opfindelsen vil i det følgende blive beskrevet i detaljer ved hjælp af eksempler.

#### Eksempel 1

20

1 g af 4'-dichloracetyl-4'-demethylepipodophyllo-toxin- $\beta$ -D-2,3-di-O-dichloracetyl-4,6-O-ethylidenglucosid (III) ( $R_1, R_2 = -COCHCl_2$ ) og 1 g ammoniumacetat blev opløst i 20 ml methanol, og opløsningen blev omrørt ved 25°C i 1,5 timer. Efter afslutning af reaktionen blev methanolen opkoncentreret til 10 ml, og den opnåede opløsning blev afkølet til opnåelse af 0,55 g (udbytte: 86,1%) etoposid.

$R_f$ -Værdien ved TLC (silicagel, fremkalder chloroform:methanol (1:1)), IR, NMR og optisk rotation for det opnåede krystal var identisk med data for forbindelsen opnået ved fremgangsmåden ifølge canadisk patentskrift nr. 956939.

Smp.: 259-269°C,  $R_f = 0,44$ .

35

## Eksemplerne 2-9

1 g af forbindelsen III ( $R_1, R_2 = -COCHCl_2$ ) blev omsat under de betingelser, der er vist i den følgende tabel, og reaktionsblandingen blev behandlet på samme måde som i eksempel 1 til opnåelse af etoposid.

10

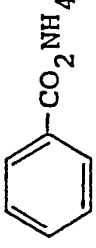
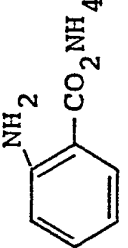
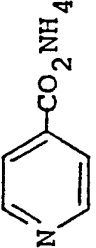
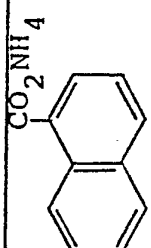
15

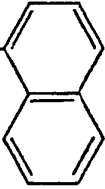
20

25

30

35

| Eksem-<br>pel | Katalysator  | Methanol-<br>mængde | Reaktions-<br>temperatur,<br>Reaktionstid | Udbytte af<br>etoposid (I) |
|---------------|--|---------------------|---|----------------------------|
| 2             | $\text{HCO}_2\text{NH}_4$  | 20 ml               | 25°C 3 timer                              | 86,5 %                     |
| 3             | $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{CCO}_2\text{NH}_4 \\   \\ \text{H}_2\text{CCO}_2\text{NH}_4 \end{array}$ | 20 ml               | " 7 timer                                 | 77,8 %                     |
| 4             |                         | 20 ml               | " 4 timer                                 | 82,4 %                     |
| 5             |                         | 20 ml               | " 4 timer                                 | 81,5 %                     |
| 6             |                       | 20 ml               | " 4 timer                                 | 81,8 %                     |
| 7             |                       | 20 ml               | " 2 timer                                 | 83,1 %                     |

| Eksempel | Katalysator  | Methanol<br>mængde | Reaktions-<br>temperatur<br>Reaktionstid | Udbytte af<br>etoposid (I) |
|----------|--|--------------------|--|----------------------------|
| 8        | $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$<br> | 20 ml              | 25°C 2 timer                             | 80,2%                      |
| 9        | svagt surt ion-<br>bytterharpiks* 1 g  | 20 ml              | " 5 timer                                | 78,6%                      |

\* WK-20 R (N<sup>+</sup>H<sub>4</sub>): et produkt fra Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.

## Eksempel 10

Fremstilling af 4'-dichloracetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- $\beta$ -D-2,3-di-O-dichloracetyl-4,6-O-ethylidenglucosid (III) ( $R_1, R_2 = -COCHCl_2$ ).

5 (a) 4'-dichloracetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (V)  
( $R_2 = -COCHCl_2$ ).

8 g 4'-demethylepipodophyllotoxin (IV) blev opløst i 160 ml acetone, og opløsningen blev efter til-  
10 sætning af 3,2 g pyridin afkølet til  $-5$  til  $-10^\circ\text{C}$ . Til denne opløsning tilsattes 4,1 g dichloracetylchlorid dråbevist over et tidsrum på 1,5 timer, og opløsningen blev omrørt i yderligere 0,5 time. Acetonen blev afdre-  
vet i vakuum, og det opnåede faste stof blev opløst i  
15 160 ml 1,2-dichlorethan og vasket med vand. 1,2-Dichlor-  
ethanopløsningen blev tørret over vandfrit magnesiumsul-  
fat og dernæst opkoncentreret i vakuum til opnåelse af  
9,5 g (udbytte: 93,4%) af forbindelsen V ( $R_2 = -COCHCl_2$ ).

20 Smp.:  $207-208^\circ\text{C}$ .

IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3540, 1775, 1600, 1485, 1235, 1130  $\text{cm}^{-1}$

(b) 4,6-O-ethyliden-1-O-benzyloxycarbonyl-2,3-di-O-di-  
chloracetyl- $\beta$ -D-glucopyranose (VIII) ( $R_1 =$   
25  $-COCHCl_2$ ).

34.0 g 4,6-O-ethyliden-1-O-benzyloxycarbonyl- $\beta$ -D-  
glucopyranose (VII) blev suspenderet i 340 ml 1,2-di-  
chlorethan, og efter tilsætning af 23,7 g pyridin blev  
suspensionen afkølet til  $0-5^\circ\text{C}$ . Til denne suspension  
30 tilsattes 32,4 g dichloracetylchlorid dråbevist i løbet  
af et tidsrum på ca. 1 time, og der blev omrørt i yder-  
ligere 0,5 time. Reaktionsopløsningen blev vasket med  
vand, og den organiske fase blev tørret over vandfrit  
magnesiumsulfat og opkoncentreret i vakuum til opnåelse  
35 af 51,0 g (udbytte: 90%) af forbindelsen (VIII) ( $R_1 =$

-COCHCl<sub>2</sub>).

Smp. 150-151°C.

IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1770, 1255, 1100, 820 cm<sup>-1</sup>

- 5 (c) 4,6-O-ethyliden-2,3-di-O-dichloracetyl- $\beta$ -D-glucopyranose (VI) (R<sub>1</sub> = -COCHCl<sub>2</sub>).

10,0 g af forbindelsen VIII (R<sub>1</sub> = -COCHCl<sub>2</sub>) blev opløst i 50 ml acetone, og opløsningen blev efter tilsætning af 1,0 g palladium-sort underkastet hydrogenolyse ved -5 til -10°C og ved forhøjet tryk. Efter afslutning af reaktionen blev katalysatoren filtreret fra, og opløsningsmidlet blev afdrevet i vakuum. 17 ml diisopropylether blev tilsat til remanensen, og blandingen blev afkølet til 0°C og filtreret ved sugning til opnåelse af 7,3 g (udbytte: 95,9%) af forbindelsen IV (R<sub>1</sub> = -COCHCl<sub>2</sub>).

Smp. 133-135°C.

IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3445, 1775, 1305, 1165, 1095, 1005, 815 cm<sup>-1</sup>

- 20 (d) 4'-Dichloracetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- $\beta$ -D-2,3-di-O-dichloracetyl-4,6-O-ethylidenglucosid (III) (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = -COCHCl<sub>2</sub>).

3,0 g af forbindelsen V (R<sub>2</sub> = -COCHCl<sub>2</sub>) blev opløst i 60 ml 1,2-dichlorethan, og opløsningen blev efter tilsætning af 2,5 g af forbindelsen VI (R<sub>1</sub> = -COCHCl<sub>2</sub>) afkølet til -10°C. 1,1 g bortrifluoridethyletherat blev tilsat dråbevist i løbet af et tidsrum på ca. 1,5 time, og reaktionsblandingen blev efter afslutning af tilsætningen omrørt i yderligere 0,5 time. 0,8 g pyridin blev tilsat dråbevist, mens den indre temperatur blev holdt på mellem -5 og -10°C, og reaktionsblandingen blev vasket med vand. Den organiske fase blev tørret over vandfrit magnesiumsulfat og opkoncentreret i vakuum, og remanensen blev omkrystalliseret i methanol til opnåelse af 4,4 g (udbytte: 81,4%) af forbindelsen III (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = -COCHCl<sub>2</sub>).

Smp. 207-208°C.

IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1880, 1610, 1490, 1240, 1130, 935, 820  $\text{cm}^{-1}$

Forbindelsen III blev endvidere opnået ud fra 1,5  
5 g af forbindelsen V og 5,0 g af forbindelsen VI ved  
samme reaktion og behandling som beskrevet ovenfor.

#### Eksempel 11

4'-Dichloracetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- $\beta$ -D-2,3-  
10 di-O-trichloracetyl-4,6-O-ethylidenglucosid (III) ( $R_1 =$   
 $-\text{COCCl}_3$ ,  $R_2 = -\text{COCHCl}_2$ ).

(a) 4,6-O-Ethyliden-1-O-benzyloxycarbonyl-2,3-di-O-tri-  
chloracetyl- $\beta$ -D-glucopyranose (VIII) ( $R_1 = -\text{COCCl}_3$ ).  
15 25 ml 1,2-dichlorethanopløsning af forbindelsen  
VIII ( $R_1 = -\text{COCCl}_3$ ) blev opnået ved den samme reaktion  
som i eksempel 10, bortset fra at dichloracetylchlorid  
var erstattet af triacetylchlorid.

20 (b) 4,6-O-Ethyliden-2,3-di-O-trichloracetyl- $\beta$ -D-glucopy-  
ranose (VI) ( $R_1 = -\text{COCCl}_3$ ).

25 25 ml af en 1,2-dichlorethanopløsning af forbin-  
delsen VI ( $R_1 = -\text{COCCl}_3$ ) blev opnået ved den samme reak-  
tion som i eksempel 10 ved anvendelse af 25 ml af opløs-  
ningen opnået i (a).

(c) 4'-Dichloracetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- $\beta$ -D-  
2,3-di-O-trichloracetyl-4,6-O-ethylidenglucosid  
(III) ( $R_1 = -\text{COCCl}_3$ ,  $R_2 = -\text{COCHCl}_2$ ).

30 Forbindelse III ( $R_1 = -\text{COCCl}_3$ ,  $R_2 = -\text{COCHCl}_2$ )  
blev opnået ved omsætnig af 20 ml af opløsningen opnået  
i (b) med 50 ml 1,2-dichlorethanopløsning indeholden-  
de forbindelsen V ( $R_2 = -\text{COCHCl}_2$ ) opnået i eksempel 10  
(a) på samme måde som i eksempel 10 .

Sammenligningsforsøg

Eksempel 1 og eksemplerne 2-1 og 1-1 beskrevet i  
5 dansk patentansøgning nr. 4255/83 blev gentaget. Endvi-  
dere udførtes et forsøg, ved hvilket monochloracetyl-  
derivatet angivet i ansøgning nr. 4255/83 behandledes  
under samme betingelser som i eksempel 1 i den nærværende  
beskrivelse. Udbyttet af den første opsamling af etopo-  
10 sid og den anden opsamling af etoposid, baseret på mæng-  
den af dannet etoposid i reaktionsblandingen, og renhe-  
den af det opnåede etoposid ved de respektive forsøg  
sammenlignedes med hinanden.

15

Fremgangsmåde til udførelse af forsøgene.

Forsøgene nr. 1, 2 og 3 udførtes i overensstem-  
mese med henholdsvis eksempel 1 ifølge opfindelsen, eks-  
20 empel 2-1 og 1-1 ifølge ansøgning nr. 4255/83. Forsøg  
nr. 4 udførtes ved behandling af monochloracetyl-deriva-  
tet beskrevet i DK-ansøgning nr. 4255/83 under de samme  
reaktionsbetingelser som i eksempel 1 ifølge opfindelsen.

Den anden opsamlede portion af etoposid opnåedes  
25 fra moderluden ved omkrystallisation, idet fremgangsmå-  
den til opnåelse af den anden portion hverken er angivet  
i eksemplerne ved nærværende opfindelse eller i DK-  
ansøgning nr. 4255/83.

De detaljerede fremgangsmåder var som følger.

30

Forsøg nr. 1 (eksempel 1 ifølge opfindelsen)

5,53 g 4'-dichloracetyl-4'-demethylepipodophyllo-  
toxin- $\beta$ -D-2,3-dichloracetyl-4,6-O-ethylidenglucosid og  
35 5,53 g ammoniumacetat opløstes i 110 ml methanol, og  
opløsningen omrørtes ved stuetemperatur (25°C) i 1,5 ti-

mer. Efter måling af reaktionsblandings vægt og udtagelse af en prøve på 15 ml af reaktionsblandingen til kvantitativ analyse af dannet etoposid, koncentreredes reaktionsblandingen til 55 ml, og den resulterende, 5 koncentrerede opløsning afkøledes til 5°C. De fældede krystaller filtreredes fra, vaskedes med 10 ml methanol og vakuamtørredes ved 50°C i 5 timer til opnåelse af 3,02 g (omregnet på tørstofbasis) etoposid som den første, opsamlede portion (85,6% udbytte).

|    |                       |        |
|----|-----------------------|--------|
| 10 | opnåede krystaller:   | 3,07 g |
|    | indhold:              | 98,3%  |
|    | renhed målt ved HPLC: | 99,2%. |

Filtratet fra den første omkrystallisation inddampedes til tørhed, og 50 ml chloroform og 30 ml vand 15 tilsattes. Den flydende blanding omrørtes, henstod og den organiske fase skiltes fra blandingen. Den organiske fase vaskedes med 30 ml vand, koncentreredes til 10 ml og afkøledes til 5°C. De udfældede krystaller filtreredes fra, vaskedes med 5 ml chloroform, vakuamtørredes ved 20 50°C i 5 timer til opnåelse af 0,42 g (omregnet til tørstofbasis) etoposid som den anden opsamlede portion (12% udbytte).

|    |                      |        |
|----|----------------------|--------|
|    | opnåede krystaller:  | 0,48 g |
|    | indhold:             | 88,0%  |
| 25 | renhed målt ved HPLC | 99,1%. |

Forsøg nr. 2 (eksempel 2-1 ifølge DK-ansøgning nr. 4255/83).

---

30 8,2 g 4'-chloracetyl-4'-demethylepipodophyllo-  
toxin- $\beta$ -D-2,3-di-O-chloroacetyl-4,6-O-ethylidenglucosid  
og 1,6 g vandfrit zinkchlorid opløstes i 300 ml methanol, og opløsningen opvarmedes under tilbagesvaling i en  
time. Efter måling af reaktionsblandings vægt og ud-  
35 tagelse af en prøve på 15 ml af reaktionsblandingen til  
kvantitativ analyse af dannet etoposid, destilleredes

methanol af reaktionsblandingen. Efter tilsætning af 200 ml chloroform til remanensen vaskedes blandingen med vand og tørredes over vandfrit natriumsulfat. Efter afdestillilation af opløsningsmidlet under reduceret tryk  
 5 sattes 50 ml methanol til remanensen, og blandingen afkøledes til 5°C. De udfældede krystaller filtreredes fra, vaskedes med 10 ml methanol og vakuamtørredes ved 50°C i 5 timer til opnåelse af 3,92 g (omregnet til tørstofbasis) etoposid som den først opsamlede portion  
 10 (66,5% udbytte).

|                      |        |
|----------------------|--------|
| opnåede krystaller:  | 4,42 g |
| indhold:             | 93,0%  |
| renhed målt ved HPLC | 95,7%. |

Filtratet fra den første omkrystallisation ind-  
 15 dampedes til tørhed, og 10 ml chloroform sattes til remanensen. Efter afkøling af opløsningen til 5°C filtreredes de udfældede krystaller fra, de vaskedes med 5 ml chloroform og vakuamtørredes ved 50°C i 5 timer til opnåelse af 0,66 g (omregnet til tørstofbasis) af etoposid som den anden opsamlede portion (11,2% udbytte).  
 20

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| opnåede krystaller:   | 0,75 g |
| indhold:              | 88,2%  |
| renhed målt ved HPLC: | 94,5%. |

25 Forsøg nr. 3 (eksempel 1-1 ifølge DK-ansøgning nr. 4255/83).

---

8,2 g 4'-chloracetyl-4'-demethylepipodophyllo-  
 toxin- $\beta$ -D-2,3-di-O-ethylidenglucosid opløstes i 50 ml  
 30 pyridin, og den resulterende opløsning afkøledes til 0°C. 4,5 g 70% vandig ethylamin sattes dråbevist dertil, og blandingen omrørtes i 1 time ved 0°C. Dernæst sattes 200 ml chloroform til reaktionsblandingen, som neutraliseredes med 2N saltsyre. Den organiske fase  
 35 skiltes fra blandingen og vaskedes med to portioner af 100 ml vand. Efter måling af den organiske fases vægt

og udtagelse af en prøve på 15 ml af den organiske fase til kvantitativ analyse af dannet etoposid, tørredes den organiske fase over vandfrit natriumsulfat. Den tørrede organiske opløsning koncentreredes til 50 ml under reduceret tryk og afkøledes til 5°C. De fældede krystaller filtreredes fra, vaskedes med 10 ml chloroform og vakuamtørredes ved 50°C i 5 timer til opnåelse af 3,26 g (omregnet til tørstofbasis) etoposid som den først opsamlede portion (55,2%'s udbytte).

|    |                      |        |
|----|----------------------|--------|
| 10 | opnåede krystaller:  | 3,39 g |
|    | indhold:             | 96,2%  |
|    | renhed målt ved HPLC | 99,3%. |

Filtratet fra den første omkrystallisation koncentreredes til 10 ml under reduceret tryk og afkøledes til 5°C. De fældede krystaller filtreredes fra, vaskedes med 5 ml chloroform og vakuamtørredes ved 50°C i 5 timer til opnåelse af 0,54 g (omregnet til tørstofbasis) etoposid som den anden, opsamlede portion (9,1%'s udbytte).

|    |                      |        |
|----|----------------------|--------|
| 20 | opnåede krystaller:  | 0,62 g |
|    | indhold:             | 87,4%  |
|    | renhed målt ved HPLC | 97,6%. |

#### Forsøg nr. 4

25           1,0 g 4'-chloracetyl-4'-demethylepipodiphyllotoxin- $\beta$ -D-2,3-di-O-chloracetyl-4,6-O-ethylidenglucosid og 1,0 g ammoniumacetat opløstes i 20 ml methanol, og opløsningen omrørtes ved stuetemperatur (25°C) i 1,5 timer. Efter måling af reaktionsblandingsens vægt blev en  
30 prøve på 15 ml udtaget fra reaktionsblandingen til kvantitativ analyse af dannet etoposid.

3. Forsøgsresultater.

Resultaterne ved hvert forsøg er vist i det følgende.

| Forsøg nr. | Udgangsmateriale (g) | Katalysator (g)           | Opløsningsmiddel (ml) | Betingelser |            | Udbytte af etoposid i reaktionsblandingen |      |
|------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|-------------|------------|---|------|
|            |                      |                           |                       | Temp (°C)   | Tid (time) | (g)                                       | (%)  |
| 1          | Dichlor- 5,53        | AcONH <sub>4</sub> 5,53   | MeOH 110              | 25          | 1,5        | 3,45                                      | 97,8 |
| 2          | Chlor- 8,20          | ZnCl <sub>2</sub> 1,60    | MeOH 300              | 65          | 1,0        | 5,18                                      | 87,8 |
| 3          | Chlor- 8,20          | 70%EtNH <sub>2</sub> 4,50 | Pyridin 50            | 0           | 1,0        | 4,52                                      | 76,6 |
| 4          | Chlor- 1,00          | AcONH <sub>4</sub> 1,00   | MeOH 20               | 25          | 1,5        | 0,03                                      | 3,8  |

| Forsøg nr. | Udbytte af isoleret etoposid |      |            |              |      |            |
|------------|------------------------------|------|------------|--------------|------|------------|
|            | 1. opsamling                 |      |            | 2. opsamling |      |            |
|            | (g)                          | (%)  | Renhed (%) | (g)          | (%)  | Renhed (%) |
| 1          | 3,06                         | 86,6 | 99,2       | 0,39         | 11,0 | 99,1       |
| 2          | 3,92                         | 66,5 | 95,7       | 0,66         | 11,2 | 94,5       |
| 3          | 3,26                         | 55,2 | 99,3       | 0,54         | 9,1  | 97,6       |

Etoposid i reaktionsblandingen og de isolerede krystaller analyseredes ved HPLC. I forsøg nr. 1, 2 og 4 anvendtes reaktionsblandingerne direkte til kvantitativ analyse af etoposid. I forsøg nr. 3 anvendtes chloroformekstraktet af reaktionsblandingen til kvantitativ analyse af etoposid, idet pyridin, der gør HPLC-analysen ubrugelig, anvendtes som opløsningsmiddel ved reaktionen. I forsøg nr. 4 isoleredes etoposid ikke, idet udbyttet i reaktionsblandingen kun var 3,8%.

15

20

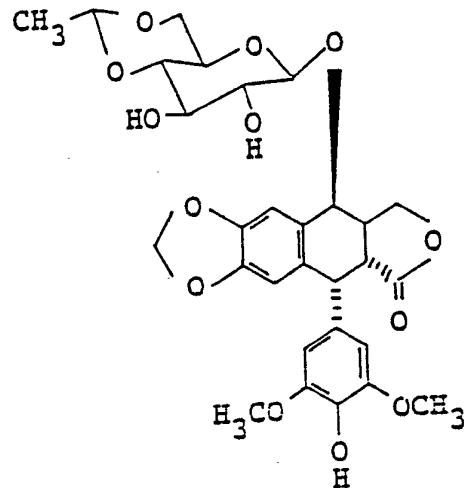
25

30

35

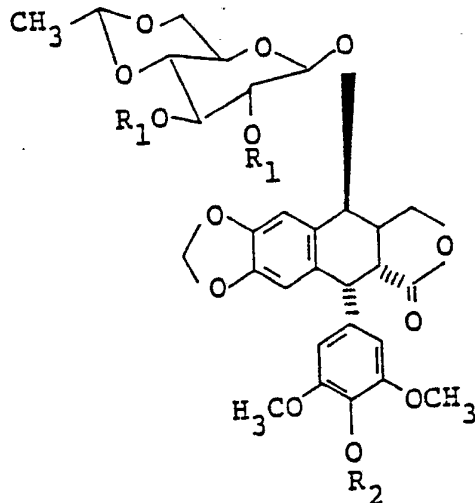
## P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af etoposid med formelen I:



I

kendetegnet ved, at man omsætter et 4'-halogenacetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- $\beta$ -D-2,3-di-O-halogenacetyl-4,6-O-ethylidenglucosid med den almene formel:



III

hvor  $R_1$  og  $R_2$ , som kan være ens eller forskellige, hver betegner  $-\text{COCHX}_2$  eller  $-\text{COCX}_3$ , hvor  $X$  betegner et chloratom, med en  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -alkohol med 1-3 hydroxylgrupper i tilstedeværelse af et ammoniumsalt af en organisk carboxylsyre ved en temperatur på  $-10$  til  $100^\circ\text{C}$  til fjernelse af halogenacetylgrupperne.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at ammoniumsaltet af den organiske carboxyl-  
syre er et ammoniumsalt af en mættet fed syre med 1-3 C-  
atomer.

5           3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at alkoholen er methanol eller ethanol.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at man anvender mindst 1 ækvivalent af  
alkoholen pr. ækvivalent af forbindelsen III.

10           5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at mængden af ammoniumsaltet af den organis-  
ke carboxylsyre er 5 til 100 vægt% på basis af forbin-  
delsen med den almene formel III.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e -  
15 t e g n e t ved, at omsætningen udføres med en mængde  
methanol eller ethanol, der mindst er ækvivalent med  
mængden af forbindelsen med formlen III, i tilstedevæ-  
relse af ammoniumacetat eller -formiat i en mængde på  
5-100 vægt% på basis af forbindelsen med formlen III.

20

25

30

35