



ŘÍDÍ PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

218585
(11) (B2)

[51] Int. Cl.³
C 07 D 519/04

[22] Přihlášeno 19 04 79

[21] [PV 7546-80]

[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 č. 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 léčbě nádorových onemocnění, zejména leukemií 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 neobvykle složitá, a že je tedy neobvykle 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. Antineoplastická účinnost se tedy zdála být omezena 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 nepříbuznými

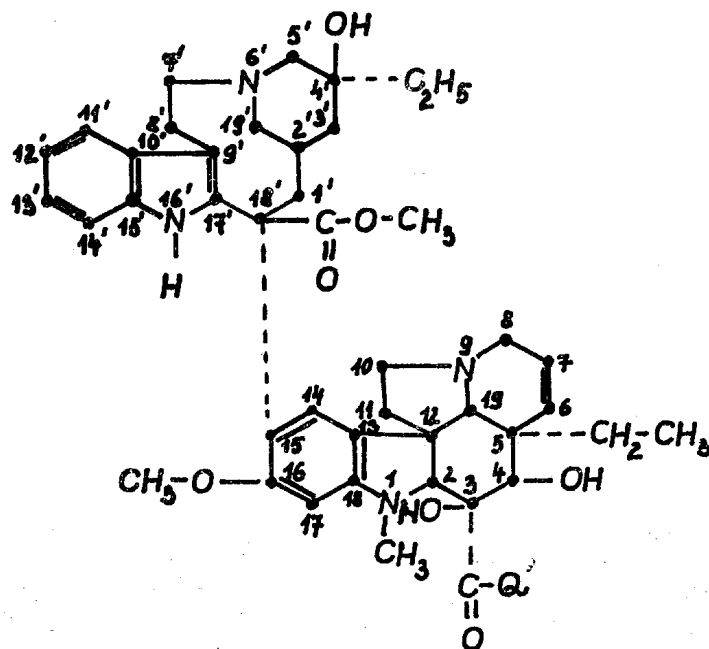
acylovými skupinami (viz americký patentový spis č. 3 392 173). Některé z těchto C₄-derivátů jsou schopné prodloužit život myši inokulovaných leukémií P 1534. Jeden z těchto C₄-derivátů, v němž je C₄-acetylová skupina VLB nahrazena chloracetylovou skupinou, je rovněž užitečným meziproduktem pro přípravu strukturně modifikovaných derivátů VLB, v nichž C₄-acetylovou skupinu VLB nahrazuje N,N-dialkylglycylová skupina (viz americký patentový spis 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 rezistentním 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]).

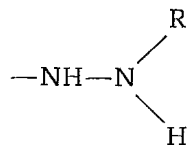
Předmětem vynálezu je způsob výroby nových sloučenin obecného vzorce I,



(II)

ve kterém

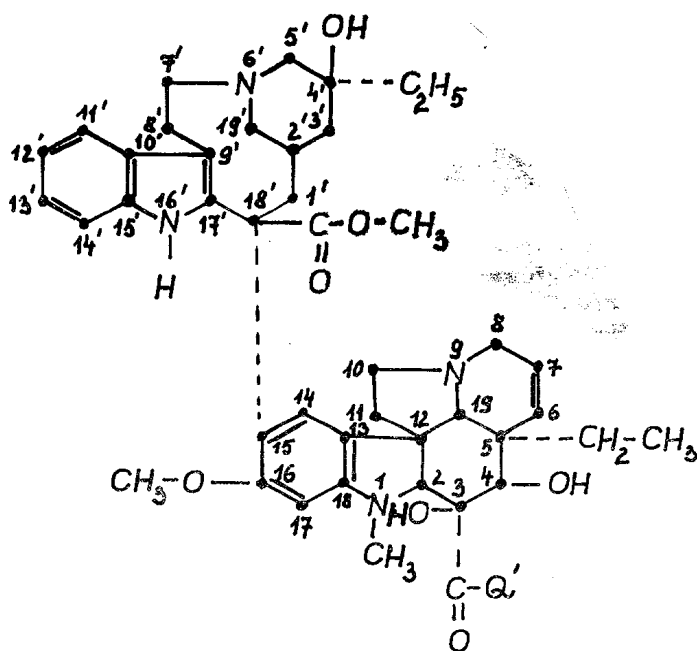
Q představuje zbytek vzorce



kde

R znamená alkanoylovou skupinu s 2 až 4 atomy uhlíku, dichloracetylovou skupinu nebo benzoylovou skupinu,

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



(IA)

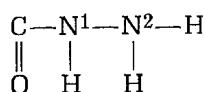
ve kterém

Q' znamená skupinu $-\text{NHNH}_2$, nechá reagovat s anhydridem nebo chloridem alkanové kyseliny s 2 až 4 atomy uhlíku, dichloroctové kyseliny nebo benzoové kyseliny.

Symbol R ve sloučenině obecného vzorce I může znamenat acetylovou, propynylovou, n-butyrylovou, isobutyrylovou, dichloracetylovou nebo benzoylovou skupinu.

Sloučeniny obecného vzorce I jsou pojmenovány jako deriváty C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB. Systematický název těchto sloučenin by měl zahrnovat výraz „3-demethoxykarbonyl“, 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 C₃-methoxyskupiny hydrazidovým seskupením. Přednost se však nicméně 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 alter-

nativními postupy. Výhodný postup spočívá v tom, že se nejprve připraví C₃-karboxhydrazid 4-deacetyl-VLB, a to působením hydrazidu 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 acetoxykupiny 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 za použití C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB jako výchozího materiálu, připraveného libovolným způsobem.

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

Příprava výchozích látek

(1) 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, vy-

suší 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.

(2) C₃-karboxazid 4-deacetyl-VLB

V 15 ml bezvodého methanolu se rozpustí 678 mg C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB, přidá se cca 50 ml 1 N vodné kyseliny chlorovodíkové, výsledný roztok se ochladí zhruba na 0 °C a přidá se k němu cca 140 mg dusitanu sodného. Reakční směs se za udržování teploty zhruba na 0 °C 10 minut míchá, přičemž se po přidání dusitanu sodného její barva změní na tmavě červenohnědou. Výsledná směs se zalkalizuje přidavkem studeného 5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a vodný roztok se třikrát extrahuje methylenchloridem, přičemž C₃-karboxazid 4-deacetyl-VLB, vzniklý při shora popsané reakci, přejde do methylenchloridu. Methylenchloridový roztok C₃-karboxazidu 4-deacetyl-VLB se obvykle používá bez dalšího čištění.

Příprava finálních produktů

Příklad 1

Příprava C₃-N²-acetylkarboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB

K roztoku 1500 mg C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB v 50 ml dichlormethanu se přidá 300 mg acetanhydridu a reakční směs se nechá 3 hodiny reagovat při teplotě místnosti. Výsledný dichlormethanový roztok se promyje zředěným hydroxidem amonným a vodou, vysuší se a odpaří se k suchu. Získá se 750 mg červenožlutého amorfního práškového zbytku, tvořeného C₃-N²-acetylkarboxhydrazidem 4-deacetyl-VLB s následujícími fyzikálními charakteristikami:

Hmotnostní spektrum:

$$m/e = 810 (M^+).$$

IČ: $\nu = 3410 \text{ cm}^{-1}$ (N—H),
 1720 cm^{-1} (COO),
 1670 cm^{-1} (CON).

Náhradou acetanhydridu při shora popsaném postupu anhydridem kyseliny dichloroctové se obdobným způsobem připraví C₃-

-N²-dichloracetylkarboxhydrazid 4-deacetyl-VLB.

Příklad 2

Příprava C₃-N²-butyrylkarboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB

K roztoku 768 mg C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB v 50 ml dichlormethanu se přidá 120 mg anhydridu kyseliny máselné. Reakční nádoba se uzavře a nechá se přes noc stát při teplotě místnosti. Reakční směs se extrahuje zředěným hydroxidem amonným a extrakt se odloží. Dichlormethanový roztok se vysuší a odpaří se k suchu. Zbytek se chromatografuje na silikagelu za použití směsi stejných dílů ethylacetátu a methanolu jako elučního činidla. Frakce, obsahující podle chromatografie na tenké vrstvě žádaný produkt, se spojí a odpaří se k suchu. Získá se 128 mg červenožlutého amorfního prášku tvořeného C₃-N²-butyrylkarboxhydrazidem 4-deacetyl-VLB s následujícími fyzikálními charakteristikami:

Hmotnostní spektrum:

$$m/e = 838 (M^+), 497, 355, 154.$$

Příklad 3

Příprava C₃-N²-benzoylkarboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB

K roztoku 768 mg C₃-karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB v 50 ml dichlormethanu se přidá 240 mg anhydridu kyseliny benzoové. Reakční nádoba se uzavře, nechá se přes noc stát při teplotě místnosti, pak se otevře a dichlormethanový roztok se k odstranění solí kyseliny benzoové promyje nejprve zředěným hydroxidem amonným a pak vodou. Dichlormethanový roztok se vysuší, odpaří se k suchu a amorfní práškový zbytek se chromatografuje na silikagelu za použití směsi stejných dílů ethylacetátu a methanolu jako elučního činidla. Frakce, obsahující podle chromatografie na tenké vrstvě [silikagel, ethylacetát-methanol (1:1)] žádaný produkt se spojí a odpaří se k suchu. Získá se 150 mg amorfního práškového zbytku tvořeného C₃-N²-benzoylkarboxhydrazidem 4-deacetyl-VLB s následujícími fyzikálními charakteristikami:

Hmotnostní spektrum:

$$m/e = 872 (M^+), 813, 531, 355, 154.$$

NMR: odpovídá uvedené struktuře; nové aromatické protony při δ 7,3 až 8,0.

Příklad 4

Příprava C₃-N²-(β -acetoxyethyl)karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB

1624 mg $C_3-N^2-(\beta\text{-hydroxyethyl})$ karboxhydrazidu 4-deacetyl-VLB se rozpustí v 50 ml dichlormethanu a k roztoku se přidá 220 mg acetanhydridu. Reakční nádoba se uzavře a nechá se přes noc stát při teplotě místnosti. Reakční směs se promyje zředěným hydroxidem amonným a vodou. Dichlormethanový roztok se vysuší a odpaří se k suchu. Amorní práškový zbytek se směsí stejných dílů ethylacetátu a methanolu jako elučního činidla. Frakce obsahující podle chromatografie na tenké vrstvě [silikagel, ethylacetát-methanol (1:1)] žádaný produkt se spojí a odpaří se k suchu. Získá se 215 mg červenožlutého amorfního práškového zbytku, tvořeného $C_3-N^2-(\beta\text{-acetoxyethyl})$ karboxhydrazidem 4-deacetyl-VLB s následujícími fyzikálními charakteristikami:

Hmotnostní spektrum:

$m/e = 854 (M^+)$, 795, 651, 513, 355, 154.

Sloučeniny obecného vzorce I inhibují růst transplantovaných nádorů u myši nebo/a prodloužují dobu přežití myši inokulo-

vaných nádorem. K průkazu účinnosti těchto látek se používá postup umožňující aplikaci testované sloučeniny, obvykle intraperitoneální 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 případě, 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 maligní melanom.

TABULKA 1

Testovaná sloučenina	Nádor	Dávka mg/kg × dny	Inhibice růstu nádoru v % nebo prodloužení doby přežití v %	
			3 dny	7 dnů
$C_3-N^2-(\beta\text{-acetoxyethyl})$ karboxhydrazid 4-deacetyl-VLB	GLS	0,5 × 10	100	100
		0,25 × 10	100	73
		0,125 × 10	74	26
C_3-N^2 -acetylkarboxhydrazid 4-deacetyl-VLB	GLS	0,5 × 10	100	toxická dávka
		0,25 × 10	100	100
		0,125 × 10	100	93
	B16	1,2 × 3		69
		0,9 × 3		84
		0,6 × 3		109
		0,3 × 3		100
		0,15 × 3		71
C_3-N^2 -benzoylkarboxhydrazid 4-deacetyl-VLB	GLS	0,5 × 10	toxická dávka	toxická dávka
			100	toxická dávka
C_3-N^2 -butyrylkarboxhydrazid 4-deacetyl-VLB	GLS	0,5 × 10	64	toxická dávka
		0,25 × 10	100	100
		0,125 × 10	100	100

Podle očekávání se sloučeniny obecného vzorce I co do spektra protinádorové účinnosti liší od VLB, vinkristinu a vindesinu, jakož i od C_4-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. Odchylky v dávkování budou pochopitelně založeny na relativní účinnosti

mezi vinkristinem či 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

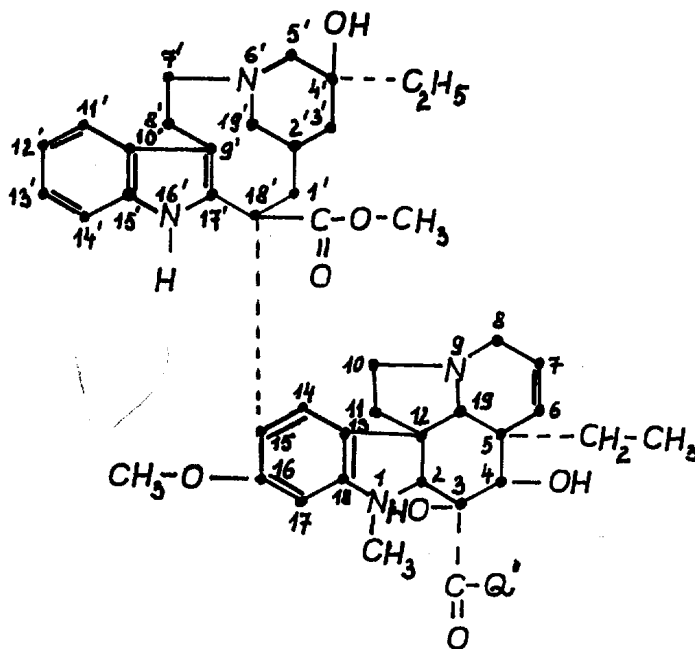
ošetřovaného savce, přičemž se aplikuje dávka v rozmezí od 0,1 do 10 mg/m² plochy povrchu těla savce každých 7 nebo 14 dnů.

Klinické zkoušky sloučenin obecného vzorce I se budou provádět podle postupu navrženého S. K. Carterem v části nazvané „Study Design Principles for the Clinical

Evaluation of New Drugs as Developed by the Chemotherapy Programme of the National Cancer Institute“, nacházející se na stranách 242 až 289 knihy „The Design of Clinical Trials in Cancer Therapy“ (ed. Maurice Staquet, Futura Publishing Co., New York, 1973).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

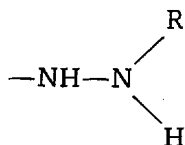
1. Způsob výroby C₃-karboxhydrazidů 4-deacetyl-vinkaleukoblastinu obecného vzorce I



(I)

ve kterém

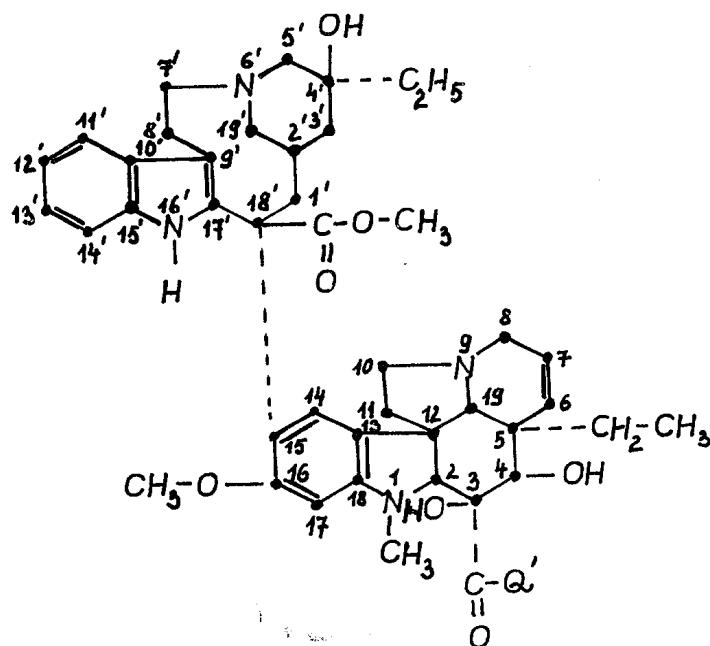
Q představuje zbytek vzorce



kde

R znamená alkanoylovou skupinu s 2 až 4 atomy uhlíku, dichloracetylovou skupinu nebo benzoylelovou skupinu,

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



(IA)

ve kterém

Q' znamená skupinu $-NHNH_2$, nechá reagovat s anhydridem nebo chloridem alkanové kyseliny s 2 až 4 atomy uhlíku, dichloroctové kyseliny nebo benzoové kyseliny.

2. Způsob podle bodu 1 k výrobě C_3-N^2 -acetylkaboxhydrazidu 4-deacetylvinkaleukoblastinu, vyznačující se tím, že se C_3 -kaboxhydrazid 4-deacetylvinkaleukoblastinu nechá reagovat s acetanhydridem.

3. Způsob podle bodu 1 k výrobě C_3-N^2 -

-butyrylkaboxhydrazidu 4-deacetylvinkaleukoblastinu, vyznačující se tím, že se C_3 -kaboxhydrazid 4-deacetylvinkaleukoblastinu nechá reagovat s anhydridem kyseliny máselné.

4. Způsob podle bodu 1 k výrobě C_3-N^2 -benzoylkaboxhydrazidu 4-deacetylvinkaleukoblastinu, vyznačující se tím, že se C_3 -kaboxhydrazid 4-deacetylvinkaleukoblastinu nechá reagovat s anhydridem kyseliny benzoové.