(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **146721 B**

(21) Patentansøgning nr.: **5523/82**

(22) Indleveringsdag: **13 dec 1982**

(24) Løbedag: **27 okt 1975**

(41) Alm. tilgængelig: **13 dec 1982**

(44) Fremlagt: **12 dec 1983**

(86) International ansøgning nr.: **–**

(62) Stamansøgning nr.: **4821/75**

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

(51) Int.Cl.³: **C 07 H 15/24**
// C 07 H 5/06
// C 07 H 15/04

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

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

(74) Fuldmægtig: **Nørrejysk Patentbureau ApS**

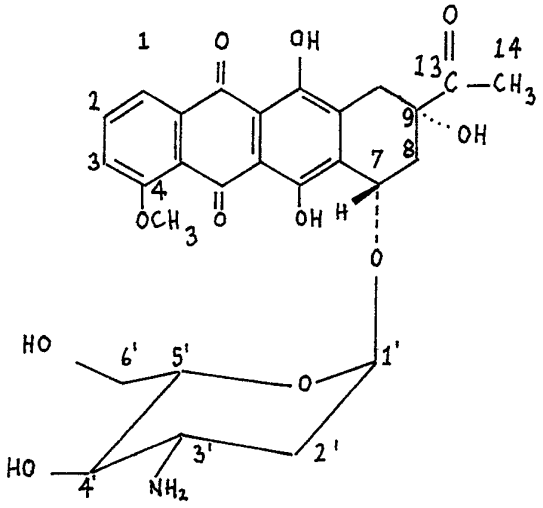
(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af 4'–epi–6'–hydroxyadriamycin**

DK 146721 B

Den foreliggende opfindels angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt antitumorglycosid, 4'-epi-6'-hydroxyadriamycin, som har den i kravet anførte formel V. Denne fremgangsmåde forudsætter fremstillingen og brugen af visse hidtil ukendte mellemprodukter.

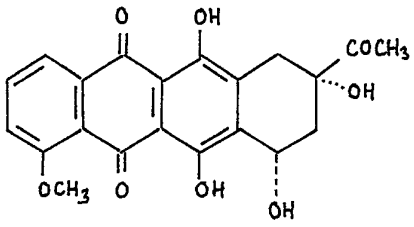
Det omhandlede glycosid udviser antimitotisk aktivitet både "in vivo" og "in vitro" og er et nyttigt terapeutisk middel ved behandlingen af tumor- og virussygdomme hos mennesker.

Udgangsmaterialet 4'-epi-6'-hydroxydaunomycin (I)



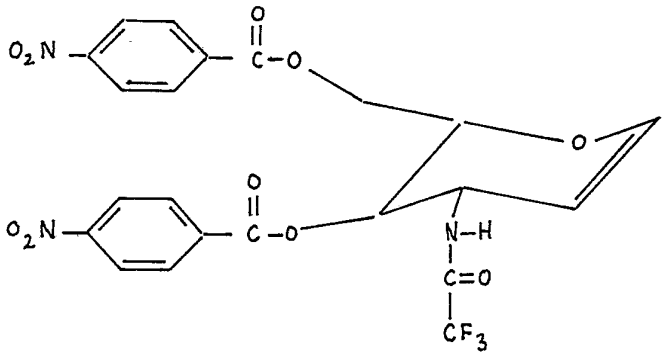
(I)

fremstilles ved kondensation af daunomycinon (II)



(II)

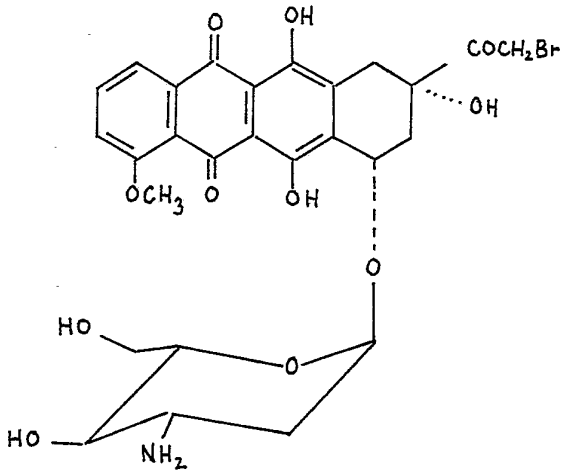
med 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluor-acetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III)



(III)

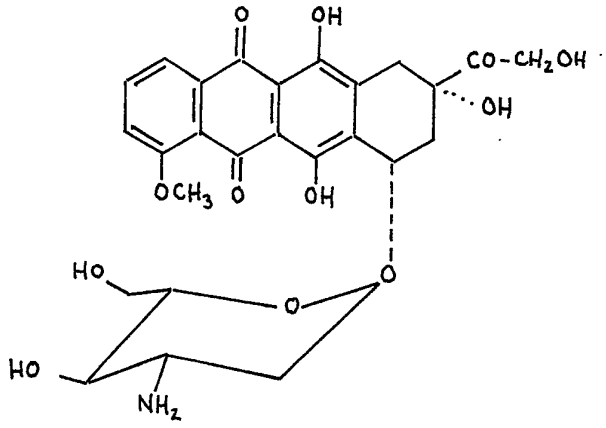
til dannelse af glycosidbindingen. Ved at fjerne de beskyttende grupper på sukkerdelen fremkommer forbindelse (I), der isoleres som hydrochlorid. Det er et meget vigtigt faktum at praktisk taget kun α-glycosidet dannes ved denne fremgangsmåde, idet β-anomeren kun forefindes i en meget lille mængde i reaktionsblandingen.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte, behandles forbindelsen (I) med en opløsning af brom i chloroform og giver 14-brom-4'-epi-6' -hydroxy-daunomycin (IV),



(IV)

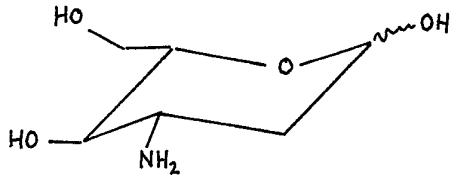
som ved styret hydrolyse giver den omhandlede 4'-epi-6'-hydroxyadriamycin (V),



(V)

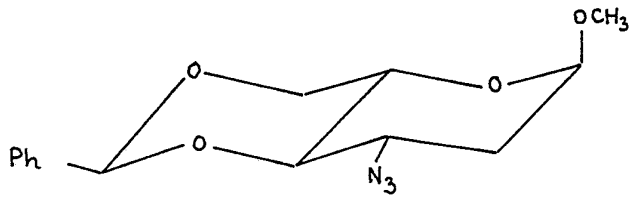
der til slut isoleres som hydrochlorid.

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



(VI)

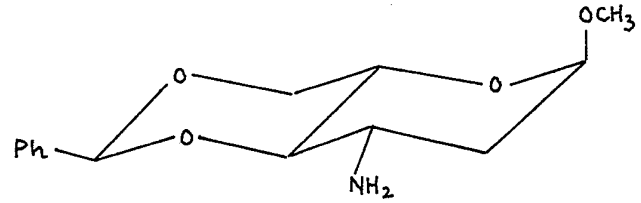
Denne aminosukker var tidligere ukendt i L-serien og er for første gang blevet fremstillet af os efter følgende fremgangsmåde. L-glucose er blevet omdannet til methyl-3-azido-4,6-O-benzyliden-2,3-dideoxy-α-L-arabino-hexopyranosid (VII)



(VII)

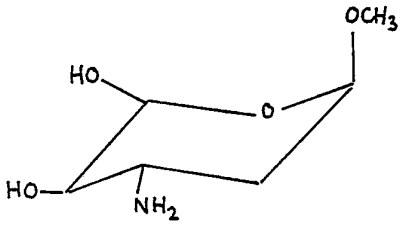
ifølge de fremgangsmåder der er kendt i litteraturen for D-isomeren, (G.N.Bollenback : "Methods in carbohydrate chemistry" II, 326, 1963. Acad. Press. L.F.Wiggins, ibid, II, 188, 1963. A.C.Richardson : Carbohydrate Research, 4, 422, (1967)).

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



(VIII)

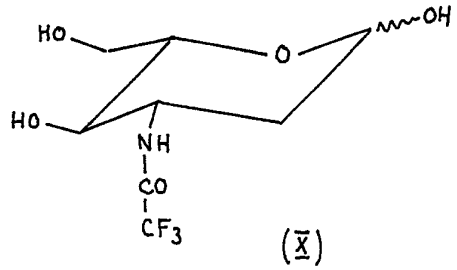
Efter at benzylidensubstituenten er fjernet, ved hjælp af hydrogenchlorid i methanol, fremkommer en methyl-3-amino-2,3-dideoxy-α-L-arabino-hexopyranosid (IX),



(IX)

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

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



(X)

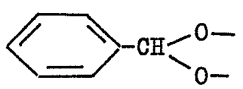
som til slut omsættes med p-nitrobenzoylchlorid i pyridin, efterfulgt af behandling med en svag base, hvorved der fremkommer 1,2,3,-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III) i godt udbytte.

I det følgende belyses fremstilllingen af forbindelserne III og I og fremgangsmåden ifølge opfindelsen nærmere.

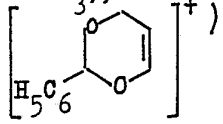
Fremstilling af mellemproduktet 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III)

2,85 g methyl-3-azido-4,6-O-benzyliden-2,3-dideoxy-α-L-arabino-hexopyranosid (VII) opløses i 40 ml vandfrit methanol og hydrogeneres ved 4,2 kp/cm^2 ved stuetemperatur i tilstedeværelse af Raney-nikkel i 3 timer. Katalysatoren filtreres fra og filtratet inddampes til tørhed in vacuo.
Remanensen omkrystalliseres fra ethylacetat, hvorved der fremkommer 2,17 g methyl-3-amino-4,6-O-benzyliden-2,3-dideoxy-α-L-arabino-hexopyranosid (VIII). Smp. 95-96°C ; $[\alpha]_D^{20°}$ = +86° (c = 0,5 $CHCl_3$). Udbytte 84 % ;

p.m.r. ($CDCl_3$) : 1,3-2,3 δ (m, 2H, C(2)H_2),
1,4 δ (bred s, 2H, NH_2),
3,2-4,4 δ (flere m, 5H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(6)H_2),
3,37 δ (s, 3H, CH_3O),
4,76 δ (dd, J = 3,5 Hz og J < 1 Hz, 1H, C(1)H),
5,57 δ (s, 1H),

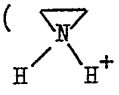


7,2-7,7 δ (m, 5H, C_6H_5) ;

massespekter : m/e 265 (M^+),
m/e 234 ($M-OCH_3$),
m/e 162 (),
m/e 149 ($C_6H_5-CH=\overset{+}{O}-CH_2-CHO$)
m/e 105 ($C_6H_5-C\overset{+}{O}$)

2,15 g af forbindelsen (VIII) opløses i 40 ml 0,5 N hydrogenchlorid i methanol og blandingen omrøres ved stuetemperatur i 1 time. Opløsningen inddampes til det halve volumen, vandfrit ether tilsættes og de resulterende krystaller opsamles ved vacuumfiltrering og vaskes med en lille mængde tør ether, hvorved der fremkommer 1,5 g methyl-3-amino-2,3-dideoxy- α -L-arabino-hexopyranosid (IX), smp. 120°C dec. ; $[\alpha]_D^{20°}$ = +92° (C = 0,4 H_2O). Udbytte 87 %,

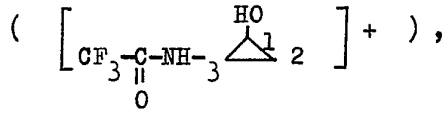
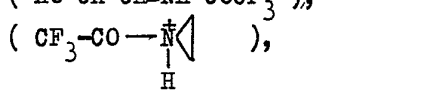
p.m.r. (D_2O) : 1,5-2,5 δ (m, 2H, C(2)H_2),
3,2-4,0 δ (flere m, 5H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(6)H_2),
3,41 δ (s, 3H, CH_3O-),
4,98 δ (dd, J = 3 Hz og J = 1,5 Hz, 1H, C(1)H);

massespekter : m/e 178 (M + 1),
m/e 146 (M-31)
m/e 86 ($H_2\overset{+}{N}=\overset{3}{C}H-\overset{2}{C}H=\overset{1}{C}H-OCH_3$),
m/e 72 ($H_2\overset{+}{N}=CH-CH_2-CHO$),
m/e 59 ($H_2\overset{+}{N}=CH-CH-OH$),
m/e 44 ()

1,5 g af aminoglycosidet (IX) koges med N saltsyre under tilbageløbskøling i 5 timer. Opløsningen omrystes ved stuetemperatur med Amberlite IR 45 (OH^-) ionbytter indtil pH-værdien er 5. Ionbytteren filtreres fra og filtratet inddampes in vacuo til det halve volumen og frysetørres derefter. Remanensen omkrystalliseres fra methanol-ethylacetat, hvorved der fremkommer 1,33 g 3-amino-2,3-dideoxy-L-arabino-hexose (VI) som hydrochlorid, smp. 155-157°C dec. $[\alpha]_D^{20°}$ = +55° (c = 0,5 H_2O). Udbytte 95 % ;

p.m.r. (D_2O) : 1,7-2,7 δ (m, 2H, $C(2)H_2$),
3,3-4,1 δ (flere m, 5H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, $C(6)H_2$),
5,06 δ (dd, J = 10 Hz og J = 2 Hz, 0,4 H, $C(1)H_{ax}$),
5,46 δ (bred s, $W_{\frac{1}{2}}$ H = 7 Hz, 0,6 H, $C(1)H_{eq}$).

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

massespekter : m/e 242 (M-OH),
m/e 169 (),
m/e 155 ($HO-CH-CH=NH-COCF_3$),
m/e 140 (),
m/e 114 ($CF_3-CO-\overset{+}{N}H_3$).

1,1 g af forbindelsen (X) sættes, i små portioner i løbet af 30 minuter under omrøring og ved stuetemperatur, til en opløsning af 3,17 g p-nitrobenzoylchlorid i 30 ml tør pyridin og omrøringen fortsættes ved stuetemperatur i 20 timer. Til opløsningen, afkølet til 0°C, sættes en isafkølet opløsning af 1,44 g natriumhydrogencarbonat i 20 ml vand og blandingen hældes derefter i 350 ml isvand.
Bundfaldet fjernes ved filtrering, vaskes med vand og tørres over phosphorpentaoxid. Det tørre produkt omkrystalliseres fra dichlormethan-ether, hvorved der fremkommer 2,3 g af det ønskede produkt : 1,2,3-trideoxy-4,6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III), smp. 214-215°C, $[\alpha]_D^{20} = +117°$ (c = 0,5 $CHCl_3$). Udbytte 95 %.

pmr. ($CDCl_3$ - DMSO - d_6 3:1) :

4,3-5,6 δ (flere m, 4H, C(3)H, C(4)H, C(5)H, C(2)H),
4,52 δ (bred s, $W_{\frac{1}{2}}$ H, 2H, C(6)H_2),
6,57 δ (bred s, $W_{\frac{1}{2}}$ H = 5 Hz, 1H, C(1)H),
8,21 δ (s, 4H aromatisk),
8,35 δ (s, 4H aromatisk),
9,27 δ (s, 1H, NH).

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

200 mg daunomycinon (II) opløses i 100 ml vandfrit benzen, til denne opløsning sættes 540 mg 1,2,3-trideoxy-4.6-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3-trifluoracetamido-L-arabino-hex-1-enpyranose (III) og 20 mg p-toluensulfonsyre. Reaktionsblandingen omrøres ved 55°C i 20 timer og efter afkøling til stuetemperatur filtreres det dannede bundfald fra og omkrystalliseres fra ethanol, hvorved man får 340 mg af den beskyttede 7-O-[4',6'-di-O-(p-nitrobenzoyl)-3'-trifluoracetamido-α-L-arabino]-daunomycinon ; Smp. 282°C. $[\alpha]_D^{20}$ = +260° ± 5° (c = 0,05 $CHCl_3$).

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

En ækvivalent saltsyre i methanol tilsættes, hvorved man får 160 mg 4'-epi-6'-hydroxy-daunomycin som hydrochlorid, smp. 199-201°C, $[\alpha]_D^{20}$ = +388°±5° (c = 0,05 CH_3OH) ; udbytte 56 %.

Fremgangsmåde ifølge opfindelsen, fremstilling af 4'-epi-6'-hydroxyadriamycin (V) (IMI 31)

0,25 g 4'-epi-6'-hydroxydaunomycin (I) opløses i en blanding af 3,5 ml methanol og 10 ml vandfrit dioxan og omsættes, under omrøring, med 0,9 ml

af en opløsning af 0,88 g brom i 10 ml chloroform. Raktionsblandingen hældes, efter 1 time ved stuetemperatur, i 75 ml ethylether under omrøring. Den rå 14-brom-4'-epi-6'-hydroxydaunomycin filtreres fra og opløses i en blanding af 5 ml acetone og 5 ml 0,25 N hydrogenbromid. Efter 12 timer ved stuetemperatur ekstraheres den sure opløsning først med chloroform, for at eliminere aglyconerne, og dernæst med n-butanol. Adskillige ekstraktioner gennemføres indtil alle farvede stoffer er i det organiske lag. Efter koncentration af n-butanol i vacuum, får man 0,27 g af 14-brom derivatet. Dette produkt opløses i 10 ml vand og behandles med 0,5 g natriumformiat.
Efter 48 timer ved stuetemperatur inddampes reaktionsblandingen til tørhed i vacuum og remanensen opløses i 30 ml af en chloroform-methanol blanding (vol. forhold 2:1) og vaskes med 10 ml 1% vandig $NaHCO_3$ opløsning. Den vandige fase ekstraheres flere gange med chloroform indtil alle farvede stoffer er i det organiske opløsningsmiddel. De samled chloroformekstrakter tørres over vandfrit natriumsulfat og koncentreres under reduceret tryk til et lille volumen, hvorefter det behandles med en ækvivalent 1 N saltsyre i methanol. Ved tilsætning af 10 volumen ethylether får man 0,125 g 4'-epi-6'-hydroxyadriamycin (V) som hydrochlorid. Smp. 180°C dec., $[\alpha]_D^{20} = +216^\circ$ (c = 0,01 CH_3OH), kromatografisk RF på kiselgel HF plader (Merck) er 0,5, idet solventsystemet chloroform-methanol-vand (vol. forhold 130:60:10) anvendes.

Biologisk aktivitet

Materialer og metoder

In vitro forsøg

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

måde; i slutningen af eksperimentet blev cellerne talt i et hæmocytometer. I alle forsøgenen blev cellerne incuberet i en 5% CO_2 incoubator ved 37°C. Forbindelserne blev opløst i destilleret vand og derefter fortyndet i kulturmedium.
Resultaterne er opgivet som ID_{50} (Inhibitordosis 50%), beregnet efter dosis/effekt kurver.

In vivo forsøg

Antitumoraktiviteten for undersøgte forbindelser blev undersøgt på ascites Sarcoma 180. 3 måneder gamle CD 1 mus blev anvendt. Sarcoma 180 ascites celler blev intraperitonealt inoculeret (10^6 celler/mus).
Forbindelserne blev opløst i destilleret vand og derefter fortyndet i Ringer opløsning, og anvendt intraperitonealt 1 døgn efter tumorimplantationen (10 ml/kg legemsvægt). Den toksiske virkning blev bestemt ved makroskopiskautopsiske resultater, hovedsageligt som reduktion af miltstørrelsen. sammenligning af forbindelsernes effektivitet blev baseret på maksimal forøgelse af middeloverlevelsestid, sammenlignet med ubehandlede kontroller, over det anvendte dosisområde. Antallet af langtidsoverlevende (LTS) henviser til tumorfri mus ved slutningen af forsøget (60 dage).

Resultater

Aktiviteten af den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelse 4'-epi-6-hydroxyadriamycin, sammenlignet med de nært beslægtede forbindelser, daunomycin og adriamycin, på de undersøgte "in vitro" systemer er angivet i Tabel 1.
Forbindelsen viste en lavere aktivitet end stamforbindelsen på HeLa celler, på MSV foci og på MEF proliferation.
Tabel 2 angiver den observerede effekt på ascites Sarcoma 180. Den optimale antitumordosis (det er den dosis, hvor maksimal antitumoreffekt blev fundet) var på 10 mg/kg .
Ved den optimale dosis var antitumoraktiviteten, bedømt ud fra forøgelsen af levetiden af behandlede mus sammenlignet med kontrollerne, lavere end den der blev observeret efter adriamycinbehandling.
Med hensyn til den toksiske virkning, en betydningsfuld og ofte afgørende faktor, som må tages i betragtning efter en forlænget behandling med store

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

Tabel 1

"In vitro" aktivitet af 4'-epi-6'-hydroxyadriamycin. ID_{50} (ng/ml).

Laboratoriekode	Forbindelse	HeLa celler kloneffektivitet			MSV focidannelse	MEF proliferation
	Exponeringstid for lægemiddel (timer)	2	8	24	72	72
	Daunomycin o	300	13	3	5,5	9
	Adriamycin o	280	110	18	2,5	7
IMI 31	4'-epi-6'-hydroxyadriamycin	900	1000	1000	25	50

o = gennesmsnitsværdi for flere eksperimenter

Tabel 2

Aktivitet af 4'-epi-6'-hydroxy-adriamycin på ascites Sarcoma 180 [x].

Laboratoriekode	Forbindelse	Dosis (mg/kg)	T/C [o] %	LTS [+]	Toks. [†]
	Adriamycin ◘	0,5	142	1/10	
		1	183	25/159	
		2	210	30/125	
		5	243	27/125	7/125
		10	212	18/139	18/139
IMI 31	4'-epi-6'- hydroxyadriamycin	7,5	143	1/10	
		10	162	1/10	
		15	134	2/10	ikke toksisk ved dosis 15 mg/kg

x = 1 behandling i.p. på 1. dag

o = Middeloverlevelsestid i % over kontrollerne

+ = Langtidsoverlevende ved 60 døgn

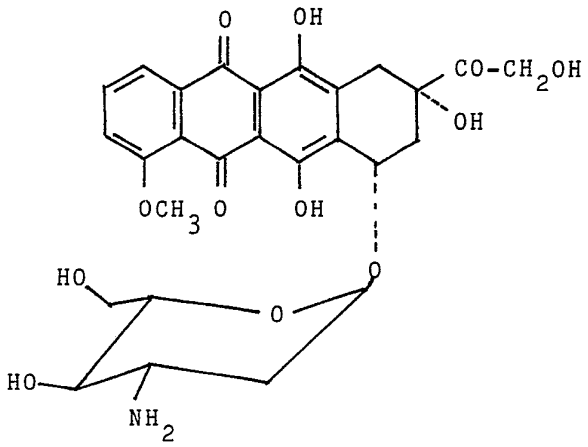
† = Mus som døde af toksiske virkninger sammenlignet med det totale antal

◘ = Gennemsnitsdata for et antal forsøg

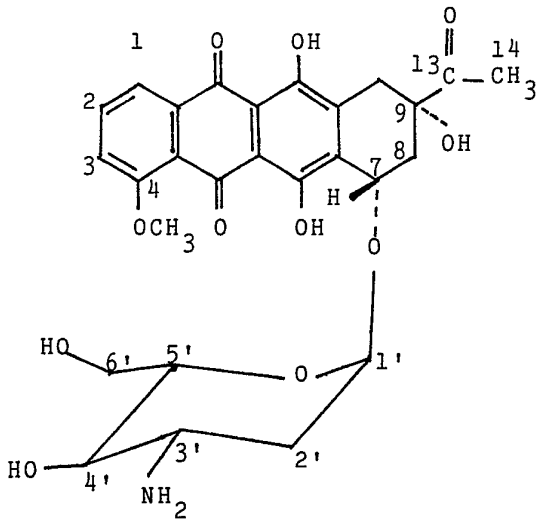
Optimale doser er understreget.

Patentkrav

Analogifremgangsmåde til fremstilling af 4'-epi-6'-hydroxy-adriamycin med formlen V



k e n d e t e g n e t v e d, at 4'-epi-6'-hydroxydauno-mycin med formlen I



i en blanding af egnede organiske opløsningsmidler omsættes med brom opløst i chloroform under dannelse af et 14-brom derivat, og dette mellemprodukt udsættes for en styret hydrolyse med en vandig opløsning af natriumformiat, hvorved det ønskede produkt fremkommer og isoleres som hydrochlorid.

Fremdragne publikationer:

Langkjær København