

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147073 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 2029/82

(51) Int.Cl.³: **C 07 D 519/04**

(22) Indleveringsdag: 06 maj 1982

(24) Løbedag: 06 nov 1978

(41) Alm. tilgængelig: 06 maj 1982

(44) Fremlagt: 02 apr 1984

(86) International ansøgning nr.: —

(62) Stamansøgning nr.: 4941/78

(30) Prioritet: 07 nov 1977 US 848837 27 mar 1978 US 890422

(71) Ansøger: **ELI *LILLY AND COMPANY**; Indianapolis, US.

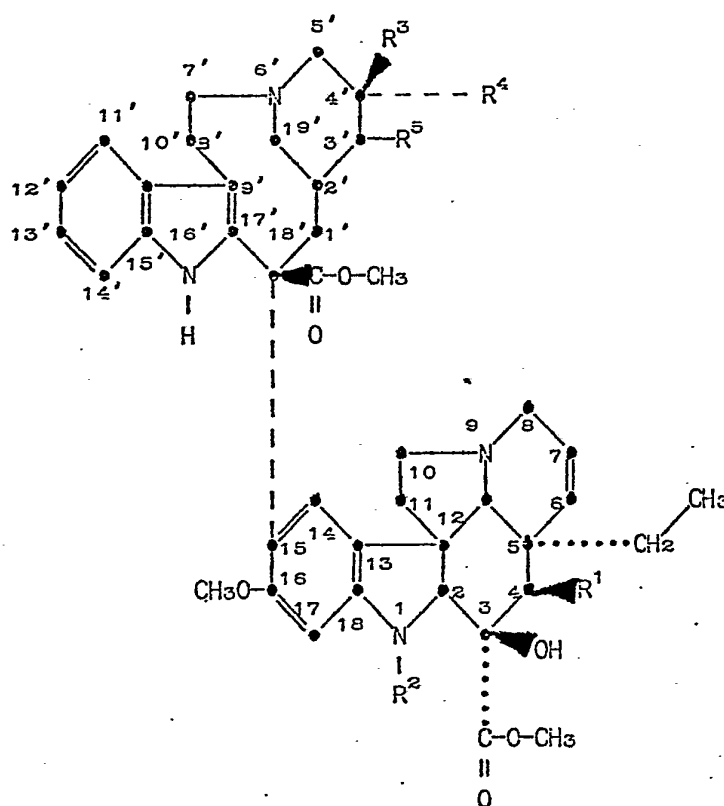
(72) Opfinder: **Ian Glaisby *Wright**; US, **Norbert *Neuss**; US, **Gerald Lee *Thompson**; US.

(74) Fuldægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af 4-desacetoxy-
—4-oxo—derivater af Vinca-alkaloider**

DK 147073 B

- Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte 4-desacetoxy-4-oxo-derivater af Vinca-alkaloider med den i krav 1's indledning anførte almene formel III, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen er
- 5 ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte. De omhandlede forbindelser kan finde anvendelse som udgangsmaterialer til fremstilling af 4 α -hydroxy-derivater af Vinca-alkaloider, der har anti-tumor-virkning, jvf. beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 4941/78.
- 10 De såkaldte "Vinca-alkaloider" har opnået en betydelig stilling som markedsførte eller experimentelle kemoterapeutiske midler til behandling af forekomster af carcinoma, sarcoma og leukæmi. Disse midler kan både anvendes alene og i kombi-
- 15 nation med andre onkolytiske midler. Som klasse betragtet omfatter Vinca-alkaloiderne forbindelser, der kan udvindes fra bladene af Vinca-rosea, derivater fremstillet ved kemisk modifikation deraf samt dimere alkaloider, der fremstilles ved at sammenkoble de to "monomere" dele af Vinca-alkaloid-
- 20 skelettet ved hjælp af en modificeret Polonovski-reaktion (Langlois og Potier, Tetrahedron Letters, 1099, (1976), Potier et al., J.C.S. Chem. Comm., 670, (1975), Kutney et al., Heterocycles, 3, 205, (1975) og Atta-ur-Rahman, Tetrahedron Letters, 2351, (1976).
- 25 Størstedelen af de kendte Vinca-alkaloider kan karakteriseres ved følgende formel:



I

Når R^1 i ovenstående formel er acetoxy, R^2 er methyl, R^3 er hydroxyl, R^4 er ethyl og R^5 er H, angiver formelen vinblastin (VLB). Når R^1 er acetoxy, R^2 er formyl, R^3 er hydroxyl, R^4 er ethyl og R^5 er H, angiver formelen vincristin. Når R^1 er acetoxy, R^2 er methyl, R^3 er ethyl, R^4 er hydroxyl, og R^5 er H, angiver formelen leurosidin. Når R^1 er acetoxy, R^2 er methyl, R^3 og R^5 er H og R^4 er ethyl, angiver formelen deoxy-VLB "A". Når R^1 , R^2 og R^5 er de samme som i deoxy-VLB "A" (4'-deoxy-vinblastin), mens R^3 er ethyl og R^4 er hydrogen, angiver formelen deoxy-VLB "B" (4'-deoxyleurosidin). Når R^1 er acetoxy, R^2 er methyl, R^3 er ethyl og R^4 og R^5 tilsammen danner en α -apoxidring, angiver formelen leurosin. Og når R^1 , R^3 , R^4 og R^5 er de samme som i leurosin, mens R^2 er formyl, angiver formelen leuroformin (N-formylleurosin).

De ovennævnte alkaloider er beskrevet i de følgende publika-

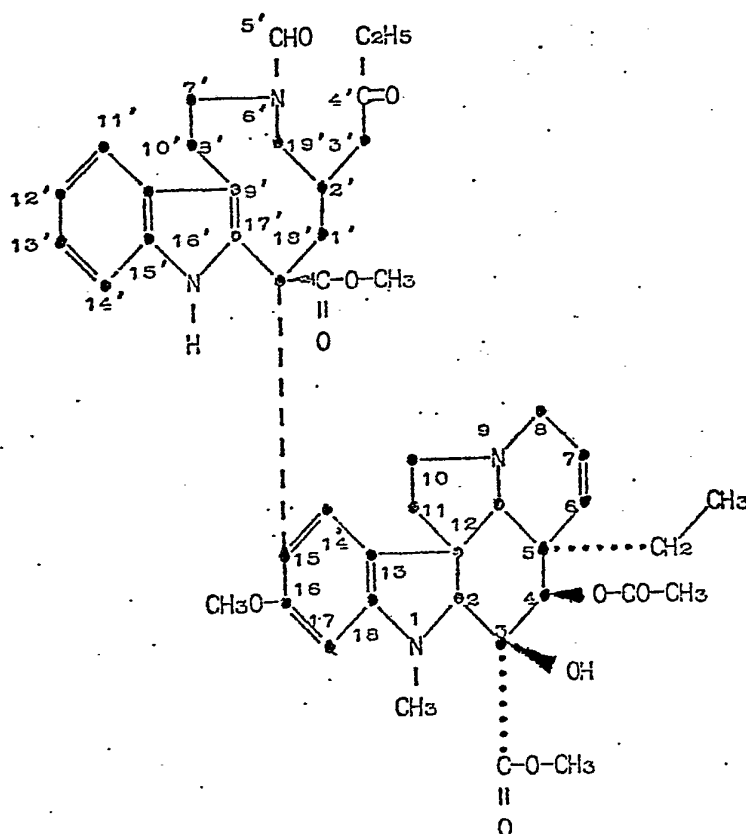
tioner: Leurosin (vinleurosinen; U.S.A. patentskrift nr. 3 370 057). VLB (vincaleukoblastin, vinblastin; U.S.A patentskrift nr. 3 097 137), leurosidin (vinrosidin) og vincristin (leurocristin eller VCR) (begge i U.S.A. patentskrift nr. 3 205 220), og deoxy-VLB "A" og "B", Tetrahedron Letters, 783 (1958). Andre alkaloider, der kan fås fra Vinca rosea, omfatter 4-desacetoxy-vinblastin (U.S.A. patentskrift nr. 3 954 773); 4-desacetoxy-3'-hydroxyvinblastin (U.S.A. patentskrift nr. 3 944 554); leurocolombin (2'-hydroxy-VBL, U.S.A. patentskrift nr. 3 890 325) og vincadiolin (3'-hydroxy-VLB, U.S.A. patentskrift nr. 3 887 565).

To af de ovenfor nævnte alkaloider, VLB og vincristin, forhandles nu som medicin til behandling af visse ondartede sygdomme, specielt leukæmi-sygdomme og lignende sygdomme hos mennesker. Af disse markedsførte forbindelser er vincristin det mest virksomme og nyttige middel ved behandling af leukæmi, men denne forbindelse er samtidig den mindst forekommende af de antineoplastiske alkaloider i Vinca rosea. I U.S.A. patentskrift nr. 3 899 493 (Jovanovics et al.) er beskrevet en fortrinlig oxidativ metode til omdannelse af alkaloidet VLB, som forekommer i større mængder, til vincristin ved anvendelse af chromsyre i acetone og eddikesyre ved omkring -60 °C. Den samme metode har været anvendt til fremstilling af leuroformin (N-formyl-leurosin) ud fra leurosin (belgisk patentskrift nr. 811 110). Leuroformin undergår for tiden en klinisk afprøvning i Europa, specielt til behandling af leukæmi-sygdomme og et antal myeloma-sygdomme.

Metoder til kemisk modifikation af VLB og vincristin omfatter hydrolyse af 4-acetoxygruppen til opnåelse af 4-deacetyl-VLB (DAVLB) eller 4-desacetylvincristin (DAVCR) efterfulgt af en genforestring heraf med en anden acyl- eller aminoacyl-gruppe (U.S.A. patentskrift nr. 3 392 173 og 3 387 001) og udskiftning af C-3-estergruppen med en amidgruppe (belgisk

patentskrift nr. 837 390). Et af de førstnævnte 4-acylderivater, 4-N,N-dimethylglycinester, har undergået en kortvarig klinisk afprøvning, og en af de sidstnævnte forbindelser, vindesin, bliver for øjeblikket klinisk testet over for en række neoplasmaarter.

Andre metoder til kemisk modifikation af VLB-molekylet såsom hydrolyse og decarboxylering af C-18'-carbomethoxygruppen har medført et tab i den cancer-bekæmpende virkning. Det samme gælder dannelsen af N-oxider, dvs. pleurosin (leurosin-N-oxid). Oxidative angreb på VLB ved temperaturer på over -60 °C eller i neutral eller basisk opløsning resulterer i dannelsen af en kemoterapeutisk inaktiv forbindelse, vinamidin, der har følgende formel:



II

Oxidation af VLB med MnO_2 i acetone eller methylenchlorid ved rumtemperatur har også resulteret i dannelse af vinamidin. Det samme alkaloid er fundet i alkaloid fraktioner fra blade af *Vinca rosea*, hvilket er beskrevet af Tafur et al., i J. Pharm. Sci., 64, 1953 (1975), men den anførte struktur (II på side 1956) menes nu at være ukorrekt, og den ovenfor anførte struktur svarer bedre til de data (NMR, IR og masse-spektroskopi), der er fundet ved fysisk-kemiske studier af forbindelsen. Ved dannelsen af vinamidin ved oxidative angreb på VLB dannes der et 4',5'-dihydroxy-derivat af vincinal med glycol. Dette vil ved yderligere oxidation spaltes imellem hydroxylgrupperne (4',5'-bindingen), hvilket resulterer i en ringåbning og dannelse af et derivat som II ovenfor.

4-desacetyl-VLB og andre 4-deacetyl-forbindelser, dvs. sådanne, hvori R^1 i formel I betegner hydroxyl, oxideres ikke til det tilsvarende 4-oxo-derivat ved den ovenfor beskrevne chromsyre-oxidation ved lav temperatur. Teoretiske overvejelser understreger vanskeligheden ved at oxidere den sekundære hydroxylgruppe ved C-4 til en carbonylgruppe. Ringen, der indeholder C-4, er fastlåst i sin stilling, idet fire af ringens carbonatomer indgår i andre ringe i molekylets vindolin-del. For at kunne undergå oxidation fra en sekundær hydroxylgruppe til en carbonylgruppe skal bindingsvinklen i C-4 ændre sig fra den tetraederiske vinkel (108°) til sp^2 -vinklen (120°). En sådan ændring vil medføre betydelige spændinger i det system af sammenhængende ringe, hvori C-4 befinder sig.

Det har nu vist sig, at 4-deacetoxy-4-oxo-derivaterne med formel III kan fremstilles ved at oxidere en 4 β -hydroxyforbindelse med formlen V med Moffat's reagens, dvs. dimethylsulfoxid (DMSO), dicyclohexylcarbodiimid (DCC) og orthophosphorsyre, eller med N-chlorsuccinimid og dimethylsulfid.

Moffat's reagens er skabt af Pfitzner og Moffat, J. Am. Chem. Soc., 85, 3027, (1963), 87, 5661, 5670 (1965). Se også Fieser og Fieser, Reagents for Organic Synthesis, 1, 304, 2, 162, (John Wiley and Sons, Inc., (1967)).

- 5 Når syntesen af 4-oxoforbindelserne (formel III) ifølge opfindelsen gennemføres med Moffat's reagens, opløser man en 4 β -hydroxyforbindelse med formel V (som fri base) og dicyclohexylcarbodiimid i DMSO ved rumtemperatur, hvorefter phosphorsyren tilsættes. Reaktionsblandingen omrystes, indtil opløsningen er fuldstændig (5 til 10 minutter). Derefter tillukkes reaktionskolben og hensættes ved rumtemperatur, indtil reaktionen er i det væsentlige fuldstændig (5 til 6 timer), hvilket eftervises ved TLC-analyse af prøver, der oparbejdes ved standardmetoder. Det ønskede produkt isoleres ved at fortynde reaktionsproduktet med fortyndet svovlsyre, filtrere den resulterende blanding og udvaske det udfældede dicyclohexylurinstof med 1% vandig svovlsyre. Filtratet gøres basisk med 14N vandig ammoniumhydroxid og ekstraheres over i et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel såsom methylenchlorid eller ether. De organiske ekstrakter samles og tørres, og opløsningsmidlet fjernes ved inddampning. Inddampningsresten, som indeholder den ønskede 4-oxoforbindelse, renses ved chromatografi, gradienteluerings-chromatografi eller gradient-pH-extraktion. Den sidstnævnte procedure foretrækkes.
- 10
- 15
- 20
- 25 Når den ovenfor beskrevne oxidation gennemføres ved hjælp af Moffat's reagens, anvender man normalt et overskud af reagenset. F.eks. kan man anvende et overskud af dicyclohexylcarbodiimid på 2 - 10 gange og et overskud af orthophosphorsyre på 2 - 5 gange. Dimethylsulfoxidet anvendes både som reaktant og som opløsningsmiddel og benyttes derfor altid i et overskud på 10 til 20 gange. Det foretrækkes at anvende 6 - 7 mol dicyclo-
- 30 carbodiimid og 2,5 - 3 mol orthophosphorsyre pr. mol udgangsmateriale. Reaktionen kan gennemføres ved temperaturer på mellem 20 °C og 50 °C, men det foretrækkes at anvende temperaturer på omkring 20 °C. Som det måtte forventes, stiger
- 35

reaktionshastigheden med stigende temperatur. Imidlertid kan temperaturer på over ca. 25 °C give anledning til dannelse af overskydende mængder dekompositionsprodukter. På den anden side forløber reaktionen langsomt ved 20 °C, og der kræves tidsperioder på mellem 5 og 7 timer for at tilendebringe oxidationsprocessen. Længere tidsperioder vil naturligvis være påkrævet, hvis man anvender lavere reaktionstemperaturer.

Alternativt kan man som nævnt som oxidationsmiddel anvende en kombination af N-chlorsuccinimid og dimethylsulfid, som anvendes i forbindelse med en tertiær amin, såsom triethylamin.

Udgangsmaterialerne, der anvendes til fremstilling af 4-oxo-forbindelserne ifølge opfindelsen (dvs. forbindelser med formel V), kan fremstilles ved hydrolyse af de tilsvarende C-4-acetater, som er kendte forbindelser. De tilsvarende 4-desacetyl-forbindelser kan fremstilles ud fra de ovenfor anførte Vinca-alkaloider ved hydrolyse, enten under sure eller basiske betingelser. 4-desacetyl-vinblastin blev først fremstillet af Hargrove, Lloydia, 27, 340, (1964) ved sur hydrolyse af vinblastin under anvendelse af store mængder absolut methanol, der var mættet ved 0 °C med vandfri hydrogenchlorid. Der anvendtes en kontaktid på omkring 6 timer. Hydrolyse under sure betingelser synes at være den foretrukne metode til fremstilling af 4-desacetyl-deoxy-VLB "B" og "A". Det har imidlertid vist sig, at basisk hydrolyse foretrækkes ved fremstillingen af 4-desacetyl-derivater af såvel leurosin som vinblastin. Ved denne metode anvendes natriumcarbonat i kogende methanol under tilbagesvaling som hydrolysemedium.

Opfindelsen illustreres nærmere ved de følgende eksempler.

EKSEMPEL 14-desacetoxy-4-oxovinblastin

En reaktionsblanding blev fremstillet ved at sætte 3,0739 g 4-desacetylvinblastin og 5,8929 g dicyclohexylcarbodiimid til 20 ml DMSO. Til denne blanding blev sat 1,2185 g vandfri orthophosphorsyre opløst i 5 ml DMSO. Reaktionskolben blev tillukket og omrystet, indtil opløsningen var fuldstændig. Blandingen blev hensat ved omgivelsestemperatur (18 - 22 °C) i 5 timer, hvorefter den blev udhældt i en blanding af is og 1% vandig svovlsyre. Det udfældede dicyclohexylurinstof blev fjernet ved filtrering, og filterkagen blev udvasket med 1% vandig svovlsyre. Den vandige fase blev gjort basisk med 14 N vandig ammoniumhydroxid. Denne vandige basiske blanding blev ekstraheret flere gange med methylenchlorid. De samlede methylenchlorid-extrakter blev tørret, og opløsningsmidlet blev fjernet ved inddampning i vacuum, hvilket efterlod en rest, der indeholdt 4-desacetoxy-4-oxovinblastin (2,6534 g). Denne rest blev opløst i 1% vandig svovlsyre, og den resulterende opløsning blev filtreret, hvorefter filtratet blev gjort basisk med 14N ammoniumhydroxid som ovenfor. Extraktion med methylenchlorid efterfulgt af tørring og inddampning gav en rest. Tyndtlagschromatografi af en prøve over silicagel ved anvendelse af en opløsningsmiddel-blanding af ethylacetat og ethanol (1:1) viste, at denne rest blev kombineret med 298 mg af en tilsvarende rest fra en chromatografisk separationsproces i et tidligere forsøg, og det samlede materiale blev opløst i 400 ml af en 0,1M citronsyrepuffer (pH 2,35) og underkastet en gradient-pH-extraktionsprocedure. Den sure opløsning blev ekstraheret med 400 ml benzen, og pH blev indstillet til 3,0. Opløsningen blev igen ekstraheret med 400 ml benzen, og pH blev igen forøget. Denne procedure blev gentaget et antal gange. I den efterfølgende tabel 1 er anført pH i opløsningen

og vægten af materialet i fraktionen efter fjernelse af benzenen. Hver fraktion blev analyseret ved tyndtlags-chromatografi som beskrevet ovenfor for tilstedeværelse af 4-desacetoxy-4-oxovinblastin.

TABEL 1

<u>pH i vandig fase</u>	<u>Vægt i mg ekstraheret produkt</u>
2,35	205,8 (borthældt)
3,0	167,1
3,5	270,6
4,0	671,4 (kombineret)
4,5	740,1 "
5,0	257,7
5,5	123,0
6,0	66,7
6,5	26,7 (borthældt)
7,0	23,8 "
7,5	12,8 "
8,0	22,7 "
9,0	17,8 "

- 5 Fraktionerne udtaget ved pH 3,0 til 5,0 blev kombineret med et filtrat fra en udkrystallisation af 4-desacetoxy-4-oxovinblastin, der i forvejen var opnået ved chromatografi, og de kombinerede fraktioner blev opløst i 400 ml 0,1M citronsyrepuffer som beskrevet ovenfor. En ny gradient-
- 10 -pH-extraktionsprocedure blev gennemført som beskrevet ovenfor med den undtagelse, at der i visse tilfælde blev gennemført mere end en ekstraktion med 400 ml benzen. I tabel 2 er anført resultaterne af denne ekstraktionsprocedure. I
- 15 venstre kolonne er anført pH af den vandig fase, i midterste kolonne er anført antallet af ekstraktioner med benzen i portioner à 400 ml, og i højre kolonne er anført vægten i mg af ekstraheret produkt efter bortdampning af opløsningsmidlet.

TABEL 2

<u>pH i vandig fase</u>	<u>Antal ekstraktioner</u>	<u>Vægt i mg af extraheret produkt</u>
2,35	3	252,4 (borthældt)
2,75	2	97,1
3,15	1	114,2
3,55	1	276,1
4,00	3	1154,2
4,5	1	213,2
5,0	1	89,7
5,5	1	32,2
6,0	1	18,7
8,0	1	13,5

5 Fraktionen ved pH 4,0, som vejede 1,1542 g, blev udkrystalliseret fra en blanding af methanol og vand. Der opnåedes 854,3 mg krystallinsk 4-desacetoxy-4-oxovinblastin. IR- og NMR-spektre viste sig at være i overensstemmelse med den formodede struktur.

EKSEMPEL 2Alternativ fremstilling af 4-desacetoxy-4-oxovinblastin

Der fremstilledes en opløsning indeholdende 2,47 g 4-desacetylvinblastin i 37 ml toluen og 7,4 ml methylenchlorid.

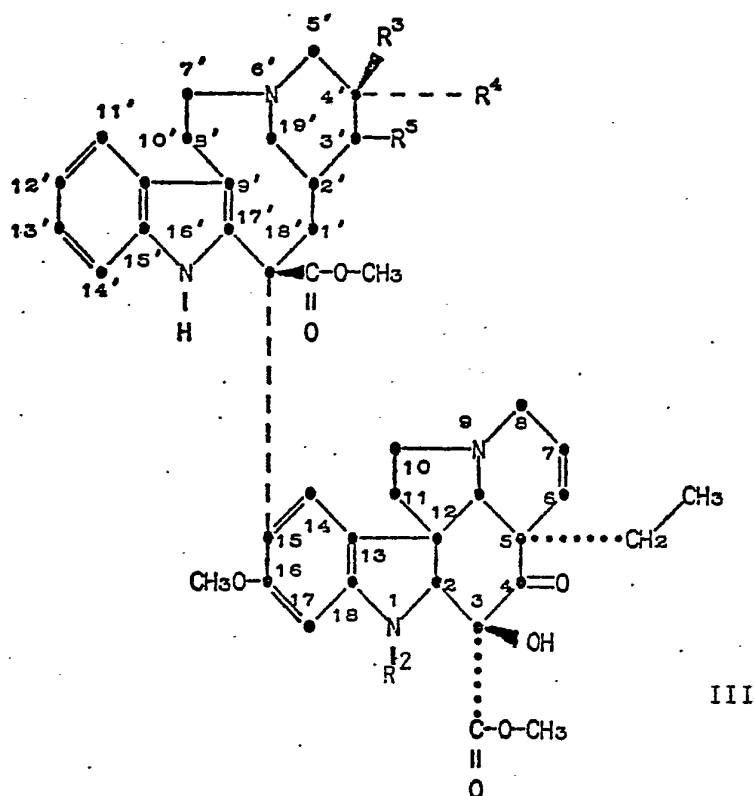
10 1,29 g N-chlorsuccinimid blev suspenderet i 30 ml vandfri toluen, og suspensionen blev omrørt i nitrogenatmosfære under afkøling. Til denne suspension blev dråbevis sat 1,06 ml (0,9 g) dimethylsulfid, og blandingen blev omrørt i yderligere 15 minutter. Derefter blev opløsningen af 4-desacetylvinblastin dråbevis sat til blandingen af N-chlorsuccinimid

15 og dimethylsulfid i toluen over en periode på 5 minutter ved 0 °C. Der anvendtes følgende volumener opløsningsmiddel:

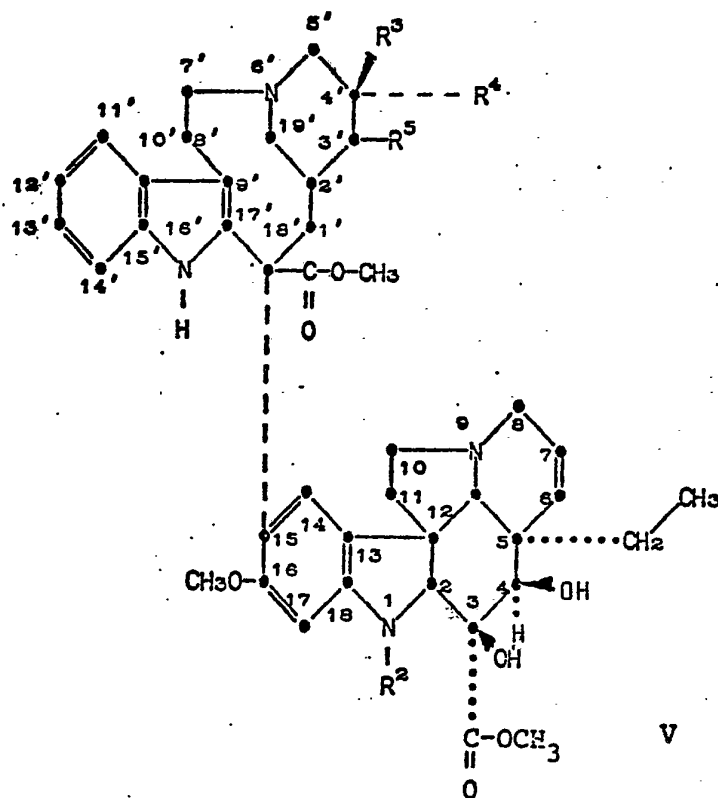
15 gange vægten af udgangsmaterialet for toluen på vægt/
volumenbasis, 3 gange vægten af udgangsmaterialet for N-
-chlorsuccinimid på vægt/volumenbasis, samt et overskud af
dimethylsulfid. Efter omrøring i 5,6 timer ved 0 °C blev
5 tilsat 2,03 ml (1,47 g) triethylamin, og reaktionsblandingen
blev omrørt i yderligere 1,5 timer ved rumtemperatur og der-
efter opbevaret natten over i køleskab. Tyndtlagschromato-
grafi viste, at alt udgangsmaterialet, 4-desacetylvinblastin,
var forbrugt, og at reaktionsblandingen i det væsentlige
10 bestod af materiale, der gav anledning til en enkelt plet.
Reaktionsblandingen blev fortyndet med ether og methylen-
chlorid, og den resulterende organiske fase blev udvasket
tre gange med vand og derefter tørret. Fjernelse af opløs-
ningsmidlerne i vacuum gav et gult stof, der indeholdt
15 4-desacetoxy-4-oxovinblastin; vægt 2,39 g. Dette materiale
blev chromatograferet over 240 g silicagel (aktivitet I).
Chromatogrammet blev udviklet med 1:1 methylenchlorid/ethyl-
acetat i portioner à 400 ml indeholdende 9, 13,5, 20 og 45
procent methanol. Efter at der var opsamlet 700 ml eluent
20 blev der udtaget fraktioner på 20 ml. Fraktionerne 21 - 45
blev samlet og inddampet, hvilket gav 1,28 g af et fast
brunt stof, 4-desacetoxy-4-oxovinblastin.

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af 4-desacetoxy-4-oxo-derivater af Vinca-alkaloider med den almene formel



- 5 hvori R^2 betegner CH_3 eller CHO , R^5 betegner H, og en af substituenterne R^3 og R^4 betegner OH eller H, medens den anden betegner C_2H_5 ; eller R^4 eller R^5 tilsammen betegner en epoxidring, medens R^3 er C_2H_5 , k e n d e t e g n e t ved, at man omsætter et 4-desacetyl-derivat af et Vinca-alkaloid med formlen



hvor R^2 , R^3 , R^4 og R^5 har de ovenfor angivne betydninger, i væskefase med et oxiderende middel valgt blandt (a) dicyclohexylcarbodiimid, o-phosphorsyre og dimethylsulfoxid og (b) N-chlorsuccinimid og dimethylsulfid.

5 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at omsætningen med dicyclohexylcarbodiimid, o-phosphorsyre og dimethylsulfoxid udføres ved 18 - 22 °C i 5 timer.

10 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at omsætningen med N-chlorsuccinimid og dimethylsulfid udføres i toluen i nitrogenatmosfære under omrøring i 6 timer ved 0 °C.

Fremdragne publikationer: