

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **150203 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 1896/76

(51) Int.Cl.4: **C 07 H 15/252**
// C 07 H 13/08

(22) Indleveringsdag: 28 apr 1976

(41) Alm. tilgængelig: 31 okt 1976

(44) Fremlagt: 05 jan 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 30 apr 1975 GB 18098/75

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

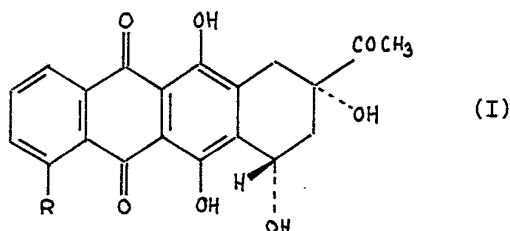
(72) Opfinder: Federico *Arcamone: IT, Alberto *Bargiotti: IT, Aurelio di *Marco: IT, Sergio *Penco: IT.

(74) Fuldmægtig: Nørrejysk Patentbureau ApS

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af alfa-anomere af anthracyclinglycosider eller hydrochlorider deraf**

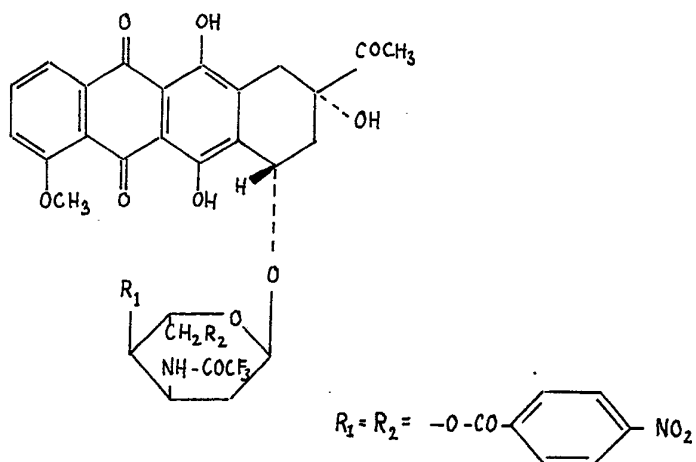
Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af de i krav 1's indledning omhandlede hidtil ukendte anthracyclinglycosider eller hydrochlorider deraf. Den angiver en ny fremgangsmåde til fremstilling af de nye anthracyclinglycosider: 3',4'-epi-6'-hydroxydaunomycin; 3',4'-epi-6'-hydroxyadriamycin; 3',4'-epidaunomycin; 3',4'-epi-adriamycin; 4-demethoxy-4'-epi-daunomycin eller 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin eller hydrochlorider deraf. De ifølge opfindelsen fremstillede nye forbindelser er nyttige ved behandling af visse tumorer hos dyr.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, som er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte, er baseret på kondensation af en tetracyklisk aglycon, som har et hydroxy-anthraquinon kromophort system med strukturen (I) :



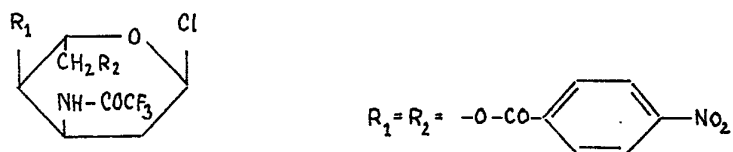
hvor R er methoxy (d.v.s. daunomycinon) eller hydrogen (d.v.s. 4-demethoxydaunomycinon), med beskyttede 1-halogenderivater af 3,4-epi-6-hydroxy-daunosamin, 3,4-epi-daunosamin eller 4-epi-daunosamin i et inert organisk opløsningsmiddel i tilstedeværelse af en opløselig sølvsaltkatalysator og en molekylsigte som dehydreringsmiddel, og at de beskyttende grupper fjernes fra de dannede glycosider ved svag alkalisk hydrolyse med 0,1 N natriumhydroxid, og de opnåede daunomycinderivater isoleres som hydrochlorider, eller på i og for sig kendt måde bromeres i 14-stillingen, omsættes med natriumformiat og hydrolyseres, hvorefter de dannede adriamycinderivater isoleres som hydrochlorider. Som sølvsaltkatalysator foretrækkes sølvtrifluormethansulfonat (AgSO_3CF_3), og som inert organisk opløsningsmiddel foretrækkes chloroform eller dichlormethan. Opløseligheden af sølvsaltet i de organiske opløsningsmidler muliggør, at kondensationen finder sted i en homogen fase, hvorved de velkendte komplikationer ved Koenigs-Knorr-reaktionen i tilstedeværelse af uopløselige sølv- eller kviksølvforbindelser undgås. (Gunther Wulff og Gerhard Rohle. Ang. Chem. Int. Ed. 13, 157 (1974)). Reaktionen gennemføres på kort tid (sædvanligvis en til otte timer), og de beskyttede glycosider dannes med stort udbytte. Endvidere er det meget vigtigt og overraskende, at reaktionen er stereospecifik: der dannes kun α -anomere. Det reaktive beskyttede derivat af aminodeoxysukkeret, som kondenseres med aglyconen med strukturen I (R = methoxy) under dannelse af det beskyttede glycosid med strukturen II:

3



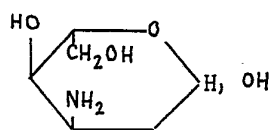
II

er det nye mellemprodukt 2,3-dideoxy-4,6-di-O-p-nitrobenzoyl-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexopyranosylchlorid III :



III

som afledes af 3-amino-2,3-dideoxy-L-ribohexose (3,4-epi-6-hydroxydaunosamin) IV :

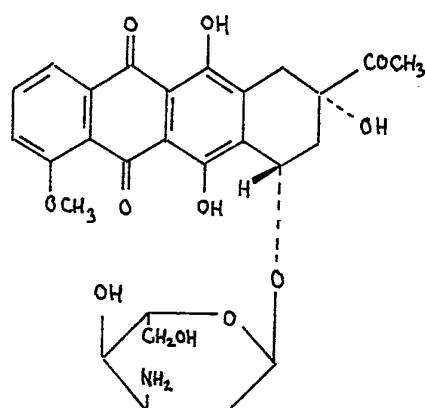


IV

som tidligere var ukendt i L-serien.

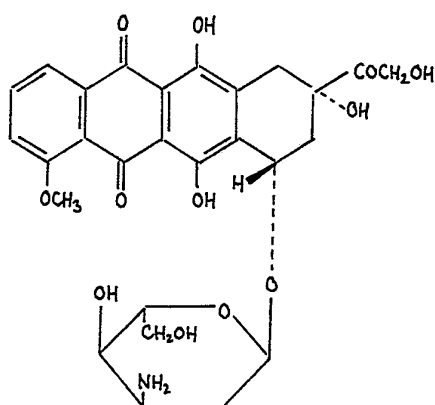
Fra det beskyttede glycosid II dannes, efter at de beskyttende grupper er fjernet med base, slutproduktet V :

4



V

Dette er 3',4'-epi-6'-hydroxydaunomycin, som isoleres som hydrochlorid. Den følgende behandling af forbindelsen V ifølge metoden, som er beskrevet i US patentskrift nr. 3 803 124, giver forbindelsen VI:

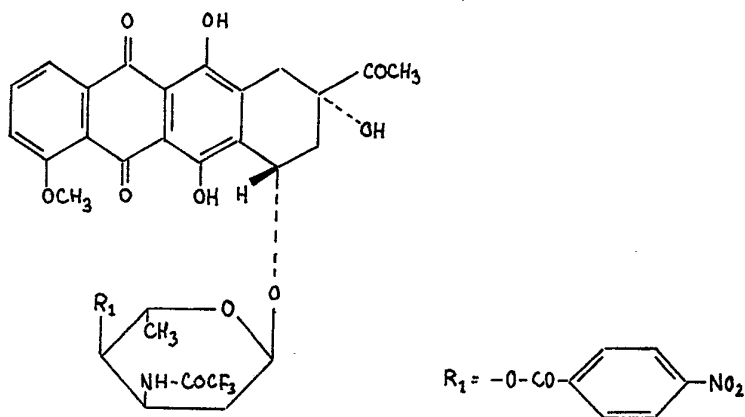


VI

som er 3',4'-epi-6'-hydroxyadriamycin, der også isoleres som hydrochlorid.

Det ovennævnte US patentskrift angiver en ubesværet vej for kemisk omdannelse af daunomycin-derivater til adriamycin-derivater. Et daunomycin-derivat giver et 14-bromderivat, når det reagerer med en opløsning af brom i chloroform i tilstedeværelse af ethylorthoformiat. 14-brom-derivatet bringes dernæst til reaktion med natriumformiat og hydrolyseres i nærværelse af vandig hydrogenbromid ved stuetemperatur for at give adriamycin-derivatet.

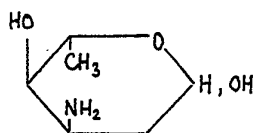
Det beskyttede derivat af aminodeoxysukkeret, som kondenseres med aglyconen med strukturen I (R = methoxy) under dannelse af det beskyttede glycosid med strukturen VII:



er det nye mellemprodukt 2,3,6-trideoxy-3-N-trifluoracetyl-4-O-p-nitrobenzoyl- α -L-ribohexo-pyranosylchlorid VIII :

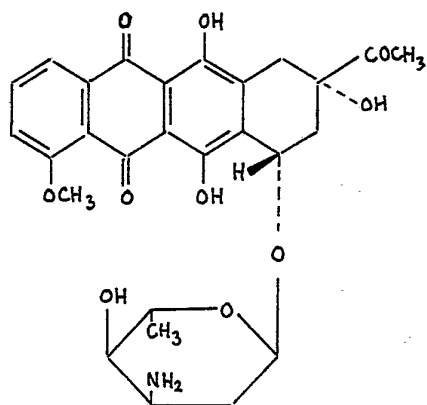


som dannes af 3-amino-2,3,6-trideoxy-L-ribohexose IX :



som tidligere ligeledes var ukendt i L-serien.

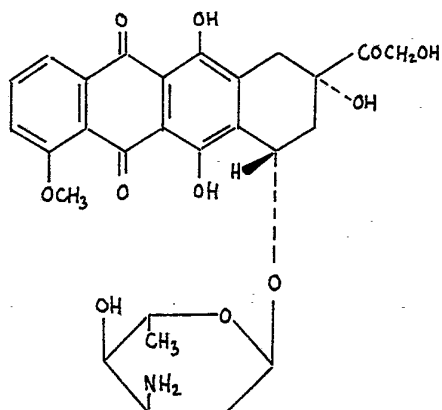
Fra de beskyttede glycosider VII dannes, efter at de beskyttende grupper er fjernet, slutproduktet X :



X

som er 3',4'-epi-daunomycin, der isoleres som hydrochlorid.

Den efterfølgende behandling af forbindelsen X ifølge metoden, som er beskrevet i US patentskrift nr. 3 803, 124 giver forbindelsen XI:

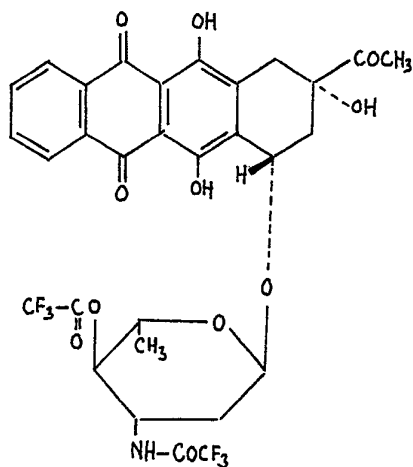


XI

som er 3',4'-epi-adriamycin, der også isoleres som hydrochlorid.

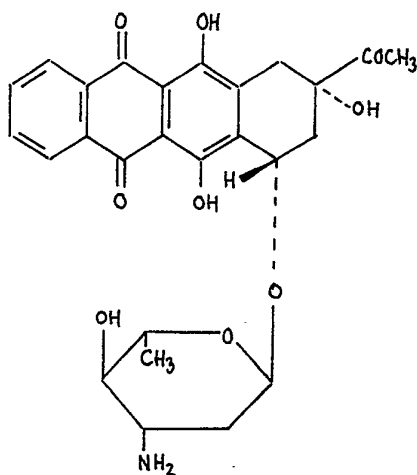
Når kondensationen gennemføres ved reaktion mellem en aglycon med strukturen I (R = hydrogen) og et egnet beskyttet derivat af 4-epi-daunosamin, d.v.s. 1-chlor-N,O-di-trifluoracetyl-4-epi-daunosamin (dette mellemprodukt er omhandlet i beskrivelsen til belgisk patent nr. 826.848), dannes det beskyttede glycosid med strukturen XII:

7.



XII

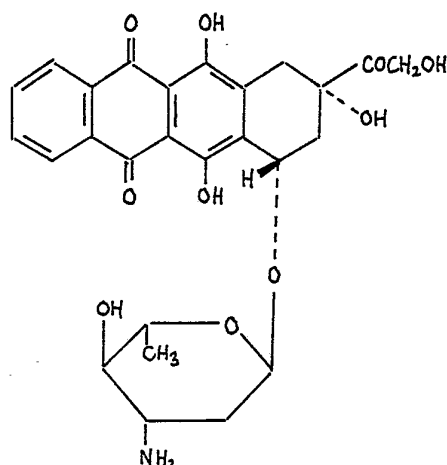
hvorfra, efter at de beskyttende grupper er fjernet først med methanol, hvorved N-trifluoracetylderivatet dannes, og derefter med fortyndet NaOH, slutproduktet 4-demethoxy-4'-epi-daunomycin XIII isoleres som hydrochlorid :



XIII

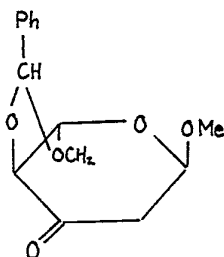
Af forbindelsen XIII dannes, idet fremgangsmåden som beskrevet i USpatentskrift nr. 3 803 124 følges, 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin XIV som hydrochlorid:

8



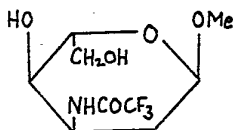
XIV

Mellemproduktet 2,3-di-deoxy-4,6-di-O-p-nitrobenzoyl-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexo-pyranosyl-chlorid III, som anvendes til fremstilling af forbindelsen II dannes ud fra methyl-4,6-O-benzyliden-2-deoxy- α -L-erythro-hexopyranosid-3-ulose XV (E.H. Williams et al., Canad. J. Chem. 47, 4467 (1969)).



XV

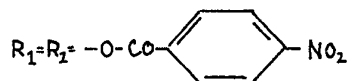
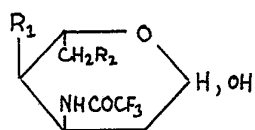
Denne forbindelse er blevet omdannet til methyl-2,3-dideoxy-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexopyranosid XVI:



XVI

idet fremgangsmåden som er tilgængelig i litteraturen for D-isomeren følges (P.J. Beynon et.al., J. Chem. Soc.(C), 272 (1969)).

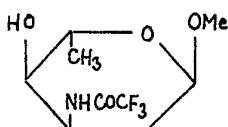
Forbindelsen XVI omsættes derefter med p-nitrobenzoylchlorid i tør pyridin og derefter med tør hydrogenchlorid ved 0°C, hvorved der dannes 2,3-di-deoxy-4,6-di-O-p-nitrobenzoyl-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexopyranose XVII :



XVII

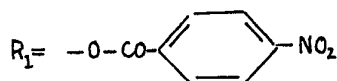
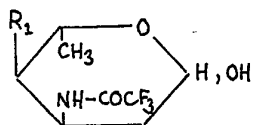
Ved gentagen omsætning af forbindelsen XVII med p-nitrobenzoylchlorid i tør pyridin isoleres dens 1,4,6-tri-O-p-nitrobenzoat, hvorfra der, efter behandling i 1 time med tør hydrogenchlorid ved 0°C i methylenchlorid, dannes den ønskede nye forbindelse III.

Fremstillingen af det andet nye mellemprodukt 2,3,6-trideoxy-3-N-trifluoracetyl-4-O-p-nitrobenzoyl- α -L-ribohexo-pyranosylchlorid VIII sker ud fra forbindelsen XVI ifølge fremgangsmåden som er beskrevet af S. Hanessian et. al. (Carb. Res. 24, 45 (1972)) for syntesen af 6-deoxysukker. Ved omsætning af forbindelsen XVI med N-bromsuccinimid og triphenylphosphin i vandfrit dimethylformamid dannes dens 6-bromderivat, hvorfra der ved katalytisk reduktion i tilstedeværelse af Pd/C 20% og BaCO₃ isoleres methyl-2,3,6-trideoxy-3-trifluoracetamido- α -L-ribohexopyranosid XVIII :



XVIII

Omsætningen af forbindelsen XVIII med p-nitrobenzoylchlorid i tør pyridin giver dens 4-O-p-nitrobenzoylderivat, hvorfra der efter behandling med tør hydrogenchlorid dannes 2,3,6-trideoxy-3-N-trifluoracetyl-4-O-p-nitrobenzoyl- α -L-ribohexopyranose XIX :



XIX

Ved gentagen omsætning af forbindelsen XIX med p-nitrobenzoylchlorid i tør pyridin isoleres dens 1,4-di-p-nitrobenzoylderivat, hvorfra der efter behandling med tør hydrogenchlorid i dichlormethan ved 0°C dannes den ønskede forbindelse VIII.

Fremstilling af mellemproduktet 2,3-dideoxy-4,6-di-O-p-nitrobenzoyl-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexopyranosylchlorid III.

En opløsning af hydroxylamin i methanol blev fremstillet ved behandling af hydroxylaminhydrochlorid (8,35 g, 0,12 mol) med natriumhydroxid (4,92 g, 0,12 mol) i methanol (215 ml) og frafiltrering af det dannede natriumchlorid. 4,6,0-benzyliden-2-deoxy- α -L-erythro-hexopyranosid-3-ulose (XV) (E.H. Williams et. al. Canad. J. Chem. 1969, 47, 4467) (5,35 g) blev sat til denne friskfremstillede opløsning. Efter 15 timer ved stuetemperatur blev methyl-4,6,0-benzyliden-2-deoxy- α -L-erythro-hexo-pyranosid-3-uloseoxim (5,25 g, 93%) filtreret fra og tørret: smp. 211-213°; $[\alpha]_D = -201,6^\circ$ (c = 0,5 i CHCl₃); m/e 247 (M⁺ - 32). PMR spektret er i overensstemmelse med strukturen.

Oximet, som netop fremstillet (5,0 g), i diethylether (600 ml) indeholdende et overskud af lithiualuminiumhydrid (2,15 g) blev opvarmet under omrøring og med tilbageløbskøling i 18 timer. Tyndtlagskromatografi (solventsyst. CHCl₃-MeOH 6:1 v/v) indikerede at reduktionen var fuldstændig. Tilsætning af ethylacetat, filtrering og inddampning gav krystallinsk methyl-3-amino-4,6,0-benzyliden-2,3-dideoxy- α -L-ribohexopyranosid (4,05 g, 85%); smp. 120-121°; $[\alpha]_D = -145^\circ$ (c = 0,5 i CHCl₃); m/e 265 (M⁺). Denne forbindelse (4 g) i 0,5 N HCl i methanol (75 ml) blev henstillet ved stuetemperatur i 1 time. Opløsningen blev indstillet til pH 5,5 med Amberlite (Varemærke) IR 45 og inddampet til tørhed ved reduceret tryk. Remanensen, suspenderet i diethylether (70 ml), blev behandlet med trifluoreddikesyreanhydrid (10 ml) ved 0° natten over. Råmaterialet, som fremkom ved inddampning til tørhed i vacuum indtil syren var fuldstændig fjernet, blev behandlet med methanol ved stuetemperatur natten over og gav ved afdampning af opløsningsmidlet methyl-2,3-dideoxy-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexopyranosid (XVI); (3,34 g, 82%); $[\alpha]_D = -71,35^\circ$ (c = 0,7 i CHCl₃); m/e 242 (M⁺ - 31). Dette trin følger fremgangsmåden ifølge P. J. Beynon et. al., J. Chem. Soc. (C), 1969, 272.

Pyranosidet XVI (2,5 g) opløst i vandfrit pyridin (45 ml) blev behandlet med p-nitrobenzoylchlorid (4,25 g) ved 0°C. Efter 2 timer blev reaktionsblandingen hældt på is. Bundfaldet blev filtreret fra og vasket med vand til neutral reaktion. Omkrystallisation fra CHCl₃-diethylether gav 4,95 g (95%) af di-p-nitro-benzoat derivatet, smp. 180-182°; $[\alpha]_D = -127^\circ$ (c = 0,48 i CHCl₃). Denne forbindelse (4 g) opløst i en blanding af chloroform (15 ml) og eddikesyre (10 ml) blev mættet med tør hydrogenchlorid ved 0°C.

Efter 1 time blev opløsningen inddampet til tørhed under vacuum. For at fjerne ethvert spor af syre blev remanensen opløst i benzen og inddampet til tørhed adskillige gange. Rensning af råproduktet ved kromatografi på silicagelsøjle med chloroform som opløsningsmiddel gav 3,15 g (80 %) rent 2,3-dideoxy-4,6-di-O-p-nitrobenzoyl-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexopyranose (XVII):
 smp. 114 - 116°; $[\alpha]_D^{20} = -124^\circ$ (c = 0,43 i CHCl₃). PMR spektret viser absorption ved 3,83 (d, C-1OH), 5,26 (dd, J' 4 Hz, J'' 10,5 Hz, C-4H) og 5,39 (s bred, W_H 6 Hz, C-1H).

Pyranosen (XVII) (2,5 g) i vandfri pyridin (40 ml) blev behandlet med p-nitrobenzoylchlorid (1,25 g) ved 0°. Efter 14 timer ved stuetemperatur blev reaktionsblandingen hældt på is. Det dannede bundfald af tri-O-p-nitrobenzoylderivat blev filtreret fra, vasket med vand til neutral reaktion og tørret i vacuum. PMR spektret af produktet (2,6 g, 92 %) omkrystalliseret fra CHCl₃-Et₂O, smp. 168 - 170° viser inter alia absorption ved 6,72 (s bred, W_H 6 Hz, C-1H), hvilket indikerer en aksial konfiguration i C-1 positionen i p-nitrobenzoylgruppen.

Tri-O-p-nitrobenzoylderivatet (2 g) opløst i dichlormethan (60 ml) blev mættet med tør hydrogenchlorid ved 0° i 1 time. Bundfaldet p-nitrobenzoesyre blev filtreret fra og opløsningen blev inddampet til tørhed i vacuum indtil syren var fuldstændig fjernet. Det resulterende rå 2,3-dideoxy-4,6-di-O-p-nitrobenzoyl-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexopyranosylchlorid (III) (1,6 g, 95 %) blev anvendt uden yderligere rensning. PMR spektret viser inter alia, absorption i C-1H ved 6,45 (dd, J' 3,5 Hz, J'' 1,0 Hz).

Fremstilling af mellemproduktet 2,3,6-trideoxy-3-N-trifluoracetyl-4-O-p-nitrobenzoyl- α -L-ribohexopyranosylchlorid (VIII).

En opløsning af methyl-2,3-dideoxy-3-N-trifluoracetyl- α -L-ribohexopyranosid (XVI) (0,6 g) i vandfrit dimethylformamid (14 ml) blev blandet med N-bromsuccinimid (0,37 g) og triphenylphosphin (0,6 g). Reaktionsblandingen blev anbragt 1 time ved 50° og opløsningen blev inddampet i vacuum. Remanensen opløst i chloroform (50 ml), blev vasket med vand for at eliminere succinimidet. Remanensen som fremkom ved afdampning af opløsningsmidlet blev rensat ved kromatografi på en kiselsyresøjle med diethylether som elueringsmiddel.

Det rene 6-bromderivat (0,4 g) som herved fremkom blev opløst i methanol (40 ml) og blev reduceret i tilstedeværelse af palladium på trækul 20 %

(0,5 g) og bariumcarbonat (2,0 g) ved 10 atm., dette gav et kvantitativt udbytte af methyl-2,3,6-trideoxy-3-trifluoracetamido- α -L-ribohexopyranosid (XVIII), tyndtlagskromatografi på Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ med CHCl₃-MeOH som solventsysttem (6 : 1 v/v) : RF 0,4. P.M.R. spektret er sammenfaldende med strukturen. Dette trin følger fremgangsmåden i S. Hanessian et. al., Carbonhyd. Res., 1972, 24, 45.

En opløsning af pyranosidet (XVIII) (0,24 g) i vandfrit pyridin (4 ml) blev blandet med p-nitrobenzoylchlorid (0,24 g). Reaktionsblandingen blev anbragt under omrøring ved 0°C i tre timer og derefter hældt på is. Det således dannede 4-O-p-nitrobenzoylderivat blev filtreret fra og vasket til neutral reaktion.

Denne forbindelse blev tørret over phosphorpentoxid i adskillige timer og opløst i en blanding af iseddikesyre (1 ml) og vandfrit dichlormethan (5 ml) og blev mættet med tørt hydrogenchlorid ved 0°C. Afdampning af opløsningsmidlerne gav 2,3,6-trideoxy-3-N-trifluoracetyl-4-O-p-nitrobenzoyl-L-ribohexopyranose (XIX) (0,22 g) : tyndtlagskromatografi på Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ med benzen-ethylacetat som solventsysttem (20 : 1 v/v) RF : 0,18.

En opløsning af pyranosen (XIX) (0,18 g) i vandfrit pyridin blev blandet med p-nitrobenzoylchlorid (0,13 g).

Reaktionsblandingen blev omrørt ved 0° i tre timer og hældt på is. Det således dannede di-p-nitrobenzoylderivat blev filtreret fra og vasket til neutral reaktion. Denne forbindelse blev tørret, opløst i dichlormethan (5 ml) og mættet med hydrogenchlorid ved 0°. Afdampning af opløsningsmidlet gav et kvantitativt udbytte af det ønskede produkt 2,3,6-trideoxy-3-N-trifluoracetyl-4-O-p-nitrobenzoyl- α -L-ribohexopyranosylchlorid (VIII) som anvendes uden yderligere rensning. De følgende eksempler belyser fremgangsmåden ifølge opfindelsen nærmere.

Eksempel 1

3',4'-epi-6'-hydroxy-daunomycin (V)

Daunomycinon (I; R = methoxy) (1,1 g) i vandfrit dichlormethan (110 ml) blev blandet med 1-chlor-2,3-dideoxy-3-N-trifluoracetyl-4,6-di-O-p-nitrobenzoyl- α -L-ribohexopyranose (III) (0,8 g) i tilstedeværelse af molekyll-

sigte (12 g, 4 Å Merck) og behandlet med AgSO_3CF_3 (0,37 g) under kraftig omrøring natten over ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen blev neutraliseret med en mættet vandig opløsning af natriumbicarbonat. Den organiske fase blev skilt fra og inddampet i vacuum. Remanensen blev renset ved kromatografi på en kiselsyresøjle med benzen-ethylacetat (2 : 1 v/v) som elueringsmiddel: 1,3 g (80 %) af produktet (II) : smp. 241 - 243°; $[\alpha]_D = +241^\circ$ (c = 0,07 i CHCl_3) fremkom.

Forbindelsen (II) (0,7 g) opløst i acetone (45 ml) blev blandet med 0,2 N vandig natriumhydroxid (50 ml) ved 0°. Efter 40 minutter blev opløsningen indstillet til pH 4,5 med 1 N saltsyre og ekstraheret med chloroform for at eliminere aglyconerne. Den vandige opløsning, indstillet til pH 8,5, blev gentagne gange ekstraheret med chloroform.

De samlede ekstrakter, tørret over vandfrit natriumsulfat, blev inddampet til 10 ml. Tilsætning af en støkiometrisk mængde vandfri hydrogenchlorid i methanol og diethylether i overskud gav 3',4'-epi-6'-hydroxydaunomycinhydrochlorid (V) (0,36 g, 83 %) : smp. 183 - 185°; $[\alpha]_D = +215^\circ$ (c = 0,02 i MeOH). Tyndtlagskromatografi på Merck kiselgel HF plade ved pH 7, M/15 phosphatbuffer, med chloroform-methanol-vand som solventsysttem (13 : 6 : 1 volumenforhold) ; RF 0,43.

Eksempel 2

3',4'-epi-6'-hydroxy-adriamycin(VI)

Slutproduktet i eksempel 1 (0,3 g) opløst i en blanding af vandfri methanol (4,2 ml) og dioxan (12 ml) blev blandet med ethylorthoformiat (0,3 ml) og 1,1 ml af en opløsning af brom i chloroform (0,93 g i 10 ml). Efter 1 time ved stuetemperatur blev reaktionsblandingen hældt i en blanding af diethylether (60 ml) og petroleumsether (bp. 40 - 70°C) (30 ml): Et rødt bundfald som blev dannet, blev filtreret fra og vasket med diethylether adskillige gange for at fjerne syren fuldstændigt, og opløst i en blanding af acetone (6 ml) og 0,25 N vandig hydrogenbromid (6 ml). Efter 15 timer ved stuetemperatur blev blandingen tilsat vand (6 ml) og ekstraheret med chloroform gentagne gange for at fjerne aglyconerne. Den vandige fase blev ekstraheret med n-butanol indtil ekstrakterne ikke længere var farvede. Afdampning af det organiske opløsningsmiddel i vacuum til et lille volumen (ca. 5 ml)

gav 14-brom-derivatet (0,26 g) som et rødt krystallinsk produkt. 14-brom-derivatet (0,26 g) blev opløst i 0,25 N vandig hydrogenbromid (6 ml) og blandet med 0,45 g natriumformiat i vand (4,5 ml). Reaktionsblandingen blev omrørt ved stuetemperatur i 100 timer og derefter indampet til tørhed i vacuum. Remanensen blev opløst i 120 ml chloroform-methanol (2 : 1 v/v) og vasket med en 2,5 % vandig opløsning af natriumbicarbonat (2 gange 50 ml). Den vandige fase blev ekstraheret med chloroform indtil ekstrakterne ikke længere var farvede. Den organiske fase blev samlet med chloroformekstrakterne, tørret over vandfrit natriumcarbonat og indampet til et lille volumen (ca. 30 ml) i vacuum. Den røde opløsning indstillet til pH 3,5 (Congorødt) med vandfrit hydrogenchlorid i methanol blev blandet med diethylether i overskud, hvorved der fremkom 3',4'-epi-6'-hydroxyadriamycin (VI) som hydrochlorid (0,12 g) ; smp. 158 - 160°; $[\alpha]_D^{20} = +178^{\circ}$ (c = 0,01 i MeOH); tyndtlagskromatografi på Merck Kiselgelplade ved pH 7, M/15 phosphatbuffer, med chloroform-methanol-vand som solventsysteem (13 : 6 : 1 volumenforhold); RF 0,32. Dette trin følger fremgangsmåden i britisk patentbeskrivelse nr. 1.217.133.

Eksempel 3.

3',4'-epi-daunomycin (X).

Daunomycinon (I, R = methoxy), (0,29 g) i vandfri dichlormethan (30 ml), blandet med pyranosylchloridet (VIII) (0,15 g) blev behandlet med AgSO_3CF_3 (0,1 g) under kraftig omrøring natten over ved stuetemperatur. Produktet blev behandlet som i eksempel 1 og (0,185 g, 65 %) af det beskyttede produkt VII, smp. 245°, blev dannet ved tyndtlagskromatografi på Merck Kiselgelplader 60 F₂₅₄ med benzen-ethylacetat solventsysteem (2 : 1 v/v) : RF 0,3. Behandling med base som i eksempel 1 gav det ønskede produkt (X) i kvantitativt udbytte, smp. 180 - 181°C; $[\alpha]_D^{20} = +243,5^{\circ}$ (c = 0,05 MeOH). Tyndtlagskromatografi på Merck Kiselgelplader ved pH 7, M/15 phosphatbuffer, med chloroform-methanol-vand som solventsysteem (13 : 6 : 1 volumenforhold); RF 0,55. Daunomycin under de samme betingelser : RF 0,43.

Eksempel 4.

3',4'-epi-adriamycin (XI).

Produktet X (0,5 g) blev omdannet, som i eksempel 2, til dets adriamycin-analoge (XI) (0,28 g) smp. 168 - 170°; $[\alpha]_D^{20} = +284^\circ$ (c = 0,044 MeOH). RF = 0,3 med chloroform-methanol-vand solventsystern (14 : 6 : 1 volumenforhold).

Eksempel 5.

4-demethoxy-4'-epi-daunomycin (XIII).

1 gram 4-demethoxydaunomycinon (I, R = hydrogen) (beskrevet i belgisk patentskrift nr. 837 758) opløst i 100 ml vandfrit dichlor-methan indeholdende 1,2 g 1-chlor-N,0-trifluoracetyl-4-epi-daunosamin (beskrevet i belgisk patentskrift nr. 826 848) behandles i tilstedeværelse af 10 g molecularsigte (4 Å Merck) med 0,86 g AgSO_3CF_3 opløst i 40 ml diethylether. Efter 20 min. ved stuetemperatur neutraliseres opløsningen med en mættet vandig opløsning af NaHCO_3 og den organiske fase skilles fra og indampes i vacuum. Det N,0 beskyttede derivat (XII) behandles med 200 ml methanol i 15 min. ved stuetemperatur og råproduktet (1,3 g), som dannes ved fordampning af opløsningsmidlet, kromatograferes på kiselysesøjle med blandingen chloroform-benzen-methanol (100 : 30 : 4 volumenforhold) som elueringsmiddel; 0,55 g rent N-trifluoracetyl-4-demethoxy-4'-epi-daunomycin fremkommer. PMR (CDCl_3 -DMSO- d_6 1 : 1 v/v): 1,38 (d, CH_3 -C-5'), 5,23 (bred s, W_H 7,5 Hz, C-7H), 5,5 (dd, J' 2,5 Hz, J'' 1 Hz, C-1'H), 7,7-8,0 og 8,15-8,50 (to symmetriske m, aromatisk H), 13,18 og 13,45 (to s, C-6OH og C-11OH); TLC på Merck kiselgel F_{254} plade med chloroform-benzen-methanol (100 : 30 : 4 v/v) som solventsystern : RF 0,17.

N-trifluoracetylderivatet opløses i 5 ml acetone og behandles ved 0° med 50 ml 0,1N NaOH. Efter 20 min. indstilles opløsningen til pH 8,2 og ekstraheres gentagne gange med chloroform. De kombinerede ekstrakter som tørres og koncentrerer til et lille volumen (ca. 15 ml) tilsættes vandfrit hydrogenchlorid i methanol til pH 3,5 (congorødt); ved tilsætning af et overskud diethylether fremkom 0,35 g 4-demethoxy-4'-epi-daunomycin (XIII), som hydrochlorid: TLC på Merck kiselgel F_{254} plade med chloroform-methanol-vand (120 : 20 : 2) som solventsystern : RF 0,25.

Eksempel 6.4-demethoxy-4'-epi-adriamycin (XIV)

0,35 g 4-demethoxy-4'-epi-daunomycinhydrochlorid (XIII) opløst i en blanding af vandfrit methanol (5ml), dioxan (14 ml) og ethylorthoformiat (0,35 ml) behandles med 1,4 ml af en opløsning af brom i chloroform (0,93g Br₂ i 10 ml CHCl₃). Efter 30 min. ved stuetemperatur hældes reaktionsblandingen i en blanding af ethylether (70 ml) og petroleumsether (35 ml). Det røde bundfald som filtreres fra og vaskes med ethylether gentagne gange for fuldstændigt at fjerne syren opløses i en blanding af acetone (7 ml) og 0,25 N vandig hydrogenbromid (6 ml). Efter 15 timer ved stuetemperatur tilsættes 6 ml vand og ved adskillige ekstraktioner med chloroform fjernes aglyconerne. Derefter ekstraheres den vandige fase med n-butanol indtil ufarvede ekstrakter fremkommer. Fordampning af det organiske opløsningsmiddel i vacuum til et lille volumen (ca. 6 ml) gav 0,26 g 14-bromderivat. Denne forbindelse opløses i 6,7 ml 0,25 N vandig hydrogenbromid og behandles med 0,5 g natriumformiat i 5 ml vand. Reaktionsblandingen anbringes under omrøring ved stuetemperatur i 48 timer og inddampes derefter til tørhed i vacuum. Remanensen opløst i 120 ml chloroform-methanol (2 : 1 v/v) vaskes med 2,5% vandig NaHCO₃ (to gange 50 ml). Den vandige fase ekstraheres med chloroform indtil ufarvede ekstrakter fremkommer, tørres (Na₂SO₄) og inddampes til et lille volumen (ca. 30 ml) i vacuum. Den røde opløsning, indstillet til pH 3,5 (congorødt) med vandfrit hydrogenchlorid i methanol, tilsættes overskud af ethylether, hvorved der dannes 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin (XIV) som hydrochlorid (0,17 g), dette renses ved kromatografi på en søjle af cellulosepulver med solventsystemet chloroform-methanol-vand (140 : 20 : 2 v/v) som elueringsmiddel. Det rene produkt smelter under nedbrydning ved 178°; TLC på Merck kiselgel F₂₅₄ plade ved pH 7, med M/15 fosfatbuffer, med solventsystemet chloroform-methanol-vand (130 : 60 : 10 v/v) : RF 0,54.

Biologisk aktivitet.

Antitumoraktiviteten af de omhandlede, hidtil ukendte forbindelser 3',4'-epi-daunomycin, 3',4'-epi-6'-hydroxydaunomycin, 3',4'-epi-6'-hydroxyadriamycin og 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin, blev bedømt på adskillige transplanterede tumorer i mus og in vitro forsøg. Resultaterne fra disse forsøg er angivet i de følgende tabeller.

3',4'-epi-daunomycinForsøg in vitro over kloneffektiviteten hos Hela celler.

Efter behandling i 2, 8 eller 24 timer blev Hela-celler udsået (200 celler pr. plade) og antallet af kolonier blev bestemt otte dage senere. Den inhiberende dosis (ID_{50}) repræsenterer den dosis som giver 50 % inhibering af kolonier.

T A B E L 1 (virkning på Hela celler)

Forbindelse		ID_{50} (g/ml)	
	2 t	8 t	24 t
daunomycin	17	8,5	6,8
3',4'-epi-daunomycin	270	220	190

Forsøg in vitro over dannelsen af foci hos Moloney Sarcoma Virus (MSV).

Forbindelsen som skulle undersøges blev bedømt på museembryofibroblast (MEF) kulturer inficeret med MSV og på tilsvarende uinficerede kulturer. Efter tre døgns behandling blev den inhiberende dosis (ID_{50}) bedømt udfra celleproliferation i uinficerede kulturer (cytotoksisk virkning) og på MSV fociddannelse i inficerede kulturer. (antiviral virkning).

T a b e l 2

forbindelse	antiviral virkning ID_{50} ng/ml	cytotoksisk virkning ID_{50} ng/ml
daunomycin	3	16
3',4'-epi-daunomycin	45	90

3',4'-epi-daunomycin viser mindre cytotoksisk aktivitet in vitro, når det sammenlignes med daunomycin.

Hos tumorbærende dyr viser det imidlertid tydelig antitumoraktivitet som vist i tabel 3.

Ascites lymfocitisk P 388 leukæmi.

CDF_1 hammus blev intraperitonealt inoculeret med 6×10^6 leukæmiceller/mus og derefter intraperitonealt behandlet fra første til niende dag efter inoculeringen med forskellige doser af den undersøgte forbindelse. Bedømmelse på den tyvende dag.

T a b e l 3

Dosis	Toks. (overlevende på femte dag)	Kurerede	Vægtforskel	Tumorbedømmelse middeloverlevel- sestid(dage) (x)	T/C %
25	6/6	1	-0,8	28	231
12,5	6/6	-	-0,1	21	173
6,25	6/6	-	+0,7	18,8	155
3,13	6/6	-	+0,3	17,3	142
1,56	6/6	-	+1,0	15,7	129

(x) Kontrol 12,1 dag

3',4'-epi-6'-hydroxydaunomycin

Forbindelsen viser tydelig aktivitet in vivo som vist i Tabel 4 der angiver virkningen af stoffet på L 1210 leukæmi-bærende mus.

Indavlede BDF mus blev intraperitonealt inoculeret med 1×10^5 leukæmiceller/mus og derefter behandlet med det undersøgte stof. Enkelt behandling i.p. på første dag.

T a b e l 4 (virkning på L 1210 leukæmi)

Forbindelse	Dosis (ng/kg)	T/C %
3',4'-epi-6'- hydroxydaunomycin	7,5	150
	11,5	150
	17,25	150

3',4'-epi-6'-hydroxyadriamycin

Forbindelsen er aktiv ved eksperimentelle tumorer.

I Tabel 5 angives dens virkning på Ascites Sarcoma 180 hos mus. Forsøget blev gennemført på grupper à 10 mus (Swiss CD1). Den undersøgte forbindelse blev anvendt intraperitonealt i varierende doser hos forsøgsdyrene én dag efter intraperitoneal inoculation med 1×10^6 tumorceller/mus.

Middeloverlevelsestiden er angivet som procent af overlevelsestiden hos ubehandlede dyr som arbitrært sættes til 100 %. Antallet af langtidsoverlevende (LTS) angives også.

T a b e l 5 (virkning på Ascites Sarcoma 180)

Forbindelse	Dosis	T/C %	LTS
3',4'-epi-6'-hydroxy- adriamycin	3	123	1/10
	4,5	226	2/10
	6,7	138	
	10,5	138	
adriamycin	4,5	250	1/10

4-demethoxy-4'-epi-adriamycin

Forbindelsen blev undersøgt i sammenligning med adriamycin i adskillige in vitro systemer og eksperimentelle musetumorer.

In vitro resultater angives i Tabel 6. Den undersøgte forbindelse var afgjort mere aktiv end adriamycin.

Resultaterne som blev opnået ved eksperimentelle musetumorer er angivet i Tabel 7, 8 og 9.

På ethvert af de undersøgte systemer, udviste 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin en bemærkelsesværdig antitumoraktivitet ved doser 10 gange lavere end ved adriamycin.

Ved L 1210 og P 388 leukæmi var antitumoraktiviteten ved den optimale (ikke toksiske) dosis sammenlignelig med adriamycins.

Ved fast Sarkom 180 var inhiberingen af tumorvækst på 11. dagen lidt lavere end adriamycins ved ækvitoksiske doser.

Ved Gross leukæmi (en systemisk tumor transplanteret i.v.) var forøgelsen af levetiden hos mus, der blev behandlet med de to forbindelser i ækvitoksiske doser, ens.

Man kan konkludere, at 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin udviste en høj antitumoraktivitet hos mus, i lighed med adriamycin, ved 10 gange lavere doser.

T a b e l 6 - In vitro virkning af 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin, sammenlignet med adriamycin ID₅₀ (ng/ml)

Forbindelse	Hela ^a			MSV ^b	MEF ^c
	2 ^a	8	24	72	72
Adriamycin	125	28	12,5	0,01	0,026
4-demethoxy-4'-epi-adriamycin	0,35	0,1	0,03	0,003	0,003

a) kloneffektivitet hos Hela-celler

b) inhibering af MSV foci dannelse

c) inhibering af museembryofibroblastproliferation

T a b e l 7 - Aktivitet af 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin på
ascitisk leukæmi. Behandling i.p. på 1. dag.

Leukæmi	Forbindelse	Dosis (mg/kg)	T/C ^a %	LTS ^b	Toksisk døde
L 1210	Adriamycin	2,5	155	4/11	0/11
		5	166	1/11	1/11
		10	155	3/11	7/11
	4-demethoxy-4'- epi-adriamycin	0,25	155	0/11	0/11
		0,5	166	2/11	0/11
		1	133	0/11	11/11
P 388	Adriamycin	2,5	150	0/10	0/10
		5	162	0/10	0/10
		10	200	1/10	0/10
	4-demethoxy-4'- epi-adriamycin	0,25	143	0/10	0/10
		0,5	162	1/10	1/10
		1	162	0/10	8/10

a) Middeloverlevelsestid % af ubehandlede kontroller.

b) Langtidsoverlevende efter 60 døgn.

T a b e l 8 - Aktivitet af 4-demethoxy-4'-~~epi~~-adriamycin
 på fast Sarcom 180. Behandling i.v. på 1.
 til 5. dag.
 Samlede data fra 2 forsøg.

Forbindelse	Dosis (mg/kg)	T/C ^a %	Toksisk døde
Adriamycin	2	22,2	3/19
	2,5	13,5	11/18
4-demethoxy-4'- epi - adriamycin	0,06	87,3	0/10
	0,12	85,1	2/16
	0,25	41,9	4/19
	0,5	-	9/9

a) Tumurvægt på 11.dag, % af ubehandlede kontroller.

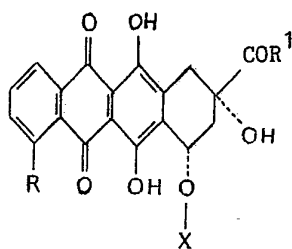
T a b e l 9 - Aktivitet af 4-demethoxy-4'-epi-adriamycin på
Gross leukæmi. Behandling i.v. på 1. til 3. dag.
Samlede data fra 2 forsøg.^a

Forbindelse	Dosis (mg/kg)	T/C %	LTS	Toksisk døde
Adriamycin	3,5	164	0/20	0/20
	4,5	182	0/20	0/20
	5,5	200	1/10	1/10
	6	214	0/10	3/10
4-demethoxy-4'-epi- adriamycin	0,35	153	2/20	0/10
	0,45	196	0/20	0/20
	0,55	186	0/10	0/10
	0,6	214	0/10	1/10
	0,65	207	0/10	0/10

a) Se forklaring til Tabel 7.

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til fremstilling af α -anomere af antracyclinglycosider med den almene formel

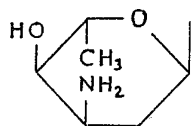


hvor

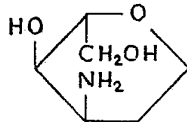
R^1 er methyl eller hydroxymethyl, og enten

R er methoxy og

X er

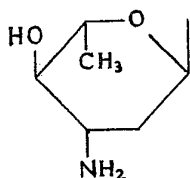


eller



eller R er hydrogen og

X er



eller hydrochlorider deraf,

kendteget ved, at daunomycinon eller 4-demethoxydaunomycinon omsættes med et beskyttet 1-halogenderivat af 3,4-epi-6-hydroxy-daunosamin, 3,4-epi-daunosamin eller 4-epi-daunosamin i et inert organisk opløsningsmiddel i tilstedeværelse af en opløselig sølvsaltkatalysator og en molekylsigte som dehydreringsmiddel, og at de beskyttende grupper fjernes fra de dannede glycosider ved svag alkalisk hydrolyse med 0,1 N natriumhydroxid, og de opnåede daunomycinderivater isoleres som hydrochlorider, eller på i og for sig kendt måde bromeres i 14-stillingen, omsættes med natriumformiat og hydrolyseres, hvorefter de dannede adriamycinderivater isoleres som hydrochlorider.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendteget ved, at sølvsalt-

katalysatoren er sølvtrifluormethansulfonat (AgSO_3CF_2).

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t v e d , at det inerte organiske opløsningsmiddel er chloroform eller dichlormethan.

Fremdragne publikationer:

US patent nr. 3803124.