

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 147858 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 5667/77

(51) Int.Cl.³: C 07 H 19/06

(22) Indleveringsdag: 19 dec 1977

(41) Alm. tilgængelig: 21 jun 1978

(44) Fremlagt: 24 dec 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 20 dec 1976 US 752510

(71) Ansøger: F. *HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT; CH-4002 Basel, CH.

(72) Opfinder: Alan Frederick *Cook; US.

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af 5'-deoxy-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5-fluoruridin eller fysiologisk tolerable syreadditionssalte deraf

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte pyrimidinnucleosider, nemlig 5'-deoxy-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5-fluoruridin eller fysiologisk tolerable syreadditionssalte deraf, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at 2',3'-O-beskyttelsesgruppen hydrolytisk spaltes fra i 2',3'-stillingen ketaliseret 5'-deoxy-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5-fluoruridin, eller 5'-deoxy-5'-halogen-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5'-halogen-5-fluoruridin reduceres i 5'-stilling, og det vundne 5'-deoxy-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5-fluoruridin, om ønsket, omsættes med en fysiologisk tolerabel syre.

Udtrykket "fysiologisk tolerable salte" omfatter ikke-toxiske salte, som 5'-deoxy-5-fluorcytidin og -uridin danner med uorganiske mineralsyrer og organiske syrer, f.eks. hydrochlorider, hydrobromider, phosphater, sulfater, nitrater, acetater, formiater, maleater, fumarater eller benzoater.

Foretrukne 2',3'-hydroxy-beskyttelsesgrupper er alkyliden-, cycloalkyliden- og aralkylidengrupper, der kan være yderligere substitueret. Eksempler på sådanne beskyttelsesgrupper er anisylider, cyclohexylider, methoxymethylider og fortrinsvis isopropylider eller benzylider.

Udgangsnucleosiderne, i 2'-3'-stilling ketaliseret eller i 5'-stilling halogeneret 5'-deoxy-5-fluorcytidin og 5'-deoxy-5-fluoruridin, kan fx fremstilles som beskrevet i tysk patentskrift nr. 2.756.653.

Omdannelsen af 5'-halogenforbindelserne til de tilsvarende 5'-deoxyforbindelser kan let foretages ved katalytisk hydrogenering i et protisk polært opløsningsmiddel, f.eks. en alkohol, fortrinsvis methanol, under anvendelse af en ædelmetalkatalysator såsom palladium, eventuelt på et inert bærestof såsom kul eller bariumsulfat, eller i nærværelse af nikkel. Hydrogeneringen kan udføres ved en temperatur mellem 0 og 60°C, fortrinsvis ved stuetemperatur, og under et tryk på mellem 1 og 5 atmosfærer, fortrinsvis under atmosfæretryk, i nærværelse af en organisk base, fortrinsvis en tri(lavere alkyl)amin såsom triethylamin.

Andre egnede reduktionsmidler til fremstilling af 5'-deoxyforbindelserne ud fra de tilsvarende 5'-halogenforbindelser er complexe metalhydrider såsom tributyltinhydrid, natriumcyanoborhydrid eller lithium-triethylborhydrid. Reduktionen med disse midler kan udføres ved en temperatur mellem 0 og 100°C under anvendelse af almindeligt kendte opløsningsmidler.

Spaltningen af ketalgruppen i 2',3'-stillingen i nucleosidet kan let foretages ved hydrolyse på i og for sig kendt måde. Således kan f.eks. en isopropylidengruppe fraspaltes ved behandling med trifluoreddikesyre ved stuetemperatur.

De ved anvendelse af en isopropyliden-beskyttelsesgruppe fremstillede mellemprodukter 5'-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin og 5'-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin er hidtil ukendte forbindelser.

5'-Deoxy-5-fluorcytidin og 5'-deoxy-5-fluoruridin samt de fysiologisk tolerable syreadditionssalte deraf virker mod Ehrlich-karcinomet og sarkom 180 i mus inden for et bredt dosisområde administreret oralt og parenteralt. Disse forbindelser er værdifulde antitumor-midler og kan anvendes som lægemidler i form af farmaceutiske præparater med direkte eller forsinket frigørelse af aktivstoffet, i blanding med til enteral (f.eks. oral) eller parenteral applikation egnede, ikke-toxiske, inerte, faste eller flydende bærestoffer, f.eks. vand, gelatine, gummi arabicum, lactose, stivelse, magnesiumstearat, talkum, vegetabiliske olier, polyalkylenglycoler eller vaseline. De farmaceutiske præparater kan foreligge i fast form, f.eks. som tabletter, dragéer, suppositorier eller kapsler, eller i flydende form, f.eks. som opløsninger, suspensioner eller emulsioner. De er eventuelt steriliseret og/eller indeholder yderligere hjælpestoffer såsom konserverings-, stabiliserings-, befugtnings- eller emulgeringsmidler, midler til smagsmæssig forbedring, salte til ændring af det osmotiske tryk eller pufferstoffer. Fremstillingen af de farmaceutiske præparater kan foretages på for fagmanden sædvanlig måde.

Antitumortests:

Til administration til dyr opløses forbindelserne i vand.

Sarkom 180-test:

Albinomus med en vægt på 18 - 20 g implanteres ved hjælp af trokar med små tumorstykker (20 - 30 mg) subcutant i højre lyskeområde. Tumorfragmenterne tages fra donordyr, som 7 - 10 dage i forvejen har fået implanteret faste, subcutane tumorer. Behandlingen startes på dagen for implantationen og fortsættes én gang daglig i 8 dage. 8 dage efter implantationen dræbes dyrene, og tumorerne udskæres og vejes. Forholdet mellem gennemsnitsvægten af tumorerne fra ubehandlede kontrol dyr (C) og gennemsnitsvægten af tumorer fra den behandlede gruppe (T) beregnes. Hæmningen i tumorvækst i % beregnes som $(C - T) \cdot 100/C$. En forbindelse anses som aktiv i en bestemt dosis, når hæmningen i procent er ≥ 50 .

Ehrlich-karcinom-test:

Den faste form af denne tumor fås ved subcutan implantation af 0,5 ml af en ved kogsaltopløsning til 1 - 10 fortyndet cellesuspension af en ascitisk tumor. Som donordyr tjener albinomus med en vægt på 18 - 20 g, i hvilke der 7 - 10 dage i forvejen er implanteret en tumor. Behandlingen og bedømmelsen af resultaterne foretages på den ovenfor beskrevne måde.

De med de ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse fremstillede forbindelser samt to forbindelser fra teknikens standpunkt vundne resultater er sammenfattet i tabel I og tabel II.

Tabel I

Virkning af pyrimidinnucleosider mod sarkom 180 i mus.

Dosis x 8 (mg/kg)	5'-Deoxy-5-fluorcytidin		5'-Deoxy-5-fluoruridin			
	Antal un- dersøgte dyr	Over- leven- de	Hæmning (%)	Antal un- dersøgte dyr	Over- leven- de	Hæmning (%)
400 i.p.	16	14	95	16	15	88
200	16	14	93	16	16	88
100	16	16	86	16	15	89
50	16	15	72	16	14	67
25	16	16	64	8	7	43
12,5	8	8	37			
400 p.o.	16	16	92	16	15	90
200	16	13	82	16	15	90
100	16	14	76	16	16	83
50	16	16	65	16	16	80
25	16	15	76	16	16	75
12,5	24	23	62	16	16	73
6,25	8	7	26	15	15	68
3,12				16	16	51
1,56				8	8	30

Tabel II

Virkning af pyrimidinnucleosider mod Ehrlich-karcinom i mus.

Forbindelse	Dosis x 8 (mg/kg)	Antal under- søgte dyr	Overle- vende	Hæmning (%)	
5'-deoxy-5-fluorcyti- din	400 i.p.	15	14	91	
	200	24	23	72	
	100	16	16	65	
	50	24	23	57	
	25	15	15	45	
	800 p.o.	8	8	99	
	400	16	16	95	
	200	24	24	80	
	100	24	24	71	
	50	16	16	58	
	25	16	16	37	
	5'-deoxy-5-fluor- uridin	400 i.p.	16	14	98
		200	24	22	86
		100	24	20	71
50		24	23	59	
25		24	22	43	
800 p.o.		8	8	99	
400		16	16	98	
200		16	16	90	
100		15	15	70	
50		8	8	56	
25		8	8	27	
Kendt forbindelse					
		5'-deoxyuridin	200 i.p.	8	8
		100	8	8	41

Tabel II fortsat

Kendt forbindelse				
2',5'-dideoxy-5-	400 i.p.	16	14	81
-fluoruridin	200	16	14	68
	100	16	16	37
	200 p.o.	8	8	34

Som det fremgår af de i tabel II angivne værdier for hæmning, er de omhandlede forbindelser de tidligere beskrevne forbindelser, 5'-deoxyuridin (Chemical Abstracts 76, 1972, 154079p) og 2',5'-dideoxy-5-fluoruridin (japansk offentliggørelsesskrift nr. 76/86481) overlegne.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler:

Eksempel 1.

En suspension af 92 g 5-fluorcytidin og 80 g p-toluensulfonsyre-monohydrat i 1500 ml acetone og 200 ml 2,2-dimethoxypropan omrøres ved stuetemperatur i 2 timer. Der tilsættes en overskydende mængde fast natriumhydrogencarbonat og omrøres til neutralisation af syren. Den faste remanens frafiltreres og vaskes med acetone, og filtratet og vaskeopløsningen inddampes til tørhed. Remanensen behandles med 700 ml varmt ethylacetat og begynder langsomt at krystallisere. Efter opbevaring natten over vaskes den faste remanens med ethylacetat og tørres i vakuum. Der fås 99,5 g (94% af det teoretiske) 2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin. En prøve omkrystalliseres af methanol/ethylacetat og smelter ved 182 - 184°C.

En opløsning af 32 g 2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin og 60 g methyltriphenoxyphosphoniumiodid i 300 ml tørt dimethylformamid holdes i 1 1/2 time ved stuetemperatur. Derefter tilsættes 100 ml methanol, og opløsningen inddampes til olieagtig konsistens efter 30 minutters forløb og fordeles mellem 700 ml ethylacetat og 700 ml 5%'s vandigt natriumthiosulfat. Ethylacetatfasen vaskes en gang med

700 ml vandigt thiosulfat og to gange med 700 ml vand og inddampes til en olie, der opløses i 400 ml varmt ethylacetat. Til den varme opløsning sættes hexan, indtil krystallisationen starter. Efter opbevaring ved 0°C vaskes det krystallinske bundfald med hexan og tørres i vakuum. Efter oparbejdning af moderluden fås i alt 30,1 g (69% af det teoretiske) 5'-deoxy-5'-iod-2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin, smeltepunkt 192 - 194°C.

En opløsning af 48 g 5'-deoxy-5'-iod-2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin i 500 ml methanol og 20 ml triethylamin hydrogeneres ved stuetemperatur og ved atmosfæretryk i 30 minutter i nærværelse af 25 g 5%'s palladium/kul under stadig omrøring. Katalysatoren fjernes derefter ved filtrering over "Celite" [®], og filtratet inddampes til tørhed og behandles med 200 ml ethylacetat. Produktet lades henstå natten over, krystallerne frafiltreres, og filtratet inddampes til ca. 100 ml og lades henstå endnu en nat. De på ny dannede krystaller frafiltreres, og filtratet inddampes til tørhed under reduceret tryk. Der fås 31 g (93% af det teoretiske) 5'-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin i form af et skum. Dette materiale karakteriseres ved dannelse af et krystallinsk picratsalt, smeltepunkt 168 - 170°C.

31 g 5'-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin behandles i 40 minutter med 200 ml 90%'s trifluoreddikesyre. Opløsningen inddampes til tørhed, og remanensen inddampes flere gange med ethanol til fjernelse af vand og trifluoreddikesyre og opløses endelig i 400 ml ethylacetat. Der indstilles på alkalisk reaktion med triethylamin, hvorefter krystallisationen starter efter nogle minutters forløb. Efter opbevaring natten over vaskes krystallerne med ethylacetat og tørres i vakuum. Der fås 14 g (49% af det teoretiske) 5'-deoxy-5-fluorcytidin. Yderligere materiale fås ved chromatografi af moderludopløsningerne på 600 g silicagelsøjle og eluering med 4 liter ethylacetat samt 4 liter ethylacetat/methanol i forholdet 5:1 (v/v). De relevante fraktioner inddampes til tørhed og hældes over en søjle med "Dowex" 50 [®] (H⁺-form, 2,3 x 60 cm). Der vaskes først med vand og derefter med 1N ammoniakopløsning. De ammoniakalske fraktioner inddampes til tørhed, og remanensen omkrystalliseres af methanol. På denne måde fås yderligere 6,7 g 5'-deoxy-5-fluorcytidin. Totaludbytte: 20,7 g (78% af det teoretiske), smeltepunkt 209 - 211°C.

Eksempel 2.

1,5 g 5'-deoxy-5'-iod-5-fluorcytidin i 30 ml methanol og 1 ml triethylamin hydrogeneres i 90 minutter ved stuetemperatur og under atmosfæretryk i nærværelse af 0,75 g 10%'s palladium/kul under stadig omrøring. Katalysatoren fraskilles ved filtrering og vaskes med methanol, og filtratet inddampes til tørhed og opløses i 100 ml vand. Den vandige opløsning hældes på en søjle med "Dowex" 50[®] (H⁺-form, 2,3 x 30 cm). Der elueres først med 1 liter vand og derefter med 2 liter 2N vandig ammoniakopløsning. De ammoniakalske eluater inddampes til tørhed, og remanensen optages to gange i 200 ml ethanol og inddampes og krystalliseres endelig af ethanol. Der fås 0,685 g (69% af det teoretiske) 5'-deoxy-5-fluorcytidin, smeltepunkt 207 - 208°C. Udgangsmaterialet fremstilles på de to nedenfor anførte måder:

a) Ud fra 5-fluorcytidin.

En opløsning af 2,61 g 5-fluorcytidin i 50 ml dimethylformamid behandles i 5 timer ved stuetemperatur med 5,42 g MTPI. Da der ved tyndtlagschromatografi stadig kan påvises udgangsmateriale i reaktionsblandingen, tilsættes yderligere 5,42 g MTPI. Efter 90 minutters forløb tilsættes 10 ml methanol, og efter yderligere 15 minutters forløb inddampes opløsningen, indtil der er opnået olieagtig konsistens. Remanensen opløses i 30 ml ethylacetat/methanol i forholdet 1:1 (v/v) og hældes på 600 g silicagelsøjle. Søjlen elueres med ethylacetat/methanol i forholdet 10:1 (v/v). Der opsamles fraktioner på 20 ml. Fraktionerne 190 - 280 sammenhældes og inddampes, og den faste remanens opløses i 30 ml vand. Den vandige opløsning hældes på en "Dowex" 50[®]-søjle (H⁺-form, 2,3 x 40 cm). Der elueres først med vand og derefter med 2N ammoniakopløsning. Eluatet inddampes til en krystallinsk masse på 200 mg (5,4% af det teoretiske). Ved omkrystallisation af ethanol fås det rene stof med et smeltepunkt på 187 - 189°C.

b) Ud fra 5'-deoxy-5'-iod-2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin.

En opløsning af 20 g 5'-deoxy-5'-iod-2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin i 100 ml trifluoreddikesyre/vand i forholdet 9:1 (v/v) holdes

ved stuetemperatur i 70 minutter, hvorefter den inddampes til tørhed, inddampes to gange med hver gang 200 ml ethanol og endelig opløses i 200 ml ethylacetat. Der neutraliseres med triethylamin, og efter henstand natten over tørres det krystallinske bundfald, udbytte 16,8 g (93% af det teoretiske).

Eksempel 3.

En suspension af 50 g 5-fluoruridin og 39,3 g p-toluensulfonsyre-monohydrat i 750 ml acetone og 94 ml 2,2-dimethoxypropan omrøres ved stuetemperatur i 50 minutter. Til den klare opløsning sættes en overskydende mængde fast natriumhydrogencarbonat, og blandingen omrøres så længe, at den reagerer neutralt. Den faste remanens fjernes derefter ved filtrering og vaskes med acetone, og filtratet inddampes til tørhed. Den faste remanens omkrystalliseres af 2 liter ethylacetat, og der fås 48 g (83% af det teoretiske) 2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin, smeltepunkt 196 - 197°C.

En opløsning af 46,4 g 2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin i 250 ml tørt dimethylformamid behandles med 86,7 g MTPI og holdes i 50 minutter ved stuetemperatur. 30 minutter efter tilsætning af 200 ml ethanol inddampes opløsningen, og den olieagtige remanens fordeles mellem 1 liter ethylacetat og 1 liter 5%'s vandigt natriumthiosulfat. Ethylacetatfasen vaskes to gange med 1 liter vand, tørres over natriumsulfat og inddampes til tørhed. Den olieagtige remanens krystalliseres af 350 ml ethylacetat. Der fås 52,9 g (85% af det teoretiske) 5'-deoxy-5'-iod-2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin, smeltepunkt 202 - 203,5°C.

En opløsning af 24 g 5'-deoxy-5'-iod-2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin i 800 ml methanol og 15 ml triethylamin hydrogeneres i 90 minutter ved stuetemperatur og under atmosfæretryk samt under stadig omrøring i nærværelse af 12 g 5%'s palladium/kul. Katalysatoren frafiltreres over "Celite"® og vaskes med methanol, medens filtratet inddampes til tørhed, og remanensen behandles i 1 time med 200 ml ethylacetat. Det krystallinske bundfald frafiltreres, og filtratet inddampes til ca. det halve, lades henstå natten over og filtre-

res igen. Dette filtrat inddampes til tørhed under reduceret tryk, og der fås 5'-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin [UV-spektrum (CH₃OH): λ_{\max} = 204 nm (ϵ = 10900) og 267 nm (ϵ = 8670)]. IR-Spektrum (KBr): 3380, 3200, 1710 og 1670 cm⁻¹], som behandles i 1 time med 200 ml 90%'s vandig trifluoreddikesyre. Produktet indampes til tørhed, inddampes flere gange med ethanol med henblik på fjernelse af vand og trifluoreddikesyre og krystalliseres af ethylacetat. Der fås 11,35 g 5'-deoxy-5-fluoruridin, smeltepunkt 189 - 190°C.

Eksempel 4.

En opløsning af 291 mg 5'-deoxy-5'-iod-5-fluoruridin i 10 ml methanol og 0,5 ml triethylamin hydrogeneres i 1 1/2 time ved stuetemperatur og under atmosfæretryk i nærværelse af 145 mg 5%'s palladium/kul. Katalysatoren frafiltreres, og filtratet inddampes til tørhed og opløses i en minimal mængde varmt ethylacetat. Under afkøling udkrystalliserer triethylammoniumiodid, som fjernes ved filtrering. Filtratet inddampes til tørhed og omkrystalliseres af ethanol. Der fås 130 mg (68% af det teoretiske) 5'-deoxy-5-fluoruridin.

Udgangsmaterialet fremstilles efter de to nedenfor anførte metoder:

a) Ud fra 5-fluoruridin:

En opløsning af 2,62 g 5-fluoruridin i 50 ml dimethylformamid behandles i 1 3/4 time ved stuetemperatur med 5,42 g MTPI. 30 minutter efter tilsætning af 10 ml methanol inddampes opløsningen til en olie, opløses i 30 ml ethylacetat og hældes på 500 g silicagel-søjle. Søjlen elueres med ethylacetat, idet der opsamles fraktioner på 20 ml. Fraktionerne 61 - 130 sammenhældes, inddampes til tørhed og opløses i 50 ml varmt ethylacetat. Ved tilsætning af 10 ml hexan fås et krystallinsk materiale. Dette lades henstå natten over ved stuetemperatur, hvorefter det krystallinske bundfald vaskes med hexan og tørres under reduceret tryk. Efter oparbejdning af moderludopløsningerne fås i alt 1,13 g (30% af det teoretiske) 5'-deoxy-5'-iod-5-fluoruridin, smeltepunkt 174,5 - 175,5°C.

b) Ud fra 5'-deoxy-5'-iod-2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin.

4 g 5'-deoxy-5'-iod-2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin behandles i 15 minutter ved stuetemperatur med 30 ml trifluoreddikesyre/vand i forholdet 9:1 (v/v). Opløsningen inddampes til tørhed og inddampes to gange med hver gang 100 ml ethanol, og remanensen omkrystalliseres af ethylacetat. Der fås 1,865 g (88% af det teoretiske).

Patentkrav.

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af 5'-deoxy-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5-fluoruridin eller fysiologisk tolerable syreadditionssalte deraf,

k e n d e t e g n e t ved, at 2',3'-O-beskyttelsesgruppen hydrolytisk spaltes fra i 2',3'-stillingen ketaliseret 5'-deoxy-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5-fluoruridin, eller 5'-deoxy-5'-halogen-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5'-halogen-5-fluoruridin reduceres i 5'-stilling, og det vundne 5'-deoxy-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5-fluoruridin, om ønsket, omsættes med en fysiologisk tolerabel syre.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at 2',3'-O-beskyttelsesgruppen er en alkyliden-, cycloalkyliden- eller aralkylidengruppe, der kan være yderligere substitueret.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at 2',3'-O-beskyttelsesgruppen er en isopropylidengruppe.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at 5'-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5-fluoruridin hydrolyseres med trifluoreddikesyre.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at 5'-deoxy-5'-halogen-5-fluorcytidin eller 5'-deoxy-5'-halogen-5-fluoruridin hydrogeneres katalytisk.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at 5'-deoxy-5'-halogen-5-fluorcytidin
eller 5'-deoxy-5'-halogen-5-fluoruridin reduceres med et komplext
metalhydrid.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at 5'-deoxy-5'-iod-5-fluorcytidin eller
5'-deoxy-5'-iod-5-fluoruridin reduceres.

Fremdragne publikationer:
