



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

- (21) Patentansøgning nr.: 1088/80
 (22) Indleveringsdag: 13 mar 1980
 (41) Alm. tilgængelig: 18 sep 1980
 (44) Fremlagt: 13 apr 1987
 (86) International ansøgning nr.: -
 (30) Prioritet: 17 mar 1979 GB 7909462

(51) Int.Cl.⁴: C 07 H 15/252
 C 07 H 5/06

- (71) Ansøger: *FARMITALIA CARLO ERBA S.P.A.; Milano, IT.
 (72) Opfinder: Giuseppe *Cassinelli; IT, Daniela *Ruggieri; IT, Federico *Arcamone; IT, Aurelio di *Marco; IT.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co

(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af 3',4'-diepi-4'-O-methyl-daunorubicin eller 3',4'-diepi-4'-O-methyldoxorubicin, samt et beskyttet halogensukker til anvendelse ved fremgangsmåden**

(57) Sammendrag:

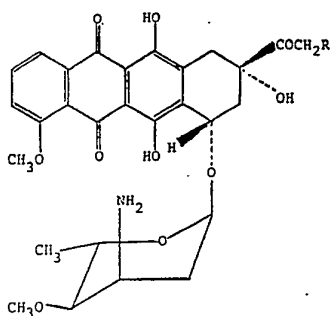
hovedsagen omfatter kondensering af daunomycinon med 4-O-methyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracetamidoriboheksopyranosylchlorid i indifferent opløsningsmiddel i nærværelse af et opløselige sølvsalt og et dehydratiseringsmiddel til dannelse af 3',4'-diepi-4'-O-methyl-N-trifluoracetyl-daunorubicin, hvorfra den beskyttende N-trifluoracetylgruppe fjernes til dannelse af 3',4'-diepi-4'-O-methyl-daunorubicin, der om ønsket omdannes videre til den tilsvarende hydroxyforbindelse ved bromering i 14-stillingen efterfulgt af hydrolysering med vandigt natriumformiat til dannelse af 3',4'-diepi-4'-O-methyldoxorubicin.

Forbindelserne med formelen I er antitumoraktive og er især velgørende til bekæmpelse af leukæmi.

Riboheksopyranosylchloridet, der benyttes som udgangsmateriale, er hidtil ukendt og fremstilles via det ligeledes hidtil ukendte tilsvarende 4-O-methylderivat.

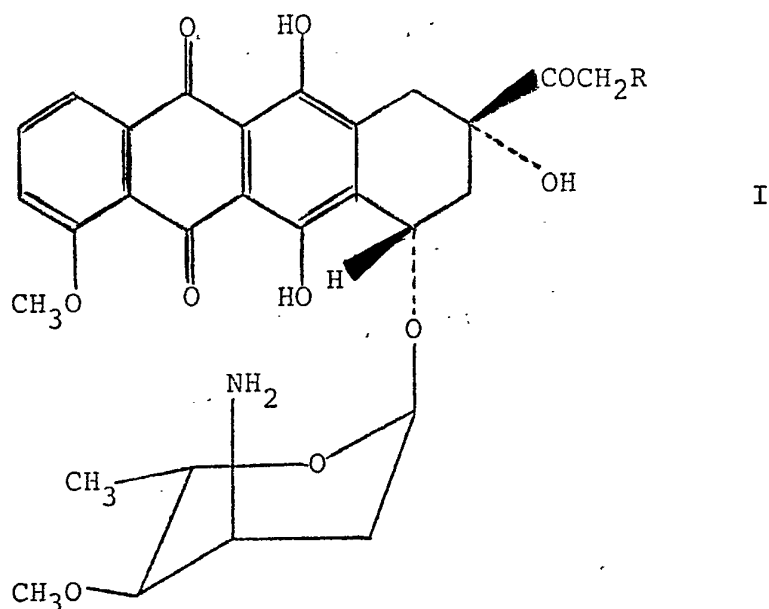
1088-80

Anthracyklinglycosider med formelen



hvor R er hydrogen eller hydroxy, eller syreadditionssalte deraf fremstilles ved en række fremgangsmådetrin, som i

0 Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte antitumor-glycosider af anthracyclinrækken med den almene formel



20 hvor R er hydrogen eller hydroxy. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Forbindelsen, hvor R er hydrogen, er 3',4'-diepi-
-4'-O-methyl-daunorubicin, og forbindelsen, hvor R er hydr-
25 oxy, er 3',4'-diepi-4'-O-methyldoxorubicin.

Daunorubicin, jfr. USA-patentskrift nr. 3.616.242,
og doxorubicin, jfr. USA-patentskrift nr. 3.590.028, der fås
ved fermentering af mikroorganismer af slægten Actinomycetes,
er kendt som antibiotika af anthracyclin-typen. Disse for-
30 bindelser har et bredt antitumor-spektrum mod eksperimentel-
le tumorer og anvendes i vid udstrækning klinisk som kemote-
rapeutiske antitumor-midler.

Forbindelsernes antitumor-virkninger er imidlertid
aldrig fuldt ud tilfredsstillende, fordi virkningerne hæv-
35 mes af en række uønskede bivirkninger, herunder dosis-relate-
ret cardiotoxicitet.

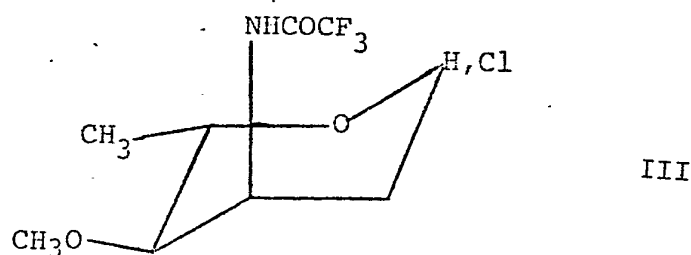
0

Til udvikling af nye antitumor-midler med mere gunstige farmakologiske egenskaber har man syntetiseret de her omhandlede daunorubicin- og doxorubicin-analoge, i hvilke aminosukkerresten er konfigurationsmæssigt forskellig fra de pågældende stam-antibiotika. Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen, hvor sukkerdelen er ændret fra L-lyxo- til L-ribo-konfiguration, viser højere aktivitet overfor eksperimentelle tumorer hos mus og lavere cardiotoksicitet end stamforbindelserne.

10

3',4'-Diepi-4'-O-methyl-daunorubicin (I, R = H) fremstilles ifølge opfindelsen ved, at daunomycinon kondenseres med 4-O-methyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracetamid-oribohexopyranosylchlorid med formlen

15



20

i et inaktivt organisk opløsningsmiddel i nærværelse af et opløseligt sølvsalt som katalysator og en molekyllarsi som dehydratiseringsmiddel, til det beskyttede α -glycosid med formlen

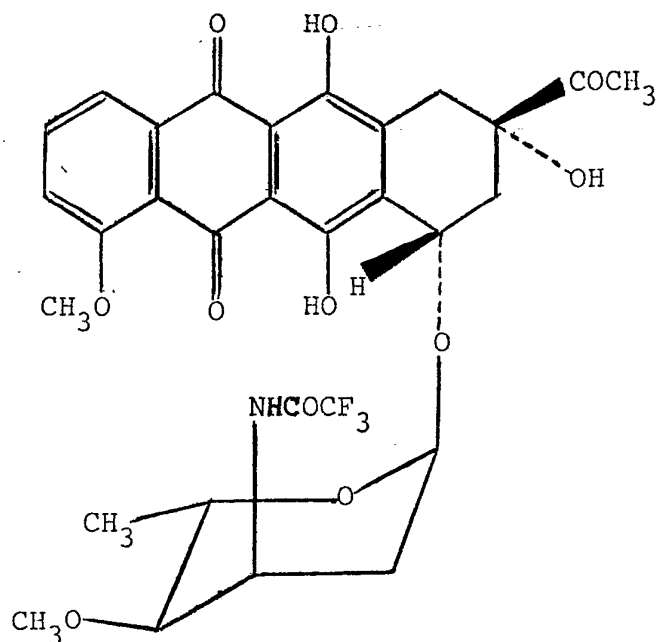
25

0

5

10

15



IV

20

hvorfra N-trifluoracetylbeskyttelsesgruppen fjernes ved mild alkalisk hydrolyse. 3',4'-Diepi-4'-O-methyldaunorubicin kan isoleres som hydrochloridet.

25

Det inaktive organiske opløsningsmiddel, hvori kondensationen foretages, er formålstjenligt chloroform eller methyldichlorid. Det opløselige sølvsalt kan være sølvtrifluormethansulfonat. Molekylesigten kan være den, der forhandles under betegnelsen Merck. De betingelser, hvorunder kondensationen foretages, kan være som beskrevet i USA-patentskrift nr. 4.112.076.

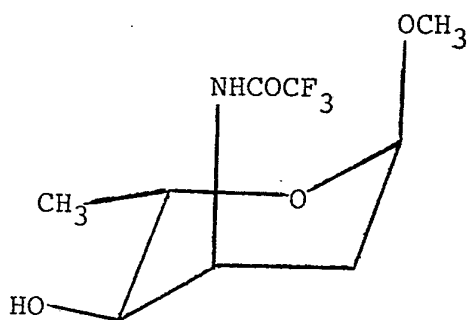
30

Opfindelsen angår også det i krav 2 omhandlede, beskyttede halogensukker III, der er en ny forbindelse.

Det beskyttede halogensukker III kan fremstilles ud fra methyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracetamido- α -L-ribohexopyranosid med formlen

0

5



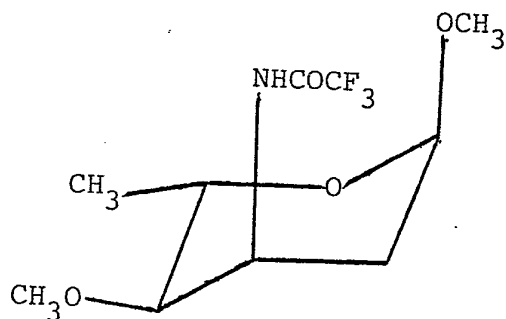
V

Denne forbindelse er beskrevet i USA patentskrift nr.
4.112.076.

Behandling af forbindelsen V med diazomethanbor-
trifluoridetherat i methylenchlorid, således som beskre-
vet af J.O. Deferrari m.fl. i *Methods in Carbohydrate Chemi-*
stry, bd. VI, side 365 (1972), Academic Press, New York og
London, og i belgisk patentansøgning nr. 862.102, giver dog
ved en lavere temperatur (-70°C) det hidtil ukendte 4-O-me-
thylderivat med formlen

20

25

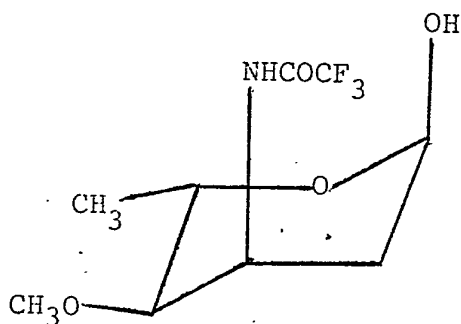


VI

Sur hydrolyse af forbindelsen VI giver en forbindelse med
formlen

30

35

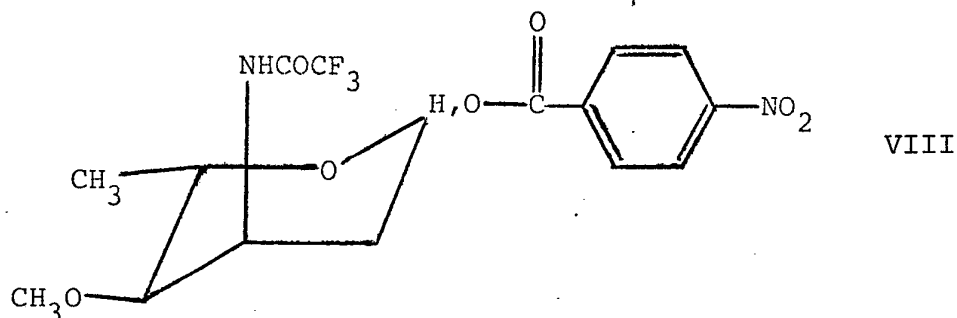


VII

0

med en fri hydroxygruppe i stilling 1. Forbindelsen VII om-
sættes med p-nitrobenzoylchlorid i tør pyridin, hvorved der
fås det tilsvarende 1-O-p-nitrobenzoylderivat med formelen

5



10

15 Endelig behandles forbindelsen VIII med tørt hydrogenchlo-
rid i vandfrit methylenchlorid, hvorved der fås 1-chlor-
derivatet (III).

I henhold til fremgangsmåden ifølge opfindelsen
fremstilles 3',4'-diepi-4'-O-methyldoxorubicin (I, R = OH)
20 ved, at 3',4'-diepi-4'-O-methyldaunorubicin (I, R = H)
bromeres, og det opnåede 14-bromderivat hydrolyseres med
vandigt natriumformiat. Betingelserne, hvorunder denne
fremgangsmåde kan foregå, kan være som beskrevet i USA pa-
tentskrift nr. 3.803.124. 3',4'-Diepi-4'-O-methyldoxorubi-
25 cin kan isoleres som hydrochlorid.

De følgende eksempler tjener til nærmere belysning
af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel 1

30 Fremstilling af mellemproduktet 4-O-methyl-2,3,6-tridesoxy-3-
trifluoracetamido-ribohexopyranosylchlorid (III)

En opløsning af 11,7 g (45 mmol) methyl-2,3,6-tri-
desoxy-3-trifluoracetamido- α -L-ribohexopyranosid (V) i 100
ml tørt methylenchlorid behandles ved -70°C med 0,6 ml bor-
35 trifluoridetherat. Idet temperaturen holdes på -70°C , til-
sættes et overskud af diazomethan i methylenchlorid, ind-
til en svagt gul farve bliver konstant. Efter 60 min. ved

0
 -70°C frafiltreres et hvidt faststof (polymethylen). Fil-
 tratet vaskes først med 10% natriumbicarbonatopløsning og
 derefter med vand og tørres endelig med vandfrit natrium-
 sulfat. Remanensen, der fås ved inddampning, chromatogra-
 5 feres på en silikagelsøjle. Ved eluering med chloroform
 fås rent methyl-4-O-methyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracet-
 amido- α -L-ribohexopyranosid (VI) som amorf faststof. Smel-
 tepunkt 55-60°C $[\alpha]_D^{23} = -110^\circ$ (c = 0,5 i CHCl₃). Massespek-
 trum: m/e 271 (M⁺). NMR-spektrum viser absorptioner ved
 10 1,30 (d, CH₃-C-5), 2,95 (dd, J = 9,5 og 4,0 Hz, C-4-H),
 3,42 og 3,43 (s, 2 CH₃O-), 3,70 (dq, J = 6,0 og 9,0 Hz,
 C-5-H), 4,45-4,85 (m, C-3-H) og 4,75 δ (bred s, W_H = 5,5 Hz,
 C-1-H).

Til en opløsning af 1,76 g (6,5 mmol) af forbindel-
 15 se VI i 35 ml eddikesyre sættes 140 ml vand. Opløsningen op-
 varmes derefter en time ved 100°C. Opløsningsmidlet afdampes,
 og remanensen omkrystalliseres ud fra tetrachlorkulstof,
 hvorved der fås 1,64 g (98%) 4-O-methyl-2,3,6-tridesoxy-3-
 -trifluoracetamido- α -L-ribohexopyranose (VII). Smeltepunkt
 20 113-115°C, $[\alpha]_D^{23} = -61,5^\circ$ (c = 0,5 i CHCl₃). Massespektrum:
 m/e 257 (M⁺). NMR-spektrum viser absorptioner ved 1,27 (d,
 CH₃-C-5), 2,96 (dd, J = 9,5 og 4,0 Hz, C-4-H), 3,44 (s, CH₃O),
 4,00 (dq, J = 6,5 og 9,5 Hz, C-5-H), 4,69 (m, C-3-H) og 5,32 δ
 (W_H = 6,0 Hz, C-1-H).

25 En opløsning af 1,64 g (6,38 mmol) af forbindelse
 VII i 76 ml tør pyridin behandles ved 0°C under omrøring med
 2 g p-nitrobenzoylchlorid. Efter 30 minutter ved 0°C og 20
 timer ved stuetemperatur hældes reaktionsblandingen i isvand
 og ekstraheres med chloroform; de forenede chloroformekstrak-
 30 ter vaskes først med 10% kaliumbisulfatopløsning, derefter
 med 10% natriumbicarbonatopløsning og endelig med vand, tør-
 res over vandfrit natriumsulfat og inddampes til tørhed. Re-
 manensen chromatograferes på en silikagelsøjle. Ved eluering
 med en chloroform/acetone-blanding (95:5 efter volumen) fås
 35 1,76 g (68%) 4-O-methyl-1-O-p-nitrobenzoyl-2,3,6-tridesoxy-
 -3-trifluoracetamido-L-ribohexopyranose (VIII)

En opløsning af 1,76 g (4,34 mmol) af forbindelse

0 VIII i 48 ml tørt methylenchlorid mættes ved 0°C med vand-
frit hydrogenchlorid. Det opnåede p-nitrobenzoesyrebundfald
filtreres fra under vandfri betingelser, og filtratet ind-
dampes, hvorved der fås en remanens på 1,2 g (100%) 4-O-
5 -methyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracetamido-L-ribohexopyra-
nosylchlorid (III).

Dette materiale kan anvendes til den i eksempel 2
beskrevne koblingsreaktion uden yderligere rensning.

10

Eksempel 23',4'-Diepi-4'-O-methyl-daunorubicin

(I, R = H) (IMI 94)

Til en opløsning af 2,7 g (6,78 mmol) daunomycinon
i 310 ml tørt methylenchlorid sættes 1,2 g 4-O-methyl-2,3,6-
15 -tridesoxy-3-trifluoracetamido-L-ribohexopyranosylchlorid
(III) (i 25 ml tørt methylenchlorid) og 8,2 g molekylesig-
te (4Å Merck). Derefter behandles reaktionsblandingen med 1,4 g
sølvtrifluormethansulfonat i 34 ml vandfri diethylether un-
der kraftig omrøring. Efter 1 time ved stuetemperatur ñeutra-
20 liseres reaktionsblandingen med 0,72 ml S-collidin, filtreres,
vaskes med 0,1N vandig saltsyre og derefter med vand, tørres
over vandfrit natriumsulfat og inddampes under vakuum. Ved
chromatografisk rensning af den rå remanens på en silikagel-
søjle under anvendelse af chloroform/acetone (9:1 efter volu-
25 men) som opløsningsmiddel fås 1,42 g (51%) 3',4'-diepi-4-O-
-methyl-N-trifluoracetyldaunorubicin (IV). Smeltepunkt 94-95°C,
[α]_D²³ = +137,5° (c = 0,05 i CHCl₃). NMR-spektret viser ab-
sorptioner ved 1,29 (d, CH₃-c-5'), 2,40 (s, CH₃CO), 2,97 (dq,
J = 9,0 og 4,0 Hz, C-4'-H), 3,40 (s, CH₃O-C-4), 4,04 (s, CH₃-
30 O-C-4), 4,47-4,91 (m, C-3'-H), 5,13 (bred s, W_H = 8,0 Hz,
O-7-H), 5,42 (bred s, W_H = 6,0 Hz, C-1-H), 7,35 (dd, J = 7,5
og 2,0 Hz, C-3-H), 7,33 (dd, J = 7,5 Hz, C-2-H), 7,87 (dd, J =
7,5 og 2,0 Hz, C-1-H), 13,40 og 14,20 δ (to s, C-6-OH og C-11-
-OH).

35

En opløsning af 1,4 g (2,2 mmol) af forbindelse IV
i 24 ml acetone behandles med 57 ml 0,2N vandigt natriumhy-
droxid og omrøres under nitrogen ved stuetemperatur. Efter

0 tre timers forløb indstilles reaktionsblandingen med 1N vandig saltsyre til pH 4 og ekstraheres derefter med chloroform for at fjerne eventuelle urenheder. Den vandige fase, der er indstillet på pH 7,5, ekstraheres med chloroform; de
5 forenede ekstrakter vaskes med destilleret vand, tørres over vandfri natriumsulfat, inddampes til et lille volumen og syres med 0,5N methanolisk saltsyre til pH 4,5. Ved tilsætning af diethylether fås et bundfald på 500 mg (39%) 3',4'-diepi-4'-O-methyldaunorubicin (I, R = H) som hydrochlorid,
10 smeltepunkt 188-192°C (sønderdeling). $[\alpha]_D = +373^\circ$ (c = 0,015 i methanol).

Eksempel 3

3',4'-Diepi-4'-O-methyl-doxorubicin

15 (I, R = OH) (IMI 124).

En opløsning af 0,29 g (0,5 mmol) 3',4'-diepi-4'-O-methyldaunorubicin-hydrochlorid i en blanding af 4 ml vandfri methanol, 11,5 ml dioxan og 0,3 ml ethylorthoformiat behandles med 1,2 ml af en 1,3 molar opløsning af brom i chloroform. Efter 2 timers forløb ved 10°C hældes reaktionsblandingen i en 2:1 blanding (efter volumen) af diethylether og n-hexan (90 ml). Det herved fremkomne bundfald opløses efter filtrering og vask med diethylether i en 1:1 (volumen) blanding af acetone og 0,25N vandig brombrinte (20 ml). Efter
20 20 timer ved 30°C tilsættes der til reaktionsblandingen en 1,3N vandig opløsning af natriumformiat (5 ml), og blandingen omrøres i 48 timer ved 30°C. Den herved fremkomne blanding ekstraheres med chloroform for at fjerne eventuelle lyophile forureninger, hvorpå den vandige fase gentagne gange ekstraheres med chloroform ved pH 7,6. De forenede ekstrakter tørres over vandfrit natriumsulfat og inddampes til et lille volumen under vakuum. Til den således fremstillede, med methanolisk saltsyre til pH 3,5 indstillede opløsning sættes diethylether, hvorved der udfældes 3',4'-diepi-4'-O-methyldoxorubicin (I, R = OH) som hydrochlorid. Smeltepunkt
35 185-187°C (sønderdeling), $[\alpha]_D = +188^\circ$ (c = 0,05 i methanol).

0

Biologisk aktivitetTabel I

5	Forbindelse	ID ₅₀ på HeLa-celler (ng/ml)
	Daunorubicin	14
	IMI 94	36
	Doxorubicin	9,5
10	IMI 124	5,9

Tabel II

Virkning på P 388 leukæmi

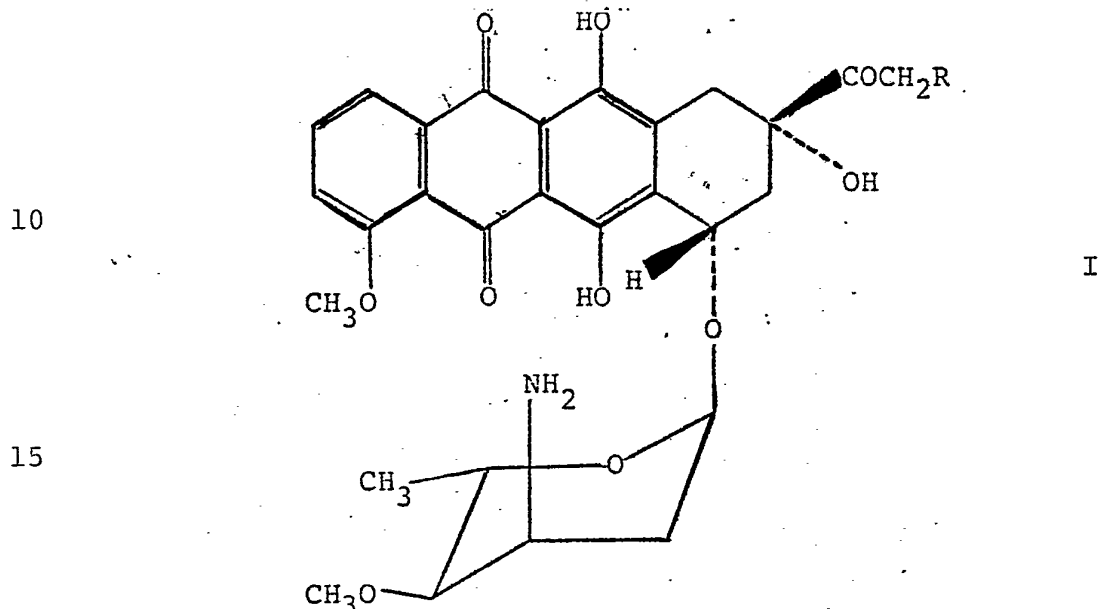
(Behandling i.p. på 1. dag)

15	Forbindelse	mg/kg	T/C %	Toksicitet	LTS
	Daunorubicin	2,9	172, 168	0/18	0/18
		4,4	181, 187	0/18	0/18
		6,6	163	3/8	0/8
20	IMI 94	6,6	145	0/8	0/8
		10	154	0/8	0/8
		15	190, 213	0/18	0/18
		22	222	0/10	0/10
		33	231	2/10	1/10
25	Doxorubicin	4,4	209	0/8	2/10
		6,6	233	0/8	0/10
	IMI 124	1,9	180	0/10	0/10
		2,9	200	2/10	0/10
		4,4	109	10/10	0/10
30		6,6	76	10/10	0/10

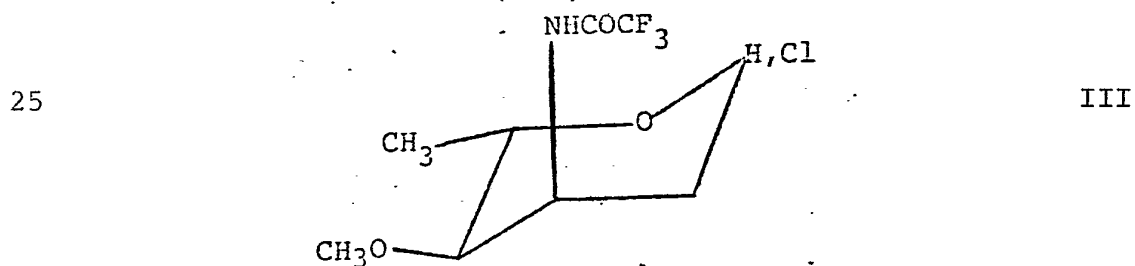
0

P A T E N T K R A V

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af 3',4'-
-diepi-4'-O-methyl-daunorubicin eller 3',4'-diepi-4'-O-methyl-
5 -xorubicin med den almene formel



20 hvor R er hydrogen eller hydroxy, eller syreadditionssalte
deraf, k e n d e t e g n e t ved, at daunomycinon kondenseres
med det beskyttede halogensukker 4-O-methyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracetamidoribohexopyranosylchlorid med formelen



30 i et inaktivt organisk opløsningsmiddel i nærværelse af et
opløseligt sølvsalt som katalysator og en molekyllarsi som
dehydratiseringsmiddel, til det beskyttede α -glycosid med
formlen

0

5

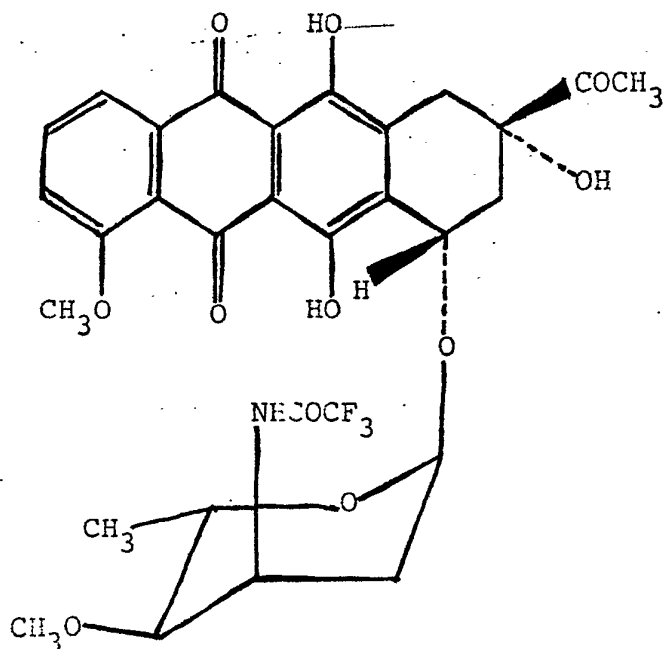
10

15

20

25

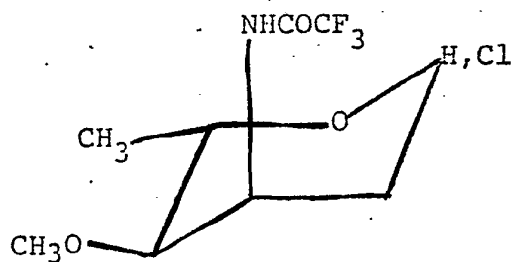
30



IV

hvorfra N-trifluoracetylbeskyttelsesgruppen fjernes ved mild
 alkalisk hydrolyse, hvorpå, om ønsket, 3',4'-diepi-4'-O-me-
 thyldaunorubicin omdannes til et syreadditionssalt deraf og
 isoleres, eller bromeres til den tilsvarende 14-bromforbin-
 delse, der hydrolyseres med vandigt natriumformiat, hvorpå,
 om ønsket, den således dannede 3',4'-diepi-4'-O-methyldoxo-
 rubicin omdannes til et syreadditionssalt deraf, fortrinsvis
 hydrochloridet, og isoleres som sådant.

2. Beskyttet halogensukker til anvendelse ved frem-
 gangsmåden ifølge krav 1, kendt i tegnet ved, at det
 er 4-O-methyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracetamidoribohe-
 pyranosylchlorid med formlen

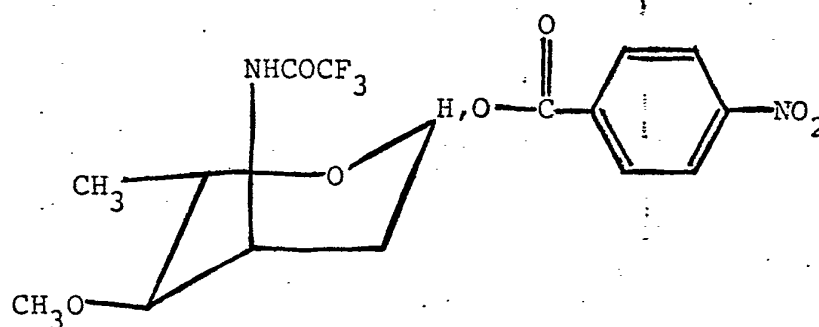


III

0

der omsættes med p-nitrobenzoylchlorid i tør pyridin til dannelsen af 4-O-methyl-1-O-p-nitrobenzoyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracetamido-L-ribohexopyranose med formlen

5



10

15 som behandles med tør hydrogenchlorid i vandfrit methylen-dichlorid til dannelsen af 4-O-methyl-2,3,6-tridesoxy-3-trifluoracetamido-L-ribohexopyranosylchlorid med formlen III.

Fremdragne publikationer:
