

346



346 177

PATENTE DE INVENCION

Case 2280/II

37/YO/HR

Memoria Descriptiva

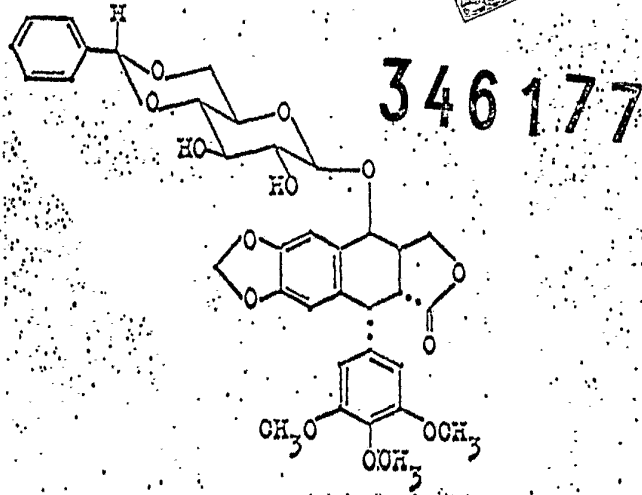
sobre:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE EPIPODOFILOTOXINA-
BENCILIDENO- β -D-GLUCOSIDO".

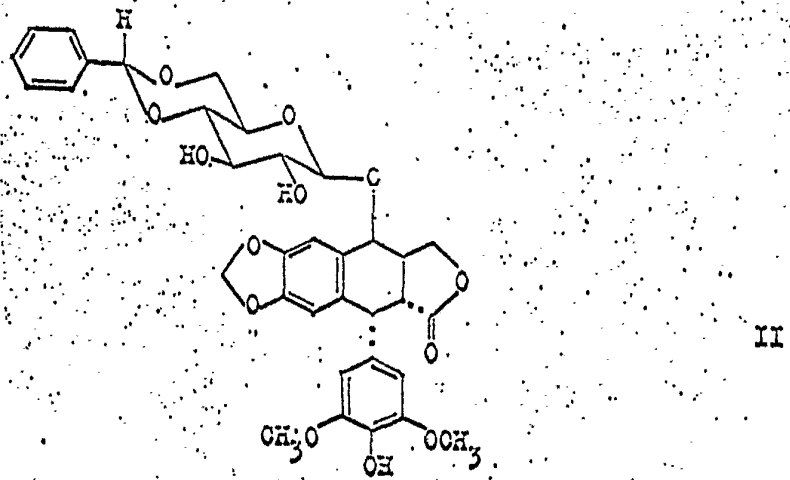
Solicitante: SANDOZ, A.G., entidad suiza, residente en Basilea, Suiza.

La presente invención se relaciona con un nuevo glucósido y con un procedimiento para su producción.

5. La presente invención proporciona epipodofilotixina-bencilideno- β -D-glucósico de fórmula I



La presente invención proporciona además el procedimiento siguiente para la producción del compuesto de fórmula I, caracterizado porque se metila 4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-bencilideno-glucósido de fórmula II



5 con diazometano.

- 3 -
346177

2280/II

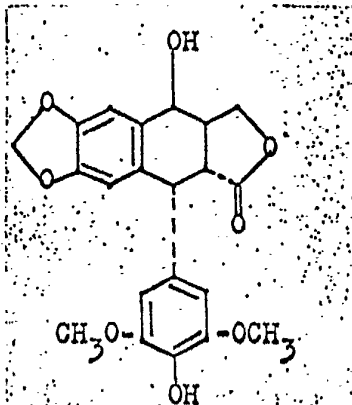
Un método para efectuar el procedimiento

5 consiste en que se disuelve 4'-demetil-epipodofilotoxina-
β-D-bencilideno-glucosa en un disolvente inerte, por ejemplo dioxano,
al cual se añade algo de metanol, y se añade una solución de diazometano
en éter a 0° a 30°C, preferentemente a la temperatura ambiente, y se
deja reaccionar la solución en ausencia de luz. Se controla la metila-
ción mediante cromatografía de capa delgada. Para seguir la elaboración
se separa el disolvente en un vacío y se purifica el material resultante
mediante cromatografía.

10

El 4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-bencilideno-glucósido
(fórmula II) usado como material inicial es nuevo. Puede obtenerse
como sigue:

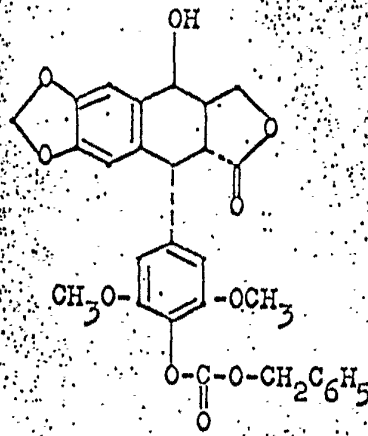
Se hace reaccionar 4'-demetil-epipodofilotoxina de fórmula III



15

con éster bencilico del ácido clorofórmico para dar 4'-carbobo-
xi-4'-demetil-epipodofilotoxina de fórmula IV

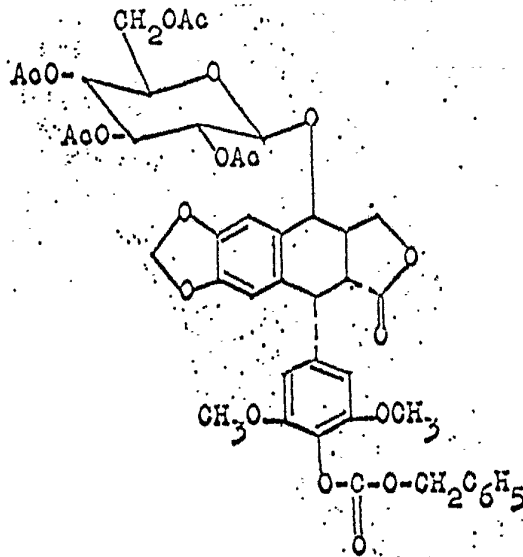
346177



IV

(véase el Ejemplo 1), se hace reaccionar ésta con 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucosa en presencia de eterato etílico de trifluoruro de boro, se separa el radical carbobenzoxi del tetra-O-acetil-4'-carbobenzoxi-4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-glucósido resultante de

5 fórmula V

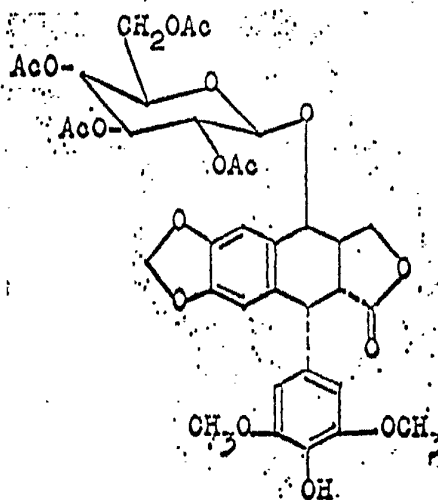


V



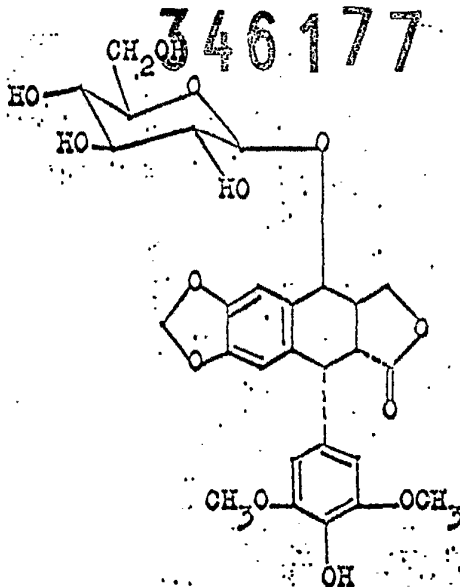
346177

(véase el Ejemplo 2), se desacetila el tetra-O-acetil-4'-demetil-epi-podofilotoxina- β -D-glucósido resultante de fórmula VI



VI

5 mediante metanólisis en presencia de acetato de zinc. (véase el Ejemplo 3) y se hace reaccionar el 4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido resultante de fórmula VII



VII

con benzaldehído en presencia de un catalizador ácido, por ejemplo cloruro de zinc anhidro (véase el Ejemplo 4).

El epipodofilotoxina-bencilideno- β -D-glucósido tiene un alto efecto citostático in vitro sobre las células del mastocitoma y los
5 cultivos de fibroblastos. Dicho compuesto se distingue además por un fuerte efecto hacia los tumores experimentales, especialmente la leucemia L-1210 del ratón.

El uso del compuesto I está indicado en el tratamiento de procesos patológicos relacionados con la multiplicación de las células,
10 por ejemplo neoplasmas malignos.

La dosificación diaria del compuesto I varía de 1 a 50 mg.

El compuesto I puede usarse por sí mismo como producto farmacéutico o en la forma de preparaciones medicinales adecuadas para aplicarse, por ejemplo en forma oral, entérica o parentérica. Con el
15 fin de producir preparaciones medicinales adecuadas se trabaja .



346177

el compuesto con adyuvantes inorgánicos u orgánicos que sean inertes y fisiológicamente aceptables. Los siguientes son ejemplos de tales adyuvantes:

- para tabletas y grageas : lactosa, almidón, talco y ácido esteárico;
- 5 para jarabes : soluciones de azúcar de caña, azúcar invertido y glucosa;
- para soluciones inyectables: agua, alcoholes, glicerina y aceites vegetales;
- para supositorios : aceites naturales o endurecidos y ceras.

10 Las preparaciones pueden además contener adecuados agentes de conservación, estabilización y humectación, facilitadores de la solución, sustancias edulcorantes y colorantes y aromatizantes.

La expresión "en forma de por sí conocida" tal como se usa aquí designa métodos en uso o descritos en la literatura sobre el
15 asunto.

En los siguientes Ejemplos no limitativos todas las temperaturas están indicadas en grados Centígrado. Los puntos de fusión y de descomposición se determinaron sobre un bloque de Kofler.



346177

EJEMPLO 1: 4'-carbобенzoxi-4'-demetil-epipodofilotoxina.

Se suspenden 60 g de 4'-demetil-epipodofilotoxina muy finamente pulverizada en 1000 cc de cloruro etilénico anhidro y después de la adición de 19 cc de piridina absoluta se enfría a -10° . Se añade por gotas a -10° en el transcurso de 2 horas y media una solución de 34 g de éster bencílico del ácido clorofórmico en 100 cc de cloruro etilénico, mientras se agita y en ausencia de humedad, y se deja reaccionar la mezcla durante otra media hora. Seguidamente se lava la solución de la reacción con agua, se seca la fase orgánica sobre sulfato sódico, se concentra mediante evaporación en un vacío y se seca el residuo en un alto vacío a $70-80^{\circ}$. La cristalización del producto bruto de acetona/éter y luego 2 veces de metanol proporciona 4'-carbобенzoxi-4'-demetil-epipodofilotoxina con un doble P.F. de $117-119^{\circ}/202-205^{\circ}$. El compuesto en su forma libre de disolvente, con un P.F. de $201-204^{\circ}$, $[\alpha]_D^{21} = -43.9^{\circ}$ ($c = 0.535$ en cloroformo), se obtiene secando en un alto vacío, primero a $95-110^{\circ}$ y luego a 130° o mediante cristalización de acetona/éter.

- 9 -
346177



2280/II

EJEMPLO 2: Tetra-O-acetil-4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-glucósido.

Se disuelven 26.8 g de 4'-carbобензохи-4'-demetil-epipodo-
filotoxina en 70 cc de cloruro etilénico mientras se calienta. Se enfría
la solución a +15° y se añaden 26.0 g de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-
5 glucosa mientras se agita. Tan pronto como se haya disuelto la mayor
parte de la tetraacetil-β-D-glucosa, se enfría rápidamente a -11° a -12°
(en ausencia de humedad). A pesar de la presencia de pequeñas cantidades
de material inicial no disuelto, se añaden luego por gotas 17.5 cc de
eterato etílico de trifluoruro de boro (48 % BF₃) a una temperatura
10 interna de -10 a -12° en el transcurso de 10 minutos y seguidamente se
agita a -10° durante otros 40 minutos. Luego se añade por gotas mientras
se agita y se enfría una mezcla de 17.5 cc de piridina absoluta y 35 cc
de cloruro etilénico y después de la adición de otros 200 cc de cloruro
etilénico se sacude 4 veces, cada vez con 100 cc de agua. Se seca la
15 fase orgánica sobre sulfato sódico y se concentra mediante evaporación
en un vacío y se seca el residuo a 70° en un alto vacío. Se disuelve el
producto bruto en 125 cc de etanol caliente, se añaden 375 cc de agua
mientras se agita y se agita mientras se enfría externamente con agua
helada hasta que la precipitación inicialmente viscosa y grumosa
20 se convierte en un polvo arenoso. Luego se filtra la precipitación con
succión, se lava con una mezcla de etanol/agua (1:3) y se seca en un
alto vacío a 70°. Se disuelve este producto bruto en 300 cc de metanol
caliente, se separa una pequeña cantidad de copos no disueltos por
filtración y se concentra el filtrado mediante evaporación en un vacío.
25 Después de secar el residuo en un alto vacío a 70° se obtiene el
tetra-O-acetil-4'-carbобензохи-4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-
glucósido en forma de espuma blanca. $[\alpha]_D^{20} = -41.7^\circ$ (c = 1.536 en
clorofórmio). Para seguir purificando se cristaliza de benceno/pentano

346177



2280/II

o benceno/ciclohexano. El tetra-O-acetil-4'-carbобензохи-4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido puro tiene un P.F. de 167-169°, $[\alpha]_D^{20} = -46.6^\circ$ ($c = 0.686$ en cloroformo).

Se disocia el radical carbобензохи del tetra-O-acetil-
5 4'-carbобензохи-4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido disolviendo
13.4 g de este compuesto en 100 cc de acetona/etanol (1:2), añadiendo
0.5 cc de ácido acético glaciao y 2 g de paladio/carbón (10 % de Pd)
e hidrogenando a 20°. Seguidamente se separa el catalizador por
filtración, se lava con una mezcla caliente de acetona/metanol y se
10 concentra el filtrado mediante evaporación en un vacío. Se vierten
100 cc de etanol hirviente sobre el residuo, se deja cristalizar
la mezcla y después de filtrar con succión y de lavar con metanol se
secan los cristales en un vacío. El tetra-O-acetil-4'-demetil-epipodo-
15 filotoxina- β -D-glucósido puro cristaliza en la forma de agujas finas
con un P.F. de 225-227°, $[\alpha]_D^{21} = -64.4^\circ$ ($c = 1.024$ en cloroformo).

EJEMPLO 3: 4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido.

Se calientan al reflujo 2.0 g de tetra-O-acetil-4'-demetil-
epipodofilotoxina- β -D-glucósido obtenido de acuerdo con el Ejemplo 2 y
1 g de acetato de zinc anhidro en 30 cc de metanol absoluto durante
20 25-horas. Seguidamente se disuelve la precipitación blanca resultante
mediante la adición de unos cuantos cc de ácido acético glaciao y
calentando ligeramente, se separa el disolvente en un vacío a 40° y se
recoge el residuo en 50 cc de cloroformo/butanol (4:1). Se lava la fase
orgánica 2 veces, cada vez con 10 cc de agua, se seca sobre sulfato
25: sódico y se concentra mediante evaporación en un vacío, y se cromato-
grafía el residuo sobre gel de sílice. Se eluye primero el material
no polar y luego 4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido puro con

- 11 -
346 177



2280/II

acetato isopropílico/metanol (9:1) saturado de agua. Se examinan las fracciones individuales mediante cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice usando acetato isopropílico/metanol (4:1), saturado de agua como agente de elución, y se combinan las fracciones de glucósido y se cristalizan 2 veces de metanol. El 4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido tiene un P.F. de 222-230°, otra forma cristalina del mismo tiene un P.F. de 262-264°, $[\alpha]_D^{21} = -88^\circ$ ($c = 0.507$ en metanol).

EJEMPLO 4: 4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-bencilideno-glucósido.

Se disuelve 1 g de 4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido seco en 20 cc de benzaldehído puro y después de la adición de 0.5 g de cloruro de zinc anhidro se sacude en una máquina a 20° durante 5 a 6 horas en ausencia de humedad. Se controla continuamente el transcurso de la reacción mediante cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice y cloroformo conteniendo 6 % de metanol como agente de elución. Con el fin de hacer visible el compuesto se rocían las placas con una solución al 1 % de nitrato de cerio-(IV)-amonio en 50 % de ácido sulfúrico y se calienta a continuación a 100-120°. Para seguir trabajando el producto de la condensación se añade cloroformo a la solución de la reacción clara de color rojo-pardo y se sacude con agua. Se extrae nuevamente la fase acuosa dos veces con cloroformo. Se combinan todas las fases de cloroformo, se lavan 2 veces con agua, se secan sobre sulfato sódico y se evapora el disolvente en un vacío. Se separa el benzaldehído aún adherido triturando el residuo aceitoso resultante con pentano hasta que se obtiene un producto polvoroso. Para seguir purificando se recoge el derivado de bencilideno en 10 cc de acetona y se añade la solución de

- 12 -
346177



2280/13

5 acetona por gotas mientras se agita a 100 cc de pentano, con lo cual se
obtiene una precipitación de color amarillo claro o blanca. Puede
purificarse el producto bruto mediante cromatografía sobre columnas de
gel de sílice. Con este fin se filtra una solución tan concentrada como
10 sea posible de 1 g del derivado de bencilideno bruto en una mezcla de
cloroformo y 2 % de metanol sobre una columna de 200 g de gel de sílice
y se eluye con la misma mezcla de disolventes. Se combinan las
fracciones que son uniformes de acuerdo con la cromatografía de capa
delgada y se vuelven a precipitar de acetona/pentano. El 4'-demetil-
10 epipodofilotoxina- β -D-bencilideno-glucósido se obtiene en forma de
polvo blanco con un P.F. de 182-185°. Después de recrystalizar de
etanol absoluto se obtienen cristales con un P.F. de 245-246°.
Rotación óptica: $[\alpha]_D^{20} = -99^\circ$ (c = 0.63 en metanol) y -104° (c = 0.52
en cloroformo).

15 EJEMPLO 5 : Epipodofilotoxina-bencilideno- β -D-glucósido.
Mediante metilación de 4'-demetil-epipodofilotoxina-
bencilideno- β -D-glucósido con diazometano.

20 Se disuelven 400 mg de 4'-demetil-epipodofilotoxina-
bencilideno- β -D-glucósido en 8 cc de dioxano/metanol (9:1) y se añade
por gotas en porciones una solución de diazometano en éter. Se controla



346177

18 OCT.

el transcurso de la metilación (la que se efectúa en la oscuridad y a la temperatura ambiente) mediante cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice con ciclohexano/cetona metil-etílica (1:1) conteniendo 2 % de metanol como agente de elución. Las manchas se hacen
5 visibles rociando con una solución al 0.2 % de sulfato de cerio-(IV) en ácido sulfúrico al 50 % y calentando hasta 130°.

Solamente después del transcurso de 12 días puede percibirse únicamente una mancha principal en el cromatograma de capa delgada. Para seguir trabajando se separa el disolvente en un vacío. Se purifica el
10 material resultante mediante cromatografía sobre una cantidad 500 veces mayor de gel de sílice "Merck". Durante toda la elución se usa ciclohexano/cetona metil-etílica (10:15) conteniendo 2 % de metanol como agente de elución. Se disuelven las fracciones que son uniformes según la cromatografía de capa delgada en 2 cc de cloroformo
15 y se precipitan con 50 cc de n-hexano. El epipodofilotoxina-bencilideno-β-D-glucósido se obtiene en la forma de un polvo amorfo de color amarillo claro con un P.F. de 166-169°.

346177



18 OCT. 1967

N O T A

5.

10.

15.

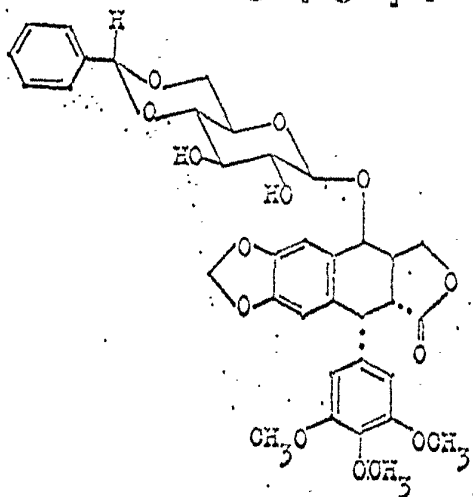
20.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Suiza, con fecha 14 de Diciembre de 1.965 nº 17231/65, 21 de Septiembre de 1.966 nº 13628/66, y 12 de Octubre de 1.966 nº 14702/66, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita patente de invención por 20 años en España, sobre: "Procedimiento para la preparación de epipodofilotoxina-bencilideno- β -D-glucósido", caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para la preparación de epipodofilotoxina-bencilideno- β -D-glucósido de fórmula I,

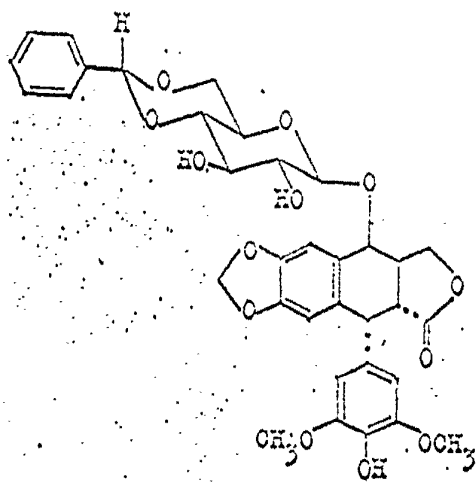


346177



I

caracterizado porque se metila 4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-bencilideno-glucósido de fórmula II



II

con diazometano.

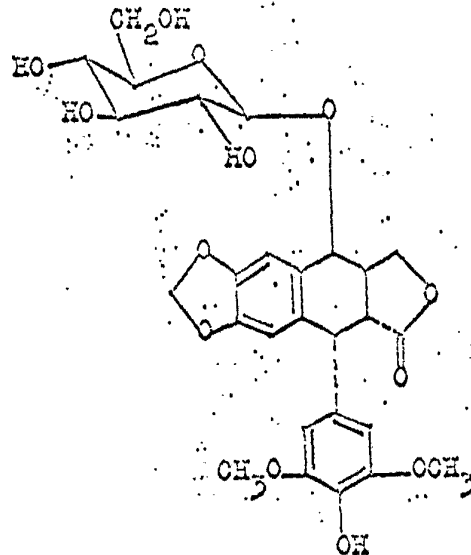
346177



18 OCT. 1961

2280/II

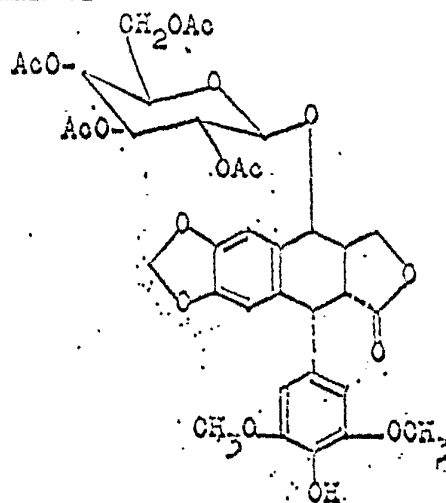
2. Procedimiento según la reivindicación 1., caracterizado porque el 4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-bencilideno-glucósido se produce reaccionando el 4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-glucósido de fórmula VII



VII

5 con benzaldehído en presencia de un catalizador ácido.

3. Procedimiento según la reivindicación 2., caracterizado porque el 4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-glucósido de fórmula VII se produce desacetilando el tetra-O-acetil-4'-demetil-epipodofilotoxina-β-D-glucósido de fórmula VI



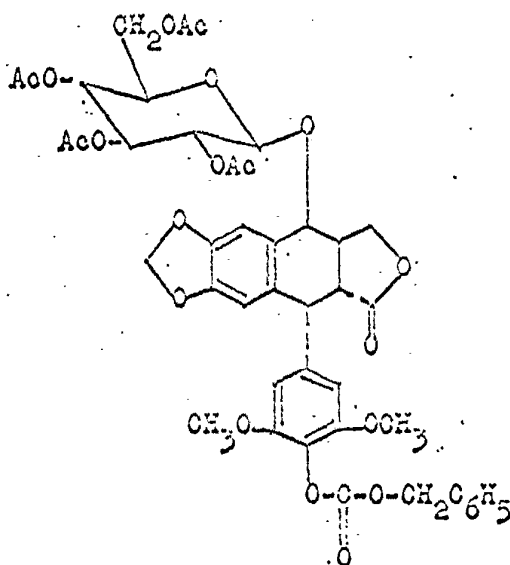
VI

10 mediante metanólisis en presencia de acetato de zinc.



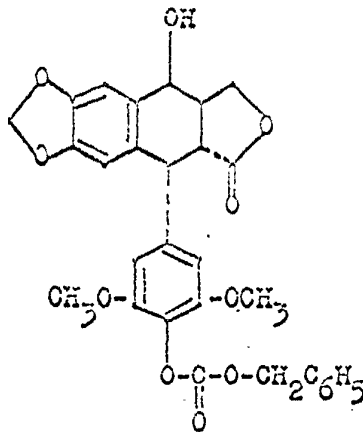
346177

4. Procedimiento según la reivindicación 3., caracterizado porque el tetra-O-acetil-4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido de fórmula VI se produce separando el radical carbobenzoxi del tetra-O-acetil-4'-carbobenzoxi-4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido de fórmula V.



V

5. Procedimiento según la reivindicación 4., caracterizado porque el tetra-O-acetil-4'-carbobenzoxi-4'-demetil-epipodofilotoxina- β -D-glucósido de fórmula V se produce reaccionando la 4'-carbobenzoxi-4'-demetil-epipodofilotoxina de fórmula IV



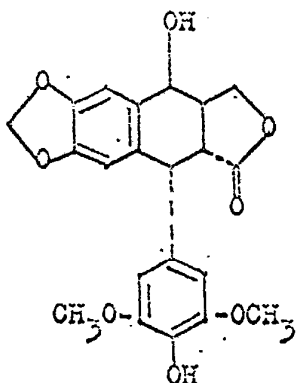
IV

346177



con 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucosa en presencia de eterato etílico de trifluoruro de boro.

6. Procedimiento según la reivindicación 5., caracterizado porque la 4'-carbобензохи-4'-демтил-епиподофилотоксина de fórmula IV se produce reaccionando la 4'-демтил-епиподофилотоксина de fórmula III



III

con éster bencilico del ácido clorofórmico.

7. Procedimiento para la preparación de epipodofilotoxina-bencilideno-β-D-glucósido, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

10

Esta memoria consta de dieciocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

13 OCT. 1951

SANDOZ A.G.

E. GOMEZ ACEBO Y MOJER
F. p. Firmado en Sandoz S.A.