

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



447 433

18 ES	11	NUMERO	10 A1
	21		
	22	FECHA DE PRESENTACION	

Case "G.349"

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
18098/75	30 Abril 1975	Inglaterra

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07H//A61K	

64 TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE COMPUESTOS GLICOSIDICOS DE LA SERIE ANTRACICLINA"

71 SOLICITANTE (S)
SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA S.p.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
MILAN (Italia)

72 INVENTOR (ES)
Federico ARCAMONE - Alberto BARGIOTTI - Aurelio di MARCO - Sergio PENCO

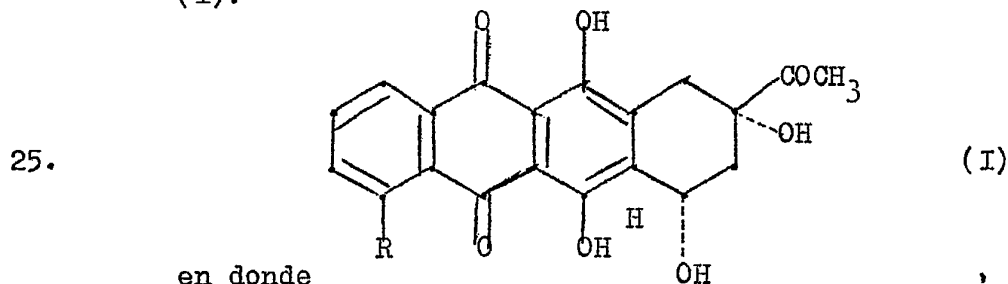
73 TITULAR (ES)
SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA S.p.A.

74 REPRESENTANTE
D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial

MEMORIA DESCRIPTIVA

- Este invento se refiere a un procedimiento para la preparación de glicósidos pertenecientes a la serie de la antraciclina. Proporciona un nuevo procedimiento para la preparación de los antibióticos antitumorales bien conocidos, daunomicina, adriamicina, 4'-epi-daunomicina y 4'-epi-adriamicina (que se describen y reivindican en las patentes británicas de la peticionaria nº 1.003.383 - 1.161.728 - Patentes galgas nº 826.848 - 826.978. Más concretamente el invento se refiere a la preparación, con el nuevo procedimiento antes citado, de los nuevos glicósidos de antraciclina: 3',4'-epi-6'-hidroxidaunomicina; 3',4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina; 3',4'-epi-daunomicina; 3',4'-epi-adriamicina; 4-demetoxi-4'-epi-daunomicina y 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina. Los nuevos compuestos del invento son útiles en el tratamiento de ciertos tumores en los animales.

- El procedimiento de este invento se basa en la condensación de una aglicona tetracíclica que tiene un sistema cromofórico de hidroxi-antraquinona de la estructura (I):



en donde

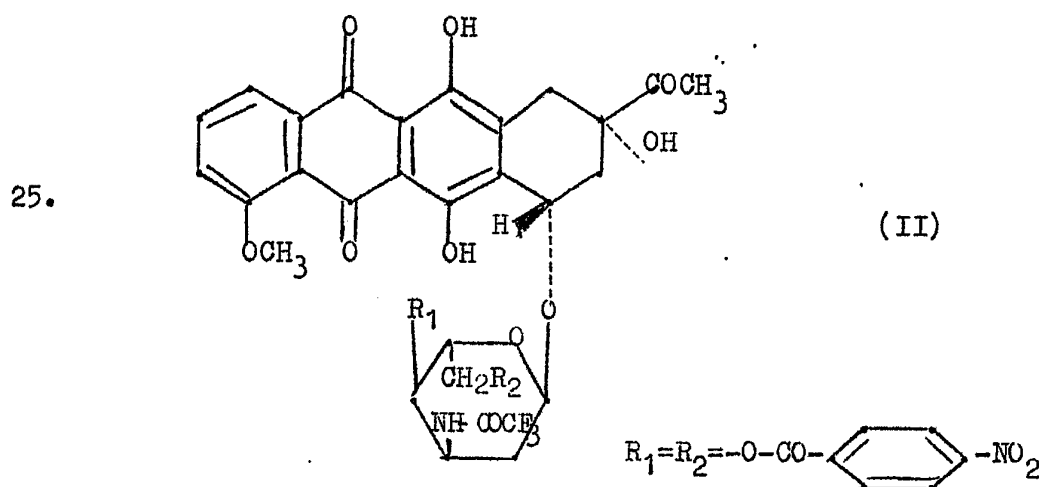
R es metoxilo o hidrógeno con derivados 1-halógeno protegidos de un azúcar amino-deoxi en un disolven

5. te orgánico apropiado tal como cloroformo o cloruro de metileno en presencia de un catalizador de sal argéntica soluble tal como trifluoro-metan-sulfonato de plata ( $\text{AgSO}_3\text{CF}_3$ ) y tamices moleculares en calidad de agentes deshidratantes.

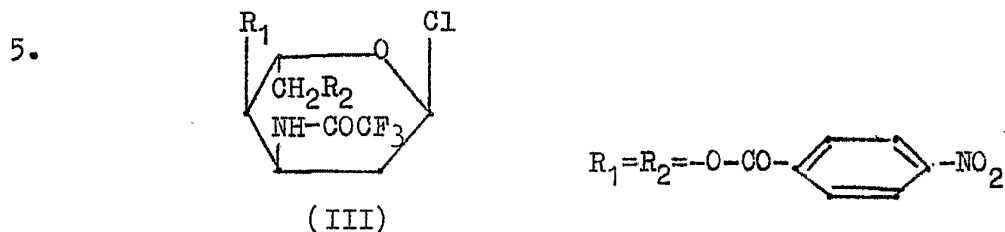
10. La solubilidad de la sal argéntica en los disolventes orgánicos permite que se produzca la condensación en fase homogénea evitando las complicaciones bien conocidas de la reacción de Koenings-Knorr en presencia de compuestos de plata o mercurio insolubles. [Günter Wulff y Gerhard Röhle, Ang. Chem. Int. Ed. 13, 157 (1974)]. La reacción se completa en breve tiempo (generalmente de una a ocho horas), y los glicósidos protegidos pueden obtenerse con elevado rendimiento. Además es muy importante y sorprendente que la reacción sea estereoespecífica: solo se forman alfa anómeros.

15.-

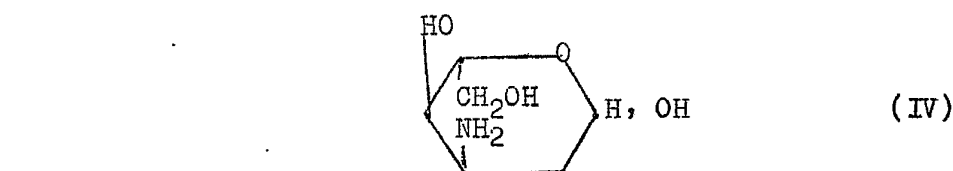
20. El derivado protegido reactivo del azúcar amino-deoxi que se condensa con la aglicona de estructura I (R = metoxilo) para proporcionar el glicósido protegido de la estructura II:



es el nuevo intermediario cloruro de 2,3-dideoxi-4,6-di-O-p-nitrobenzoil-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribohexopiranosilo III:

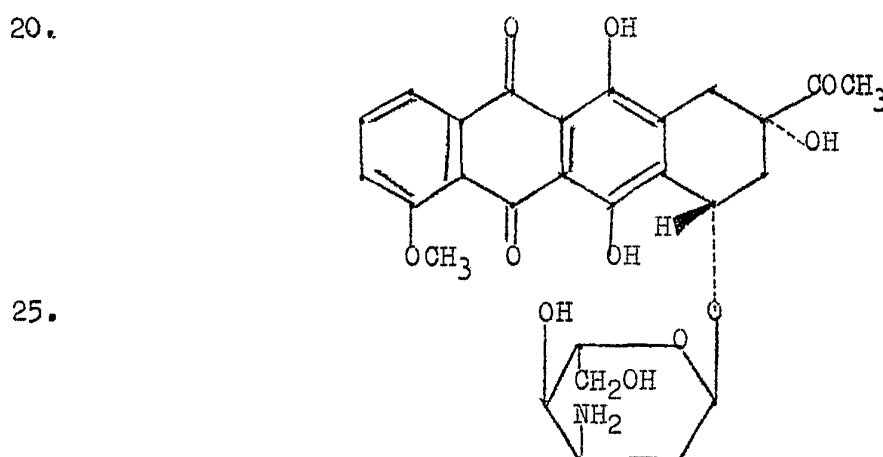


que se deriva de la 3-amino-2,3-dideoxi-L-ribohexosa (3,4-epi-6-hidroxidaunosamina) IV:



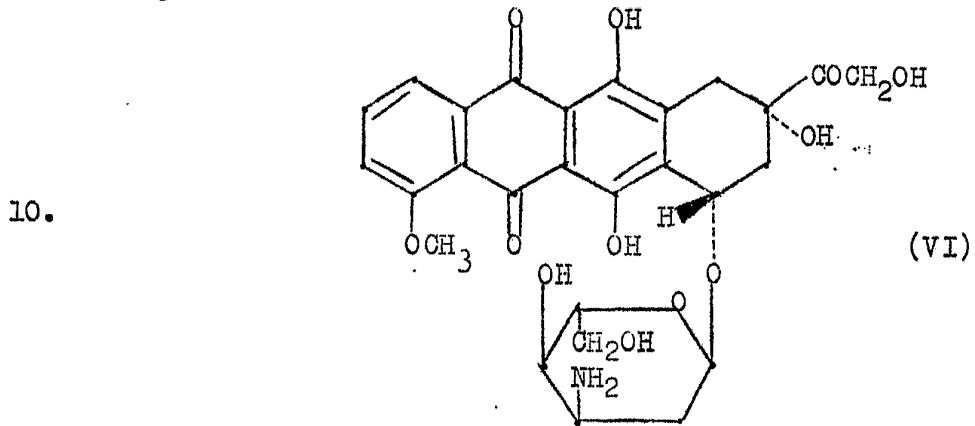
15. previamente desconocida en la serie L.

Del glicósido protegido II, después de separación básica de los grupos protectores, se obtiene el producto final V :



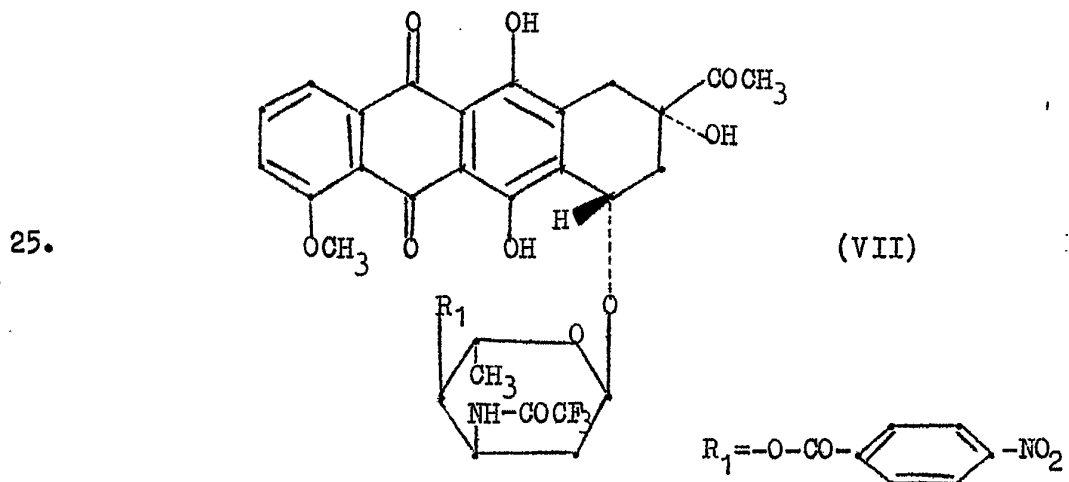
o sea, la 3',4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina que se aísla en forma del clorhidrato.

5. El tratamiento subsiguiente del compuesto V, de conformidad con el método descrito en la patente estadounidense nº 3.803,124 (9 de abril de 1974) ofrece el compuesto VI:

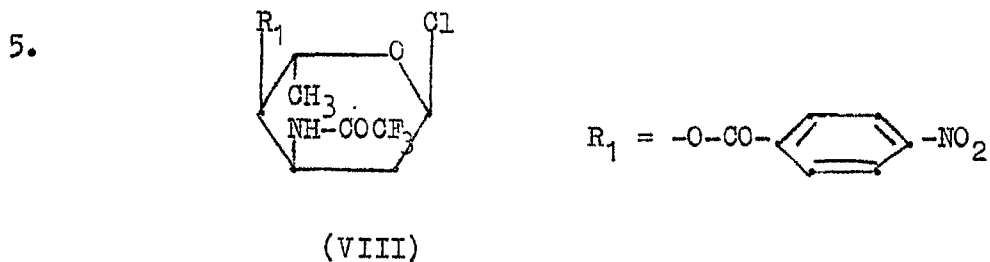


15. o sea, la 3',4'-epi-6'-hidroxiadriamicina que se aísla también en forma del clorhidrato.

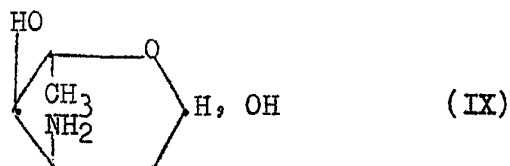
20. El derivado protegido del azúcar amino-deoxi que se condensa con la aglicona de estructura I (R = metoxilo) para proporcionar el glicósido protegido de estructura VII:



es el nuevo intermediario cloruro de 2,3,6-trideoxi-3-N-trifluoroacetyl-4-O-p-nitrobenzoil-alfa-L-ribohexo-piranosilo VIII :

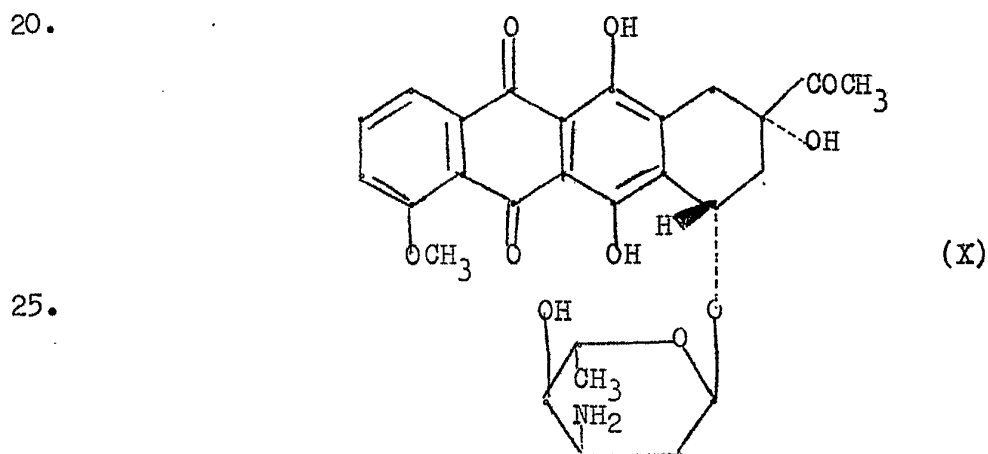


10. que se deriva de la 3-amino-2,3,6-trideoxi-L-ribohexosa IX:



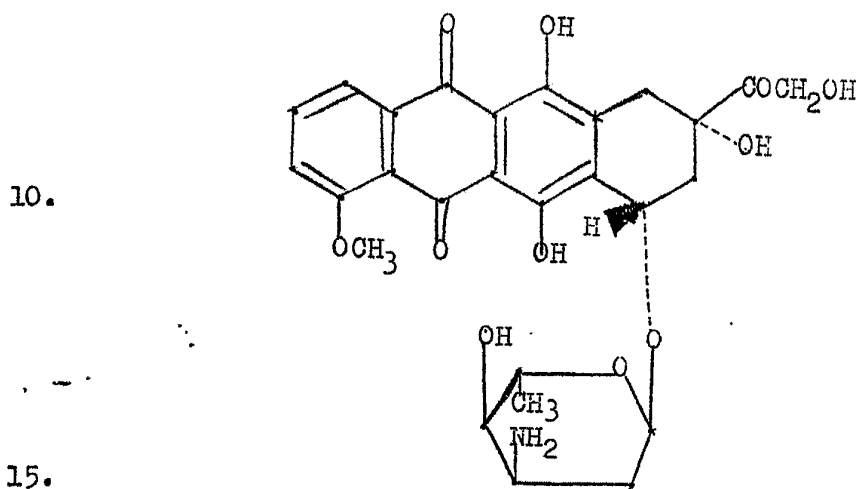
15. también desconocida anteriormente en la serie I.

De los glicósidos protegidos VII, después de separar los grupos protectores, se obtiene el producto final X:



que es la 3',4'-epi-daunomicina que se aísla en forma del clorhidrato.

El subsiguiente tratamiento del compuesto X, de conformidad con el método descrito en la patente estadounidense nº 3.803.124 (9 de abril de 1974), proporciona el compuesto XI:



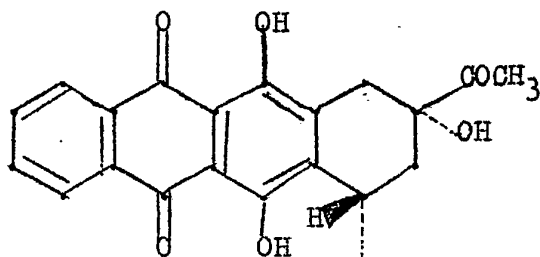
(XI)

o sea, la 3',4'-epi-adriamicina también aislada en forma del clorhidrato.

20. Cuando la condensación se lleva a cabo mediante reacción de la aglicona de estructura I (R = hidrógeno) y un derivado protegido apropiado de la 4-epi-daunosamina, o sea la 1-cloro-N,O-di-trifluoroacetil-4-epi-daunosamina (este intermediario se ha descrito y reivindicado por la peticionaria en la patente belga número 820.848); se obtiene el glicósido protegido de estructura XII:

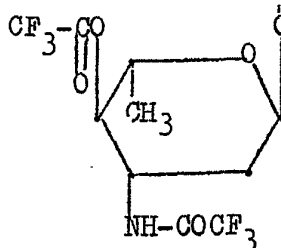
25.

5.



(XII)

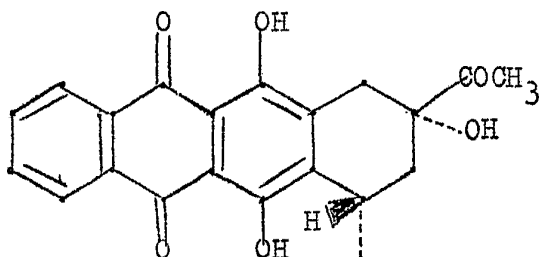
10.



15.

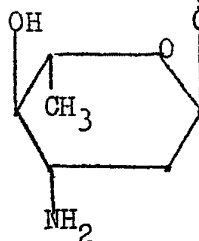
del que, después de separar los grupos protectores, primero con metanol para obtener el derivado de N-trifluoroacetilo y sucesivamente con NaOH diluido, se aisla el producto final 4-demetoxi-4'-epi-daunomicina XIII en forma del clorhidrato:

20.



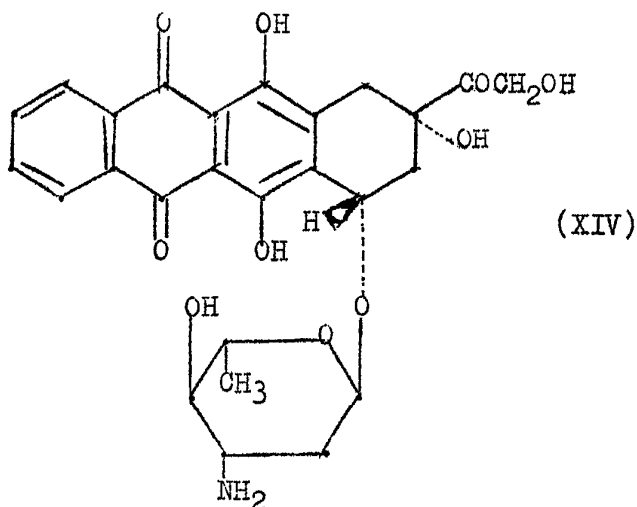
(XIII)

25.



Del compuesto XIII, siguiendo el procedimiento descrito en la patente estadounidense núm. 3.803.124, se obtiene la 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina XIV en forma del clorhidrato.

5.



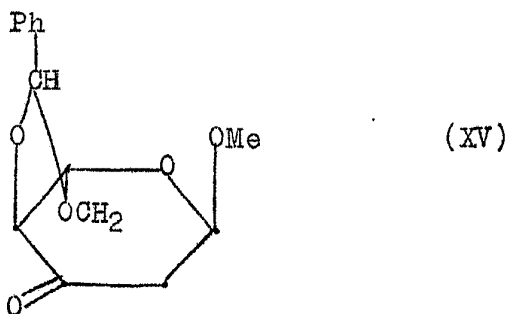
10.

Como sea que el nuevo procedimiento de condensación utilizando como catalizador la sal argéntica soluble  $\text{AgSO}_3\text{CF}_3$  es general y estereoespecífico, se comprenderá que utilizando la aglicona de estructura I (R = metoxilo) pueden prepararse también los bien conocidos antibióticos antitumorales de daunomicina y 4'-epi-daunomicina cuando la fracción de azúcar es respectivamente un derivado protegido apropiado de la daunosamina o 4'-epi-daunosamina.

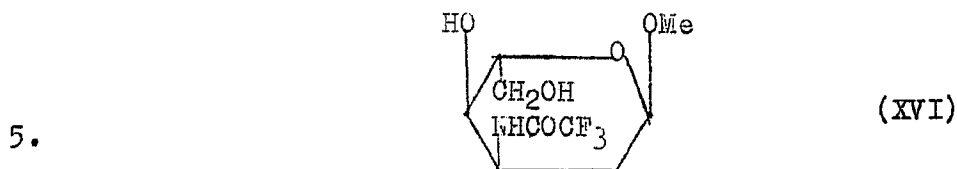
15.

El cloruro de 2,3-dideoxi-4,6-di-O-p-nitrobenzoil-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribohexo-piranosilo III utilizado para la preparación del compuesto II se obtiene a partir de la 4,6-O-benciliden-2-deoxi-alfa-L-eritro-hexopiranosid-3-ulososa de metilo XV [E.H. Williams y col., *Canad. J. Chem.* 47, 4467 (1969)].

25.

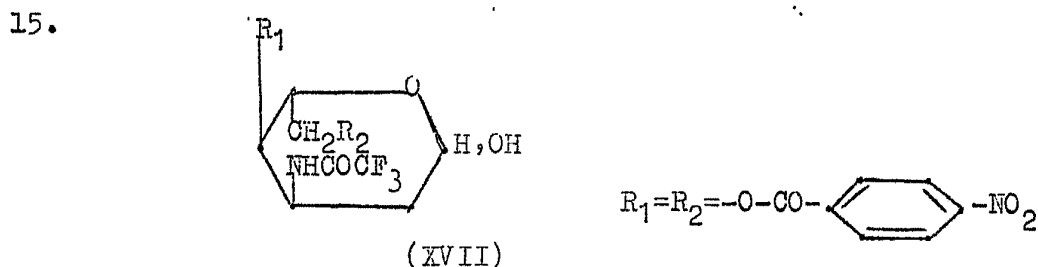


Este compuesto se convierte en 2,3-dideoxi-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribohexopiranosida de metilo XVI:



siguiendo el procedimiento que se encuentra en la literatura para el isómero D [P.J. Beynon y col., J. Chem. Soc. (C), 272 (1969)].

10. El compuesto XVI se deja a continuación que reaccione con cloruro de p-nitro-benzoilo en piridina seca y a continuación con cloruro de hidrógeno seco a 0°C para obtener 2,3-dideoxi-4,6-di-O-p-nitrobenzoil-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribohexopiranosida XVII:



20.

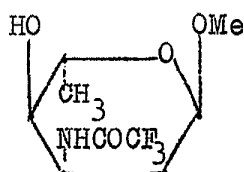
Haciendo reaccionar de nuevo el compuesto XVII con cloruro de p-nitrobenzoilo en piridina seca se aisla su 1,4,6-tri-O-nitrobenzoato del que, después de tratamiento durante una hora con cloruro de hidrógeno seco a 0°C en cloruro de metileno se obtiene, finalmente, el nuevo compuesto deseado III.

25.

La preparación del otro nuevo intermediario, cloruro de 2,3,6-trideoxi-3-N-trifluoroacetil-4-O-p-nitrobenzoil-alfa-L-ribohexo-piranosilo VIII, se efectúa a

partir del compuesto XVI y siguiendo el procedimiento descrito por S. Hanessian y col. [Carb. Res. 24, 45 (1972)] para la síntesis de azúcares 6-deoxi. Haciendo reaccionar el compuesto XVI con N-bromosuccinimida y trifenilfosfina en dimetilformamida anhidra se obtiene su derivado 6-bromo del que, mediante reducción catalítica en presencia de carbón paladiado al 20% y BaCO<sub>3</sub>, se aísla la 2,3,6-trideoxi-3-trifluoroacetamido-alfa-L-ribohexopiranosida de metilo XVIII.

10.

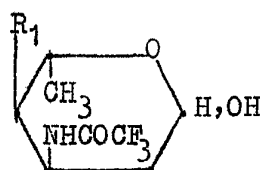


(XVIII)

15.

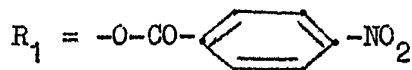
La reacción del compuesto XVIII con cloruro de p-nitro-benzoilo en piridina seca proporciona su derivado 4-O-p-nitrobenzoilo del que, después de tratamiento con cloruro de hidrógeno seco, se obtiene la 2,3,6-trideoxi-3-N-trifluoroacetil-4-O-p-nitrobenzoil-alfa-L-ribohexopiranosida XIX:

20.



25.

(XIX)



Haciendo reaccionar de nuevo el compuesto XIX con cloruro de p-nitro-benzoilo en piridina seca se aísla su derivado 1,4-di-p-nitro-benzoilo del que, después

de tratamiento con cloruro de hidrógeno seco en cloruro de metileno a 0°C, se obtiene finalmente el nuevo compuesto VIII deseado.

5. Preparación del intermediario cloruro de 2,3-dideoxi-4,6-di-O-p-nitrobenzoil-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribohexopiranosilo III.

10. Se preparó una solución metanólica de hidroxilamina tratando clorhidrato de hidroxilamina (8,35 g, 0,12 mol) con hidróxido sódico (4,92 g, 0,12 mol) en metanol (215 cc), y separando por filtración el cloruro sódico formado. A esta solución recién preparada se adicionó 4,6,0-benciliden-2-deoxi-alfa-L-eritro-hexo-piranosid-3-ulososa (XV) (E.H. Williams y col., Canad. J. Chem. 1969, 47, 4467) (5,35 g). Al cabo de 15 horas a la temperatura del ambiente se separó por filtración la metil-4,6,0-benciliden-2-deoxi-alfa-L-eritro-hexo-piranosid-3-ulososa oxima (5,25 g, 93%) y se secó; punto de fusión 211-213°;  $[\alpha]_D = -201,6^\circ$  (c = 0,5 en CHCl<sub>3</sub>); m/e 247 (M<sup>+</sup> -32). El espectro de r.p.m. se ajusta a la estructura.
15. Se agitó y calentó en reflujo, durante 18 horas, la oxima recién preparada (5,0 g) en éter dietílico (600 cc) conteniendo un exceso de hidruro de litio-aluminio (2,15 g). La cromatografía de capa delgada (sistema de solvente CHCl<sub>3</sub>-MeOH 6:1 v/v) indicó que la reducción fué completa. La adición de acetato de etilo, filtración y evaporación dió la metil-3-amino-4,6,0-benciliden-2,3-dideoxi-alfa-L-ribohexopiranosida cristalina (4,05 g, 85%): punto de fusión 120-121°;  $[\alpha]_D = -145^\circ$  (c = 0,5 en CHCl<sub>3</sub>); m/e 265 (M<sup>+</sup>). Se almacenó a la temperatura del
- 20.
- 25.

- ambiente, durante una hora, este compuesto (4 g) en cloruro de hidrógeno metanólico 0,5 N (75 cc). Se ajustó la solución a pH 5,5 con Amberlite (marca) IR 45 y se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida. Se trató el residuo suspendido en éter dietílico (70 cc), con anhídrido trifluoroacético (10 cc) a 0°C durante una noche. El material bruto, obtenido por evaporación hasta sequedad bajo vacío hasta la eliminación completa de la acidez, se trató con metanol a la temperatura del ambiente durante una noche y dió, después de la evaporación del disolvente, la metil-2,3-dideoxi-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribo-hexopiranosida (XVI); (3,34 g, 82%);  $[\alpha]_D = -71,35^\circ$  (c = 0,7 en  $\text{CHCl}_3$ ); m/e 242 ( $\text{M}^+ - 31$ ). Esta etapa siguió el procedimiento de P.J. Beynon et al., J. Chem. Soc (C), 1969, 272.

- Se trató la piranosida XVI (2,5 g), disuelta en piridina anhidra (45 cc), con cloruro de p-nitrobenzoi lo (4,25 g) a 0°C. Al cabo de dos horas se vertió la mezcla reaccional en hielo. Se separó por filtración el precipitado y se lavó con agua hasta neutralidad. La cristalización en  $\text{CHCl}_3$ -éter dietílico dió 4,95 g (95%) de derivado de di-p-nitro-benzoato, punto de fusión 180-182°C;  $[\alpha]_D = -127^\circ$  (c = 0,48 en  $\text{CHCl}_3$ ). Este compuesto (4 g), disuelto en una mezcla de cloroformo (15 cc) y ácido acético (10 cc), se saturó con cloruro de hidrógeno a 0°C. Al cabo de una hora se evaporó la solución hasta sequedad en vacío. El residuo, para eliminar completamente la acidez, se disolvió en benceno y se evaporó hasta sequedad varias veces. La purificación del producto bruto mediante

cromatografía en una columna de gel de sílice, utilizando cloroformo en calidad de disolvente, dió 3,15 g (80%) de la 2,3-dideoxi-4,6-di-O-p-nitrobenzoil-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribohexopiranososa (XVII): punto de fusión 114-116°;  $[\alpha]_D = -124^{\circ}$  (c = 0,43 en  $\text{CHCl}_3$ ): El espectro de r.p.m. mostró absorción en: 3,83 (d, C-10H), 5,26 (dd,  $J'4\text{Hz}$ ,  $J'' 10,5\text{ Hz}$ , C-4H), y 5,39 delta (s ancho,  $W_H 6\text{Hz}$ , C-1H).

5. Se trató la piranososa (XVII) (2,5 g) en piridina anhidra (40 cc) con cloruro de p-nitrobenzoilo (1,25 g) a 0°C.

10. Al cabo de 14 horas a la temperatura del ambiente se vertió la mezcla reaccional en hielo. El derivado de tri-O-nitrobenzoil precipitado formado se separó por filtración, se lavó con agua hasta neutralidad y se secó bajo vacío. El espectro de r.m.p. del producto (2,6 g 92%) cristalizado en  $\text{CHCl}_3\text{-Et}_2\text{O}$ , punto de fusión 168-170°, muestra, entre otros, absorción en 6,72 (s ancho,  $W_H 6\text{Hz}$  C-1H), indicando una configuración axial en la posición C-1 del grupo p-nitrobenzoílico.

15. El derivado de tri-O-p-nitrobenzoilo (2 g) disuelto en dicloruro de metileno (60 cc), se saturó con cloruro de hidrógeno seco a 0° durante una hora. Se separó por filtración el ácido p-nitrobenzoico precipitado y se evaporó la solución hasta sequedad bajo vacío hasta la eliminación completa de la acidez. El cloruro de 2,3-dideoxi-4,6-di-O-p-nitrobenzoil-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribohexopiranosilo bruto (III) resultante (1,6 g, 95%) se utilizó sin ulterior purificación. El espectro de

20.  
25.

r.p.m. muestra, entre otros, absorción de C-1H en 6,45 delta (dd, J' 3,5 Hz, J" 1,0 Hz).

Preparación del intermediario cloruro de 2,3,6-trideoxi-3-N-trifluoroacetil-4-O-p-nitrobenzoil-alfa-L-ribohexopiranosilo (VIII).

5. Una solución de metil-2,3-dideoxi-3-N-trifluoroacetil-alfa-L-ribopiranosida (XVI) (0,6 g) en dimetilformamida anhidra (14 cc) se mezcló con N-bromo-succinimida (0,37 g) y trifenilfosfina (0,6 g). Se trató la mezcla reaccional durante una hora a 50°, y se evaporó la solución bajo vacío. El residuo, disuelto en cloroformo (50 cc), se lavó con agua para eliminar la succinimida. El residuo bruto obtenido por evaporación del disolvente se purificó mediante cromatografía en una columna de ácido silícico utilizando éter dietílico en calidad de agente eluyente.
- 10.
- 15.
20. El derivado de 6-bromo puro así obtenido (0,4 g), disuelto en metanol (40 cc), se redujo en presencia de carbón paladiado al 20% (0,5 g) y carbonato de bario (2,0 g) a 10 atm., lo que dió un rendimiento cuantitativo de metil-2,3,6-trideoxi-3-trifluoroacetamido-alfa-L-ribohexopiranosida (XVIII) según cromatografía de capa delgada en Kieselgel de Merck 60 F<sub>254</sub> utilizando un sistema disolvente de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (6:1 v/v): Rf 0,4. El espectro de r.m.p. se ajusta con la estructura. Esta etapa sigue el procedimiento de S. Hanessian y col. Carbohyd. Res, 1972, 24, 45.
- 25.

Se mezcló una solución de la piranosida (XVIII) (0,24 g) en piridina anhidra (4 cc) con cloruro de p-nitrobenzoilo (0,24 g). Se agitó la mezcla reaccional a

- 02 C durante tres horas y luego se vertió en hielo. El derivado de 4-O-p-nitrobenzoilo así formado se separó por filtración y se lavó hasta neutralidad. Este compuesto, secado sobre pentóxido de fósforo durante varias horas,
5. se disolvió en una mezcla de ácido acético glacial (1 cc) y dicloruro de metileno anhidro (5 cc) y se saturó con cloruro de hidrógeno seco a 0°C. La evaporación de los disolventes dió la 2,3,6-trideoxi-3-N-trifluoroacetil-4-O-p-nitrobenzoil-L-ribohexopiranososa (XIX) (0,22 g): cromatografía de capa delgada sobre Kiesselgel de Merck 60 F<sub>254</sub> utilizando un sistema disolvente de benceno-acetato de etilo (20: 1 v/v) Rf.: 0,18.
- 10.

- Se mezcló una solución de la piranososa (XIX) (0,18 g) en piridina anhidra con cloruro de p-nitrobenzoilo (0,13 g).
- 15.

- Se agitó la mezcla reaccional a 0°C durante tres horas y se vertió en hielo. El derivado de di-p-nitrobenzoilo así formado se separó por filtración y se lavó hasta neutralidad. Se secó este compuesto, se disolvió
20. en diclorometano (5 cc) y se saturó con cloruro de hidrógeno a 0°C. La evaporación del disolvente dió en rendimiento cuantitativo el producto deseado de cloruro de 2,3,6-trideoxi-3-N-trifluoroacetil-4-O-p-nitrobenzoil-alfa-L-ribohexopiranosilo (VIII) que se utilizó sin ulterior purificación.
- 25.

#### EJEMPLO 1

#### 3'-4'-epi-6'-hidroxi-daunomicina (V)

Se mezcló daunomicinona (I; R = metoxilo) (1,1 g) en dicloruro de metileno anhidro (110 cc) con

- 1-cloro-2,3-dideoxi-3-N-trifluoro-acetil-4,6-di-O-p-ni -  
trobenzoil-alfa-L-ribohexopiranososa (III) (0,8 g) en pre-  
sencia de tamiz molecular (12 g, 4 Å Merck) y se trató  
con  $\text{AgSO}_3\text{CF}_3$  (0,37 g) con fuerte agitación durante una no-  
che a la temperatura del ambiente. Se neutralizó la mez-  
cla reaccional con una solución acuosa saturada de bicar-  
bonato sódico. Se separó la fase orgánica y se evaporó  
bajo vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía  
en una columna de ácido silícico utilizando benceno-ace-  
tato de etilo (2:1 v/v) en calidad de sistema eluyente:  
se obtuvo 1,3 g (80%) de producto (II): punto de fusión  
241-243°:  $[\alpha]_D = +214^\circ$  (c = 0,07 en  $\text{CHCl}_3$ ).
- El compuesto (II) (0,7 g), disuelto en acetona  
(45 cc) se mezcló con hidróxido sódico acuoso 0,2 N (50  
cc) a 0°. Al cabo de 40 minutos se ajustó la solución a  
pH 4,5 con cloruro de hidrógeno 1N y se extrajo con clo-  
roformo para eliminar las agliconas. La solución acuosa,  
ajustada a pH 8,5 se extrajo repetidamente con cloroformo.
- Los extractos combinados, secados sobre sulfato  
sódico anhidro, se evaporaron hasta 10 cc. La adición  
de una cantidad estequiométrica de cloruro de hidrógeno  
metanólico anhidro y éter dietílico en exceso dió el  
clorhidrato de 3',4'-epi-6'-hidroxidaunomicina (V) (0,36  
g, 83%): punto de fusión 183-185°;  $[\alpha]_D = +215^\circ$  (c =  
0,02 en MeOH). Cromatografía de capa delgada sobre placa  
HF de Kieselgel de Merck tamponada a pH 7 con fosfato  
M/15 utilizando un sistema disolvente de cloroformo-meta-  
nol-agua (13 : 6 : 1 en volumen): Rf 0,43.

EJEMPLO 2

3',4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina (VI).

El producto final del ejemplo 1 (0,3 g), disuelto en una mezcla de metanol anhidro (4,2 cc) y de dioxano (12 cc), se mezcló con ortoformato de etilo (0,3 cc) y 1,1 cc de una solución de bromo en cloroformo (0,93 g en 10 cc). Al cabo de una hora a la temperatura del ambiente se vertió la mezcla reaccional en una mezcla de éter dietílico (60 cc) y éter de petróleo (40 - 70°, punto de ebullición) (30 cc). Se formó un precipitado rojo que se filtró y lavo con éter dietílico varias veces para eliminar por completo la acidez, y se disolvió en una mezcla de acetona (6 cc) y bromuro de hidrógeno acuoso 0,25 N (6 cc). Al cabo de 15 horas a la temperatura del ambiente se combinó la mezcla con agua (6 cc) y se extrajo con cloroformo repetidamente para separar las agliconas. Se extrajo la fase acuosa con n-butanol hasta que los extractos perdieron el color.

La evaporación del disolvente orgánico bajo vacío hasta pequeño volumen (alrededor de 5 cc) dió el derivado de 14-bromo (0,26 g) en forma de un producto rojo cristalino. Se disolvió el derivado de 14-bromo (0,26 g) en bromuro de hidrógeno acuoso 0,25N (6 cc) y se mezcló con 0,45 g de formato sódico en agua (4,5 cc). Se agitó la mezcla reaccional a la temperatura del ambiente durante 100 horas y luego se evaporó hasta sequedad bajo vacío. Se disolvió el residuo en 120 cc de mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v), se lavó con solución acuosa al 2,5 %

- de bicarbonato sódico (50 cc dos veces). Se extrajo la fase acuosa con cloroformo hasta que perdieron el color los extractos. Se combinó la fase orgánica con los extractos clorofórmicos, se secó sobre carbonato sódico anhidro y se evaporó hasta volumen reducido (unos 30 cc) bajo vacío. La solución roja, ajustada a pH 3,5 (rojo congo) con cloruro de hidrógeno metanólico anhidro, se mezcló con éter dietílico en exceso, lo que dió 3',4'-epi-6'-hidroxiadriamicina (VI) en forma del clorhidrato (0,12 g); punto de fusión 158-160° (desc.:  $[\alpha]_D = +178^\circ$  (C = 0,01 en MeOH); cromatografía de capa delgada sobre placa de Kieselgel de Merck tamponada a pH 7 con fosfato M/15 utilizando un sistema disolvente de cloroformo-metanol-agua (13:6:1 en volumen): Rf 0,32. Esta etapa sigue el procedimiento de la patente británica núm. 1.217.133 de la peticionaria.

### EJEMPLO 3

#### 3',4'-epi-daunomicina (X).

- Daunomicinona (I; R = metoxilo), (0,29 g) en dicloruro de metileno anhidro (30 cc), mezclada con el cloruro de piranosilo (VIII) (0,15 g), se trató con  $AgSO_3CF_3$  (0,1 g) con fuerte agitación durante una noche a la temperatura del ambiente. El producto se elaboró como en el ejemplo 1 y se obtuvo (0,185 g, 65%) del producto protegido VII, punto de fusión 245°; cromatografía de capa delgada sobre placas de Kieselgel de Merck 60 F<sub>254</sub> utilizando un sistema disolvente de benceno-acetato de etilo (2:1 v/v): Rf 0,3. El tratamiento básico para separar los grupos protectores como en el ejemplo 1 dió

- el producto deseado (X) en rendimiento cuantitativo, punto de fusión 180-181°C;  $[\alpha]_D^{20} = + 243,5^{\circ}$  (c = 0,05 MeOH). Cromatografía de capa delgada sobre placas de Kiesselgel de Merck tamponadas a pH 7 con fosfato M/15, utilizando un sistema disolvente de cloroformo-metanol-agua (13:6:1 en volumen): Rf 0,55. Daunomicina bajo las mismas condiciones: Rf 0,43.

EJEMPLO 4

3',4'-epi-adriamicina (XI)

10. Al igual que en el ejemplo 2 se transformó el producto X (0,5 g) en su análogo adriamicina (XI) (0,28 g), punto de fusión 168-170°C;  $[\alpha]_D^{20} = +284^{\circ}$  (c = 0,044 MeOH). Rf = 0,3 utilizando un sistema disolvente de cloroformo-metanol-agua (14:6:1 en volumen).

15. EJEMPLO 5

4-demetoxi-4'-epi-daunomicina (XIII)

- Un gramo de 4-demetoxidaunomicinona (I; R = hidrógeno) (descrita y reivindicada en la solicitud de patente belga de la peticionaria G 395) disuelto en 100 cc de cloruro de metileno anhidro conteniendo 1,2 g de 1-cloro-N,O-trifluoroacetyl-4-epi-daunosamina (descrita y reivindicada en la solicitud de patente belga de la peticionaria núm. 826.848) se trata en presencia de 10 g de tamices moleculares (4 Å Merck) con 0,86 g de  $AgSO_3CF_3$  disuelto en 40 cc de éter dietílico. Al cabo de 20 minutos a la temperatura del ambiente se neutralizó la mezcla reaccional con solución acuosa saturada de  $NaHCO_3$  y se separó la fase orgánica y se evaporó bajo vacío. Se trató el residuo N,O protegido (XII)

- con 200 cc de metanol durante 15 minutos a la temperatura del ambiente y el producto bruto (1,3 g), obtenido por evaporación del disolvente, se cromatografió sobre columna de ácido silícico y utilizando la mezcla cloroformo-benceno-metanol (100:30:4 en volumen) en calidad de agente eluyente: se obtienen 0,55 g de N-trifluoroacetil-4-demetoxi-4'-epi-daunomicina. RMP ( $\text{CDCl}_3$ -DMSO- $d_6$  1:1 v/v) : 1,38 (d,  $\text{CH}_3$ -C-5'), 5,23 (s ancho,  $W_H$  7,5Hz C-7 H), 5,5 (dd,  $J' \sim 2,5$  Hz,  $J'' \sim 1$  Hz, C-1'H), 7,7-8,0 y 8,15-8,50 (dos m simétricos, H aromático), 13,18 y 13,45 (dos s, C-6 OH y C-11 OH); Cromatografía de capa delgada sobre placa de Kieselgel de Merck F<sub>254</sub> utilizando sistema disolvente de cloroformo-benceno-metanol (100:30:4 v/v): Rf 0,17.
- 5.
- 10.
15. Se disolvió el derivado de N-trifluoroacetilo en 5 cc de acetona y se trató a 0<sup>o</sup> con 50 cc de NaOH 01N. Al cabo de 20 minutos se ajustó la solución a pH 8,2 y se extrajo repetidamente con cloroformo. Los extractos combinados, secos y concentrados hasta volumen reducido (unos 15 cc), se acidifican a pH 3,5 (rojo congo) con cloruro de hidrógeno metanólico anhidro; la adición de un exceso de éter dietílico permitió la obtención de 0,35 g de 4-demetoxi-4'-epi-daunomicina (XIII), en forma de clorhidrato: Cromatografía de capa delgada sobre placa de Kieselgel F<sub>254</sub> de Merck utilizando sistema disolvente de cloroformo-metanol-agua (120:20:2) : Rf 0,25.
- 20.
- 25.

EJEMPLO 6

4-demetoxi-4'-epi-adriamicina (XIV)

0,35 g de clorhidrato de 4-demetoxi-4'-epi-

- daunomicina (XIII), disuelto en una mezcla de metanol anhidro (5 cc), dioxano (14 cc), ortoformato de etilo (0,35 cc), se trata con 1,4 cc de una solución de bromo en cloroformo (0,93 g de Br<sub>2</sub> frente a 10 cc de CHCl<sub>3</sub>).
5. Al cabo de 30 minutos a la temperatura del ambiente se vierte la mezcla reaccional en una mezcla de éter etílico (70 cc) y éter de petróleo (35 cc). El precipitado rojo, filtrado y lavado con éter etílico varias veces para eliminar por completo la acidez, se disuelve en una mezcla
10. de acetona (7 cc) y bromuro de hidrógeno acuoso 0,25 N (6 cc). Al cabo de 15 horas a la temperatura del ambiente se adicionan 6 cc de agua a la mezcla y varias extracciones con cloroformo permiten separar las agliconas. Luego se extrae la fase acuosa con n-butanol hasta obtener
15. extractos incoloros. La evaporación del disolvente orgánico bajo vacío hasta pequeño volumen (unos 6 cc) dió 0,26 g de derivado de 14-bromo. Se disuelve este compuesto en 6,7 cc de bromuro de hidrógeno acuoso 0,25 N y se trata con 0,5 g de formato sódico en 5 cc de agua. Se
20. mantiene la mezcla reaccional con agitación a la temperatura del ambiente durante 48 horas, luego se evapora hasta sequedad bajo vacío. El residuo, disuelto en 120 cc de mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v), se lava con solución acuosa al 2,5 % de NaHCO<sub>3</sub> (50 x dos veces).
25. Se extrae la fase acuosa con cloroformo hasta obtener extractos incoloros, se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evapora hasta pequeño volumen (unos 30 cc) bajo vacío. A la solución roja, ajustada a pH 3,5 (rojo congo) con cloruro de hidrógeno metanólico anhidro, se le adiciona éter etílico

- en exceso, lo que dá 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina (XIV), en forma de clorhidrato (0,17 g), que se purifica mediante cromatografía sobre columna de polvo de celulosa utilizando sistema disolvente de cloroformo-metanol-agua (140:20:2 v/v) en calidad de agente eluyente. El producto puro funde con descomposición a 178<sup>o</sup>; Cromatografía de capa delgada sobre placa de Kieselgel de Merck F<sub>254</sub> tamponada a pH7 con fosfato M/15, utilizando sistema disolvente de cloroformo-metanol-agua (130:60:10 v/v): Rf 0,54.

EJEMPLO 7

4'-epi-daunomicina.-

- Se disolvió daunomicinona (I, R = metoxilo) (6 g, 15 mmoles) en dicloruro de metileno anhidro (700 cc) y se mezcló con 1-cloro-N,O-trifluoroacetil-4-epi-daunosamina (2,3 g, 9,4 mmoles) (descrita y reivindicada en la patente belga de la peticionaria n<sup>o</sup> 826.848), y tamiz molecular (20 g, 4 Å Merck).

- Se adicionó con agitación, durante 30 minutos a la temperatura del ambiente, una solución de AgSO<sub>3</sub>CF<sub>3</sub> (2,6 g, 10 mmoles) en éter dietílico (50 cc). Al cabo de dos horas, se filtró la mezcla reaccional, neutralizada con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La fase orgánica separada se evaporó hasta 100 cc y se trató con metanol (300 cc) durante 12 horas a la temperatura del ambiente. El residuo, obtenido por evaporación de los disolventes bajo vacío, se cromatografió sobre una columna de ácido silícico utilizando una mezcla de cloroformo-benceno-metanol (100 : 20 : 4 v/v) en cali-

- dad de agente eluyente. Se obtuvo, además de la daunomicinona sin reaccionar (2,4 g), una mezcla (1,0 g) de daunomicinona y N-trifluoroacetil-4'-epi-daunomicina y 4,4 g de N-trifluoroacetil-4'-epi-daunomicina pura. Este último compuesto (4,4 g) se disolvió en hidróxido sódico 0,1N (260 cc). Al cabo de 20 minutos a la temperatura del ambiente se ajustó la solución a pH 8,2 y se extrajo repetidamente con cloroformo. Los extractos combinados, concentrados hasta pequeño volumen (unos 50 cc), se acidificaron a pH 3,5 (rojo congo) con cloruro de hidrógeno metanólico anhidro y se mezclaron con un exceso de éter dietílico. Se separó por filtración el clorhidrato de 4'-epi-daunomicina precipitado, se lavó con éter dietílico y se secó bajo vacío. El producto (3,0 g) demostró ser idéntico, en todos los aspectos, al descrito y reivindicado en la patente belga nº 826.848 de la peticionaria.

#### EJEMPLO 8

##### Daunomicina.

20. Se disolvió daunomicinona (I, R = metoxilo) (2,4 g, 6 mmoles) en dicloruro de metileno anhidro (300 cc) y se mezcló con 1-cloro-N,O-trifluoro-acetil-daunomicina (1,1 g 3,08 mmoles) (descrita y reivindicada en la patente belga nº 826.848 de la peticionaria) y con tamiz molecular (10 g, 4 Å Merck). Se mezcló la solución con  $\text{AgSO}_3\text{CF}_3$  (0,77 g, 3 mmoles) en éter dietílico anhidro (20 cc) con fuerte agitación durante 30 minutos. Al cabo de dos horas a la temperatura del ambiente se neutralizó la mezcla reaccional con una solución acuosa

- saturada de bicarbonato sódico, se separó la fase orgánica y se evaporó bajo vacío. Se disolvió el residuo en metanol (200 cc) y se mantuvo a la temperatura del ambiente durante cinco horas. El residuo de la separación del disolvente se cromatógrafió sobre una columna de ácido silícico utilizando una mezcla de cloroformo-metanol (100 : 3 v/v) en calidad de agente diluyente. Además de daunomicinona sin reaccionar (1,1 g) se obtuvo 1,2 g de N-trifluoro-acetil-daunomicina. Este compuesto (1,0 g)
5. se disolvió en hidróxido sódico acuoso 0,1N (100 cc) y al cabo de 30 minutos a la temperatura del ambiente se ajustó la solución a pH 8,6 y se extrajo repetidamente con cloroformo. Los extractos combinados, secados sobre sulfato sódico anhidro, se concentraron hasta pequeño
10. volumen y se acidificaron a pH 4,5 con cloruro de hidrógeno metanólico 0,1N para permitir la cristalización del clorhidrato de daunomicina, idéntico en todos los aspectos con el producto obtenido mediante fermentación. El rendimiento resultó prácticamente cuantitativo.
15. Actividad biológica.
- 20.

La actividad antitumoral de los nuevos compuestos del invento, o sea, 3',4'-epi-daunomicina, 3',4'-epi-6'-hidroxidaunomicina, 3',4'-epi-6'-hidroxiadriamicina, 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina, se evaluó sobre diversos tumores transplantados en ratones y en prueba in vitro. Los resultados de estas pruebas se exponen en las tablas siguientes.

25. 3',4'-epi-daunomicina.

Prueba in vitro de la eficacia clónica de células HeLa

Después de tratamiento durante 2, 8 o 24 horas, se sembraron células Hela (200 células por placa) y se determinó el número de colonias ocho días después. La dosis inhibidora ( $DI_{50}$ ) representa la dosis que proporciona una inhibición del 50% de las colonias.

5.

TABLA I

(Actividad sobre células Hela)

Compuesto	$DI_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{cc}$ )		
	2 h.	8 h.	24 h.
Daunomicina	17	8,5	6,8
3',4'-epi-daunomicina	270	220	190

10.

Prueba in vitro sobre la formación de foci con el Moloney Sarcoma Virus (M S V)

15.

El compuesto de prueba se evaluó sobre cultivos fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) infectados con MSV y sobre cultivos similares sin infectar. Al cabo de un tratamiento de tres días se evaluaron las dosis inhibidoras ( $DI_{50}$ ) sobre la proliferación de células en cultivos sin infectar (actividad citotóxica) y sobre la formación de foci por MSV en cultivos infectados (actividad antivírica).

20.

25.

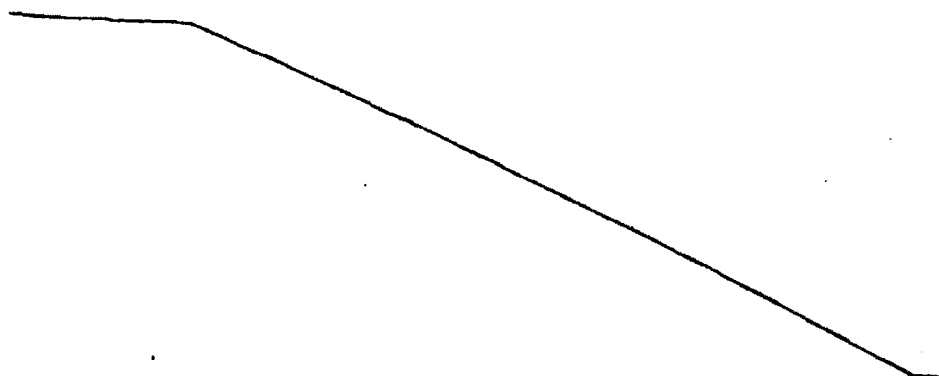


TABLA II

Compuesto	Actividad antivirica DL <sub>50</sub> (ng/cc)	Actividad cito- tóxica DL <sub>50</sub> (ng/cc)
Daunomicina	3	16
3',4'- <u>epi</u> -dauno- micina	45	90

5. La 3',4'-epi-daunomicina muestra menos activi-  
dad citotóxica in "vitro" cuando se compara con la dauno-  
micina.

10. Sin embargo, en animales con tumor exhibe acti-  
vidad notablemente antitumoral, tal como se indica en la  
Tabla 3.

Ascites Leucemia P 388 linfocítica.

15. Se inocularon intraperitonealmente ratones ma-  
cho CDF<sub>1</sub> con 6-10<sup>6</sup> células de leucemia/ratón y luego se  
trataron intraperitonealmente del primer al noveno día  
después de la inoculación con diferentes dosis del com-  
puesto bajo examen. Evaluación al veinteavo día.

20. TABLA 3

Dosis (mg/ kg)	T o x (supervi- vientes al 5º día)	Curas	Diferen- cia de peso	Evaluación tumoral, tiem- po de super- vivencia me- dio(días)(a)	T/C %
25	6/6	1	- 0,8	28	231
25. 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

(a) - Control = 12,1 días

3',4'-epi-6'-hidroxiadriamicina.

El compuesto exhibe significativa actividad in "vivo" tal como se expone en la tabla 4, indicando el efecto del fármaco sobre ratones con leucemia L 1210.

5. Se inocularon intraperitonealmente ratones BDF imbricados con  $1,10^5$  célula de leucemia/ratón y luego se trataron con el compuesto bajo examen, Un solo tratamiento i.p. el primer día.

TABLA 4

10. (Actividad sobre leucemia L 1210)

Compuesto	Dosis (mg/kg)	T/C %
3'4'-epi-6'-hidroxiadriamicina	7,5	150
	11,5	150
	17,25	150

15.

3',4'-epi-6'-hidroxiadriamicina

El compuesto es activo en tumores experimentales.

20. En la Tabla 5 se expone su actividad sobre Ascites Sarcoma 180 en ratones.

La prueba se llevó a cabo sobre grupos de 10 ratones (suizos CD1). El compuesto bajo examen se administró intraperitonealmente con dosis variables a los animales de prueba un día después de la inoculación intraperitoneal con  $1,10^6$  células de tumor/ratón.

25.

El tiempo medio de supervivencia se expresa como porcentaje del tiempo de supervivencia de los animales sin tratar, que se designa arbitrariamente como

del 100%. Se indica también el número de supervivientes de larga vida.

TABLA 5

(Actividad sobre Ascites Sarcoma 180)

5.	Compuesto	Dosis (ng/kg)	T/C %	LTS
		3	123	1/10
	3'-4'-epi-6'-hidroxi-adriamicina	4,5	226	2/10
		6,7	138	
10.	adriamicina	10,5	138	
		4,5	250	1/10

4-demetoxi-4'-epi-adriamicina.

15. El compuesto se probó en comparación con la adriamicina sobre diversos sistemas *in vitro* y tumores de ratón experimentales. Los resultados in vitro se exponen en la Tabla 6. El compuesto probado resultó claramente más activo que la adriamicina.

20. En las tablas 7, 8 y 9 se exponen los resultados obtenidos sobre tumores de ratón experimentales.

Con cualquier sistema probado, la 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina exhibe una notable actividad antitumoral con dosis 10 veces inferiores a las de adriamicina.

25. Sobre leucemias L 1210 y P 388, la actividad antitumoral con la dosis óptima (no tóxica) resultó comparable con la de adriamicina. Sobre el sarcoma sólido 180 la inhibición del desarrollo del tumor el onceavo día resultó ligeramente inferior que con la adriamicina, con dosis equitóxicas. Sobre leucemia Gross (que es un

tumor sistémico transplantado i.v.); el aumento de vida de los ratones tratados con los dos compuestos con dosis equitóxicas resultó similar.

5. Se puede concluir diciendo que la 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina exhibe una actividad antitumoral elevada en el ratón, similar a la adriamicina, con dosis 10 veces inferiores.

TABLA 6

10. Efecto in vitro de la 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina, en comparación con la adriamicina, DL<sub>50</sub> (ng/cc).

C o m p u e s t o	HeLa <sup>a</sup>		MSV <sup>b</sup>	MEF <sup>c</sup>	
	2 <sup>a</sup>	8	24	72	72
Adriamicina	125	28	12,5	0,01	0,026
15. 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina	0,35	0,1	0,03	<0,003	<0,003

- a) eficacia clónica de células HeLa  
 b) inhibición de formación de foci por MSV  
 c) inhibición de proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón.
- 20.

TABLA 7

Actividad de la 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina sobre leucemias ascíticas. Tratamiento i.p. el día 1.

Leucemia	Compuesto	Dosis mg/kg	T/C <sup>a</sup> %	ITS <sup>b</sup>	Muertes tóxicas
25. L 1210	Adriamicina	2,5	155	4/11	0/11
		5	166	1/11	1/11
		10	155	3/11	7/11
	4-demetoxi-4'-epi-adriamicina	0,25	155	0/11	0/11
		0,5	166	2/11	0/11
		1	133	0/11	11/11

TABLA 7 (Cont.)

Leucemia	Compuesto	Dosis mg/kg	T/C <sup>a</sup> %	LTS <sup>b</sup>	Muertes tóxicas
5. P 388	Adriamicina	2,5	150	0/10	0/10
		5	162	0/10	0/10
		10	200	1/10	0/10
	4-demetoxi-4'- -epi-adriami- cina	0,25	143	0/10	0/10
		0,5	162	1/10	1/10
		1	162	0/10	8/10

10. a) Tiempo medio de supervivencia, % sobre testigos sin tratar
- b) Supervivientes de vida prolongada en 60 días.

TABLA 8

15. Actividad de la 4 -demetoxi-4'-epi-adriamicina sobre sarcoma sólido 180. Tratamiento i.v. en los días 1 a 5. Datos medios de 2 experimentos.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	T/C <sup>a</sup> %	Muertes tóxicas
Adriamicina	2	22,2	3/19
	2,5	13,5	11/18
20. 4-demetoxi-4'-epi- -adriamicina	0,06	87,3	0/10
	0,12	85,1	2/16
	0,25	41,9	4/19
	0,5	-	9/9

25. a) Peso del tumor el día 11, % sobre testigos sin tratar.

TABLA 9

Actividad de la 4-demetoxi-4'-epi-adriamicina sobre leucemia Gross. Tratamiento i.v. los días 1 a 3.

Datos medios de 2 experimentos<sup>a</sup>.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	T/C %	ITS	Muertes tóxicas
5. Adriamicina	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-demetoxi-4'-epi-adriamicina	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

10. a) véanse leyendas en tabla 7.

REIVINDICACIONES

15. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente inglesa núm. 18.098/75 del 30 de abril de 1975.

20. 1.- Un procedimiento para la preparación de compuestos glicosídicos, de la serie antraciclina, cuyo procedimiento comprende hacer reaccionar daunomicinona o 4-demetoxi-daunomicinona con un derivado 1-halógeno protegido apropiado de 3,4-epi-6-hidroxi-daunosamina, 3,4-epi-daunosamina o 4-epi-daunosamina en un disolvente orgánico inerte, tal como cloroformo o cloruro de metileno, en presencia de un catalizador de sal argéntica soluble, tal como trifluoro-metan-sulfonato de plata, y  
 25. de tamices moleculares en calidad de agentes deshidratantes para formar los derivados protegidos de dichos compuestos glicosídicos, separar los grupos protectores de dichos compuestos glicosídicos mediante hidrólisis alcalina suave con hidróxido sódico 0,1N para obtener

por último, los productos deseados que se aislan en forma de clorhidratos.

5. 2.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el catalizador de sal argéntica es trifluorometan-sulfonato de plata ( $\text{AgSO}_3\text{CF}_3$ ).

3.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el disolvente orgánico es cloroformo o cloruro de metileno.

10. 4.- Un procedimiento para la preparación de compuestos glicosídicos de la serie antraciclina.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 33 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

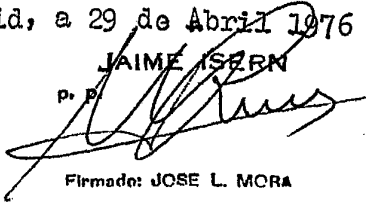
15.

Madrid, a 29 de Abril 1976

p.a.

JAIME ISERN

p. p.



Firmado: JOSE L. MORA