



(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2985/86

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : C07H 15/252  
//A61K 31/71

(22) Anmeldetag: 10.11.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1989

(45) Ausgabetag: 11. 6.1990

(30) Priorität:

19.11.1985 GB 8528440 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

FARMITALIA CARLO ERBA S.P.A.  
I-20159 MAILAND (IT).

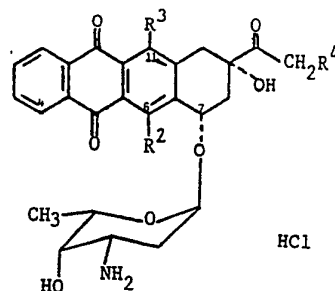
(72) Erfinder:

ANGELUCCI FRANCESCO  
MAILAND (IT).  
GIGLI MAURO  
MERAN (IT).  
PENCO SERGIO  
MAILAND (IT).  
GIULIANI FERNANDO  
CASSINA DE PECCHI (IT).

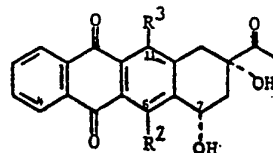
(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON NEUEN ANTHRACYCLINGLYKOSIDEN

(57) Anthracyclinglykoside der Formel (A') worin eine der Gruppen  $R_2$  und  $R_3$  Hydroxy ist und die andere Nitro darstellt und  $R_4$  pharmazeutisch annehmbare Salze hievon werden durch Kondensieren eines Aglykons der Formel (B) mit 1-Chlor-N,O-di(trifluoracetyl)-daunosamin hergestellt. Diese Verbindungen besitzen Antitumorwirksamkeit.

Formel A':



Formel B:



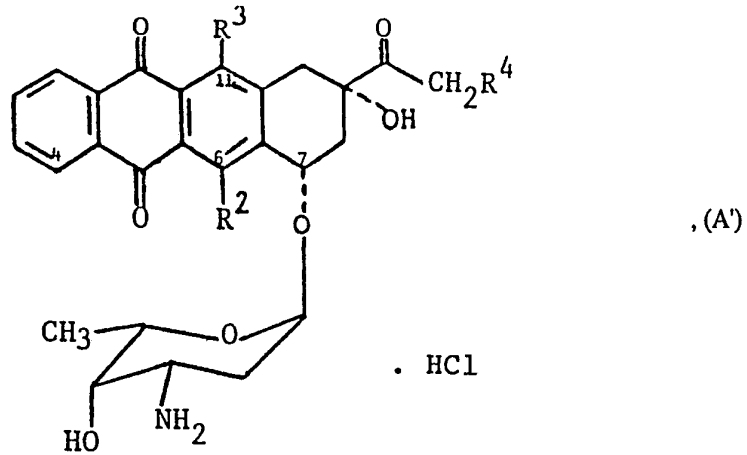
Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von neuen Anthracyclinglykosiden der allgemeinen Formel

5

10

15

20



25

worin eine der Gruppen  $R_2$  und  $R_3$  Hydroxy ist und die andere Nitro darstellt und  $R_4$  Wasserstoff oder Hydroxy ist, und deren pharmazeutisch annehmbaren Salzen, die Antitumorwirksamkeit aufweisen.

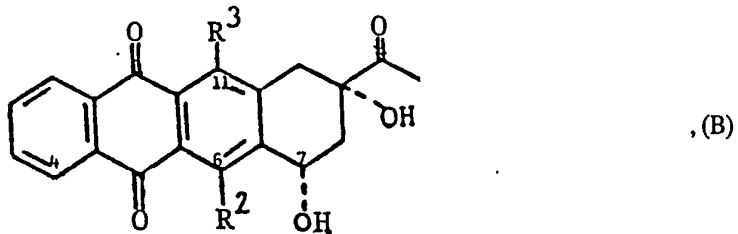
Bevorzugte Verbindungen sind die Hydrochloride der Verbindungen der Formel (A).

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man ein Aglykon der allgemeinen Formel

30

35

40



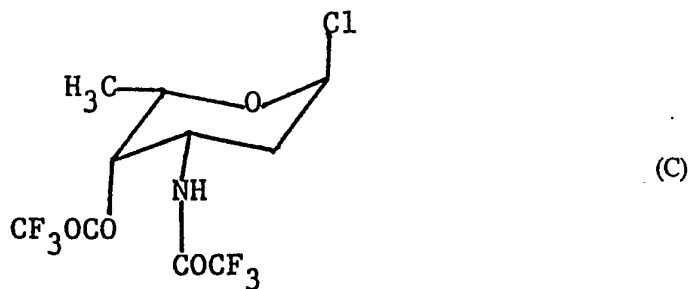
45

worin  $R^2$  und  $R^3$  die obige Bedeutung haben, in wasserfreiem Methylendichlorid unter einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur und in Anwesenheit von Silbertrifluormethansulfonat mit 1-Chlor-N,O-di-(trifluoracetyl)-daunosamin der Formel

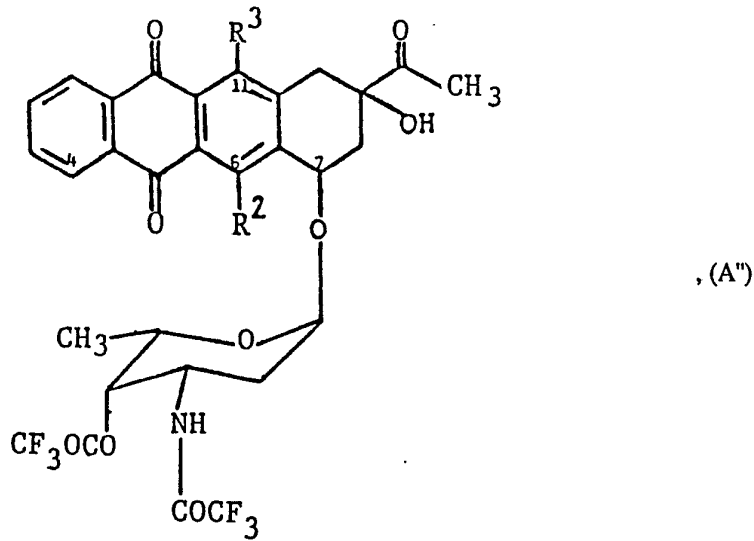
50

55

60



unter Bildung einer diastereomeren Mischung von 7(S),9(S)- und 7(R),9(R)-Anthracyclinglykosiden der Formel



worin  $R^2$  und  $R^3$  die obige Bedeutung haben, kondensiert; die O-Trifluoracetylenschutzgruppe durch Behandlung mit Methanol bei Raumtemperatur über Nacht entfernt; die 7(S),9(S)-N-trifluoracetylierten Glykoside von den 7(R),9(R)-Analoga durch Chromatographie auf einer Silikagelsäule unter Verwendung einer Mischung von Methylendichlorid-Äthylacetat-Essigsäure (90 : 10 : 1 V/V) als Eluiersystem trennt; die N-Trifluoracetylenschutzgruppe von den so erhaltenen reinen 7(S),9(S)-Derivaten durch milde alkalische Hydrolyse mit 0,1 n Natriumhydroxid entfernt, die so erhaltenen freien Basen als ihre Hydrochloride der Formel (A') ( $R_4 = H$ ) durch Behandlung mit methanolischem Chlorwasserstoff isoliert und gegebenenfalls die so erhaltenen Verbindungen durch Bromieren in Stellung 14 und anschließende Behandlung der erhaltenen 14-Bromderivate mit wässriger Natriumformiatlösung in ihre Doxorubicinanaloga der Formel (A'), worin  $R^4$  Hydroxy ist, überführt, die als die betreffenden Hydrochloride isoliert werden.

Es werden somit nach Entfernen der Trifluoracetylgruppen des Zuckerteils, zweckmäßigerweise durch Hydrolyse, die analogen Daunorubicinglykoside erhalten. Die Doxorubicinanaloga werden aus den entsprechenden Daunorubicinanaloga über 14-Bromderivate nach dem in der US-PS 3 803 124 beschriebenen Verfahren erhalten.

Das Verfahren zur Herstellung der Ausgangsprodukte der neuen Anthracycline beruht auf der direkten Nitrierung des Ringes B von Anthracyclinzwischenprodukten, die in p-Stellung zum Reaktionszentrum eine Hydroxylgruppe aufweisen. Die Einführung der Nitrogruppe wird im allgemeinen unter Verwendung von Trifluoressigsäure/Ammoniumnitratreagens bewirkt. Die Reaktion muß in Abwesenheit von Sauerstoff und Feuchtigkeit durchgeführt werden, da sonst die Reagentien als Oxidationsmittel wirken, was die Einführung einer aromatischen Hydroxylgruppe anstelle der Nitrogruppe bewirken und dann die entsprechenden Oxidationsprodukte ergeben würde (siehe J.V. Crivello, J.Org.Chem. 46, 3056, 1981). Die erhaltene Verbindung ist ein Aglykon der Formel (B).

Die allgemeine Syntheseroute zum Herstellen der Ausgangsprodukte für die Herstellung der 6-Nitro- und 11-Nitroanthracycline der Formel (B) ist in den nachstehenden Schemata I bzw. II angegeben.

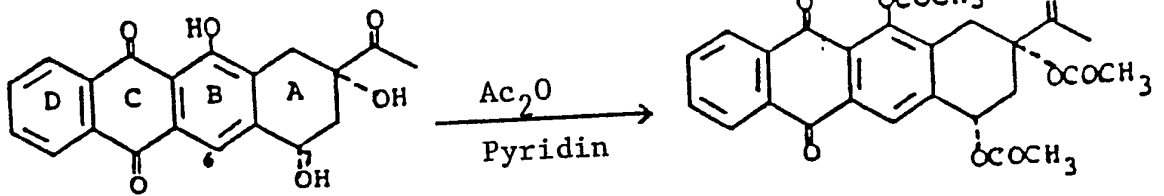
Sie beruht auf der Verwendung von ( $\pm$ )-4-Demethoxy-6-desoxydaunomycinon (1) (DE-OS 3 219 380) für die 6-Nitroanthracyclinone und von ( $\pm$ )-4-Demethoxy-11-desoxydaunomycinon (6) (DE-OS 3 219 380) für die 11-Nitroanthracyclinone als Ausgangsmaterial.

SCHEMA I

5

10

15

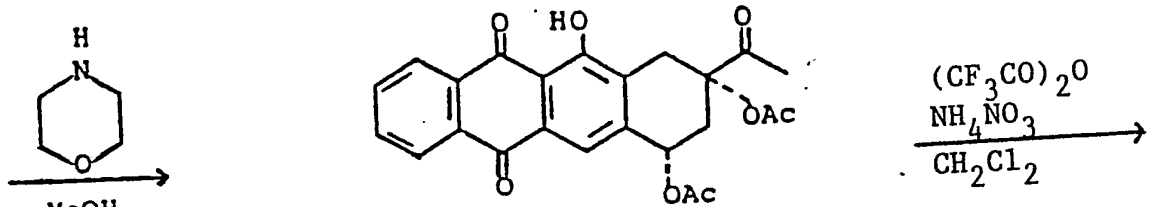


20

(1)

(2)

25

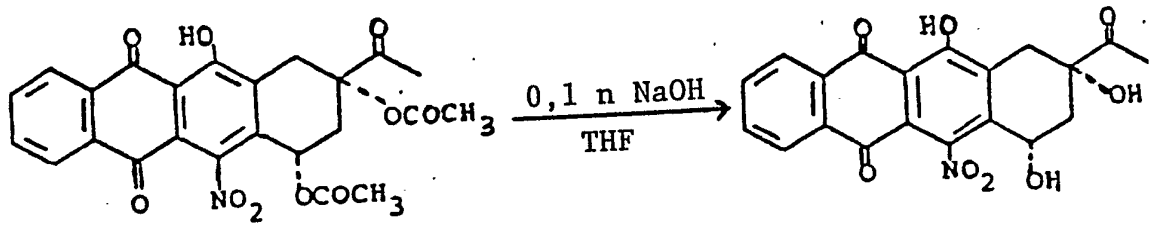


30

(3)

35

40



45

(4)

(5)

50

55

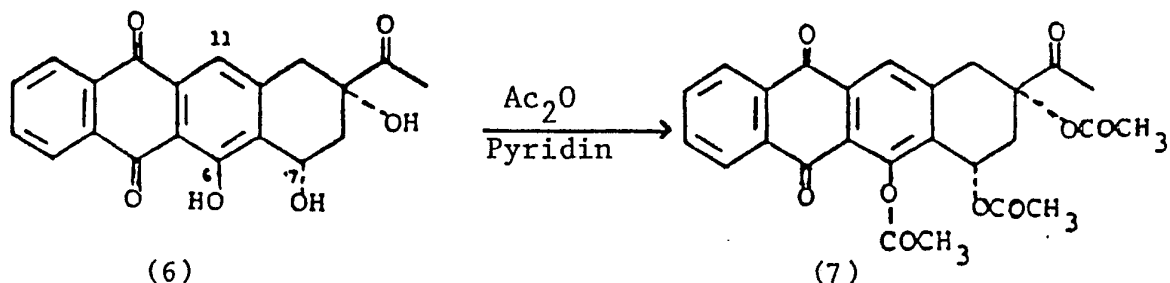
60

SCHEMA II

5

10

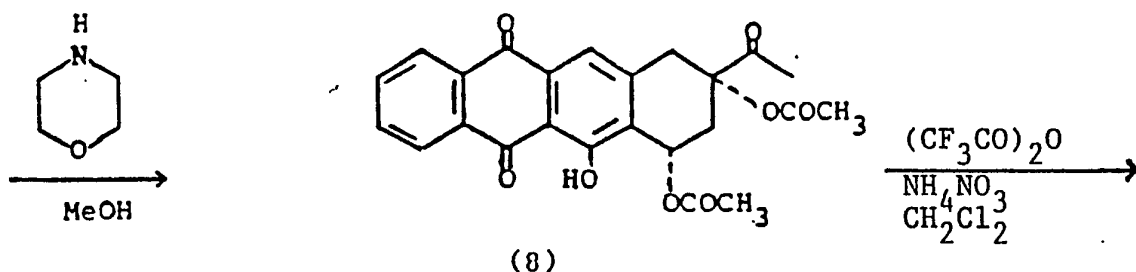
15



20

25

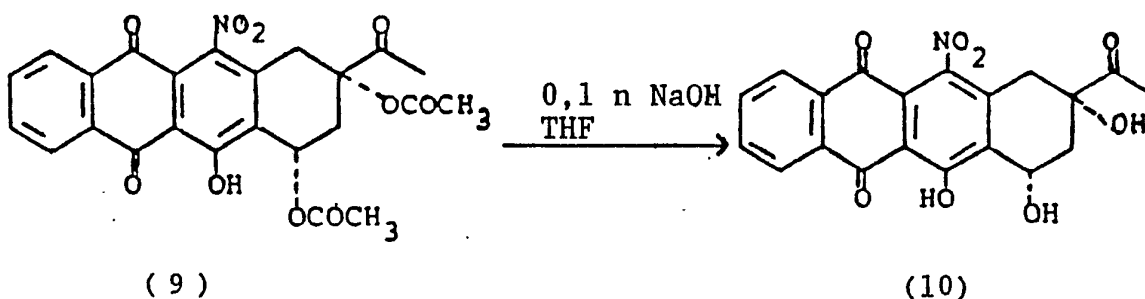
30



35

40

45



50

Um die Nitratbildung der Gruppen C-7-OH und C-9-OH zu vermeiden, werden diese Hydroxylgruppen geschützt, z. B. als Acetate. Dies kann durch Behandlung der Verbindungen (1) und (6) mit Acetanhydrid in Anwesenheit von Pyridin bei 85 bis 90°C zum Acylieren aller freien Hydroxygruppen erzielt werden, wobei die Verbindung (2) bzw. (7) erhalten wird, gefolgt von der selektiven Hydrolyse dieser aromatischen Triacetate durch Verwendung von Morpholin als Base, wobei die Verbindungen (3) und (8) in fast quantitativen Ausbeuten erhalten werden. Vorzugsweise wird in Morpholin in Methanol bei 40°C während 5 h verwendet.

Die Nitrierung wird typischerweise mit einem Überschuß an Trifluoracethanhydrid/Ammoniumnitrat in Methylchlorid durchgeführt. Die Nitrierung kann bei Raumtemperatur unter einer Stickstoffatmosphäre und unter heftigem Rühren durchgeführt werden. Dies kann die entsprechenden Nitroderivate (4) und (9) in Ausbeuten von beispielsweise 70 % ergeben.

Schließlich ergibt milde alkalische Hydrolyse mit 0,1 n NaOH in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur und unter einer Stickstoffatmosphäre die Aglykone

(±)4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitrodaunomycinon (5)

(±)4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitrodaunomycinon (10)

5 Die Aglykone können gegebenenfalls durch Chromatographie auf Silikagel gereinigt werden.

10 So können die Aglykone der Formel (B) erfindungsgemäß durch selektives Schützen der C-7- und C-9-Hydroxygruppen von (±)-4-Demethoxy-6-desoxydaunomycinon oder (±)-4-Demethoxy-11-desoxydaunomycinon, Nitrieren des Ringes B der so gebildeten Verbindung an der p-Stellung in bezug auf den Hydroxysubstituenten am Ring B, und Entfernen der C-7- und C-9-Hydroxyschutzgruppen, wobei ein Aglykon der Formel (B) erhalten wird, hergestellt werden.

15 Die entsprechenden Glykoside werden durch Koppeln der Verbindungen (5) und (10) mit dem 1-Chlor-N,O-di-(trifluoracetyl)-daunosamin, vorzugsweise in Anwesenheit von Silbertrifluormethansulfonat in wasserfreiem Methyldichlorid unter einer Stickstoffatmosphäre, hergestellt. Dies ergibt nach Hydrolyse der O-Trifluoracetylgruppe durch Behandlung mit Methanol die Alpha-Glykoside als eine Mischung von Diastereoisomeren 7(S):9(S) und 7(R):9(R) N-trifluoracetyliert.

20 Nach Trennung, z. B. durch Chromatographie auf Silikagel, werden die 7(S):9(S)-Glykoside milder alkalischer Hydrolyse unterworfen, um die N-Trifluoracetylgruppe zu entfernen, wobei die entsprechenden Daunorubicinanaloga erhalten werden. Diese können durch Behandlung mit Chlorwasserstoff in Methanol als ihre Hydrochloride isoliert und, wenn gewünscht, durch 14-Bromierung und Behandlung mit wässrigem Natriumformiat nach dem in der US-PS 3 803 124 beschriebenen Verfahren in die entsprechenden Doxorubicinanaloga überführt werden. Die Doxorubicinanaloga können wie oben in Form ihrer Hydrochloride isoliert werden.

25 Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie hierauf zu beschränken. Zunächst wird in den folgenden Herstellungsweisen die Herstellung von Ausgangsverbindungen beschrieben.

Herstellungsweise 1: (+)-4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitrodaunomycinon

(a) Herstellung von 4-Demethoxy-6-desoxy-7,9,11-triacetyldaunomycinon

30 1,7 g (4,8 mM) 4-Demethoxy-6-desoxy-daunomycinon wurden unter Rühren mit 25 ml Acetanhydrid und 25 ml Pyridin auf 90°C erhitzt. Nach 2 h wurde die Reaktionsmischung in Eis/Wasser gegossen und 30 min unter Rühren stehen gelassen. Das feste Material wurde filtriert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und aus MeOH kristallisiert, wobei 2,19 g 4-Demethoxy-6-desoxy-7,9,11-triacetyldaunomycinon in einer Ausbeute von 94 % erhalten wurden, Fp. 225 - 226°C.

35 IR (KBr): 1770 (aromatischer Ester), 1740 (aliphatischer Ester), 1720 (aliphatisches Keton), 1675 (aromatisches Keton), 1590 (Ar) cm<sup>-1</sup>.

UV (MeOH) Lambda max: 210, 258, 334 nm.

40 FD-MS: m/z 478 (100, M<sup>+</sup>).

PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), u. a.: Delta 2,11, 2,01 (s, 6H, OCOCH<sub>3</sub>), 2,22 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,52 (s, 3H, Ar-OCOCH<sub>3</sub>), 2,4-3,3 (m, 4H), 6,17 (breit, 1H, 7-H), 7,7-8,25 (m, 5H).

(b) Herstellung von 4-Demethoxy-6-desoxy-7,9-diacetyldaunomycinon

45 2,1 g (4,5 mM) 4-Demethoxy-6-desoxy-7,9,11-triacetyldaunomycinon wurden in 220 ml MeOH und 110 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Eine Lösung von 1n Morpholin in MeOH (18 ml, 4 Äqu.) wurde zugesetzt und die Lösung 5 h bei 40°C stehen gelassen. Nach Neutralisation mit wässriger n HCl wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus MeOH kristallisiert, wobei 1,7 g 4-Demethoxy-6-desoxy-7,9-diacetyldaunomycinon in einer Ausbeute von 90 % erhalten wurden, Fp. 265°C (Zers.).

50 IR (KBr): 3440 (phenolisches OH), 1745, 1720, 1670 (kein cheliertes Chinon), 1630 (cheliertes Chinon), 1590 cm<sup>-1</sup>.

55 FD-MS: m/z 436 (M<sup>+</sup>).

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 204, 226, 258, 336, 386, 404 nm.

PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), u. a.: Delta 2,09, 2,04 (s, 6H, OCOCH<sub>3</sub>), 2,25 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,54-3,40 (m, 4H), 6,19 (dd, J = 3,1, 5,6 Hz, 1H, 7-H), 7,77-8,35 (m, 5H), 13,11 (s, 1H, 11-OH).

(c) Herstellung von 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitro-7,9-diacetyl-daunomycinon

Zu einer Mischung von 1,6 g (3,66 mM) 4-Demethoxy-6-desoxy-7,9-diacetyl-daunomycinon + 1,6 g (20 mM)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  + 18 ml  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$  wurden unter Stickstoffatmosphäre und heftigem Rühren bei Raumtemperatur 300 ml wasserfreies  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zugesetzt. Nach 90 min wurden 3 l MeOH zugesetzt; es wurde ein gelber Niederschlag erhalten, der filtriert und mit frischem MeOH und Äthyläther gewaschen wurde. Nach Trocknen wurden 1,23 g 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitro-7,9-diacetyl-daunomycinon in einer Ausbeute von 70 % erhalten, Fp. 263 - 264°C.

IR (KBr): 3470, 1745, 1720, 1675, 1635, 1585, 1540 ( $\text{Ar-NO}_2$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

FD-MS: m/z 481 ( $\text{M}^+$ ).

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 216, 260, 338, 400 nm.

PMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), u. a.: Delta 2,04, 2,00 (s, 6H,  $\text{OCOCH}_3$ ), 2,24 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2,43-3,51 (m, 4H), 6,22 (dd, J = 2,3, 5,4 Hz, 1H, 7-H), 7,8-8,4 (m, 4H), 13,59 (s, 1H, 11-OH).

(d) 1,1 g (2,3 mM) 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitro-7,9-diacetyl-daunomycinon wurden in 220 ml THF gelöst. 220 ml 0,1 n NaOH wurden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre und unter Rühren zugesetzt. Nach 1 h wurde die Lösung mit n HCl auf pH ca. 7 eingestellt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst, die Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}$  bis zur Neutralität gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Nach Säulenchromatographie über Silikagel wurden 0,77 g ( $\pm$ )-4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitro-daunomycinon in einer Ausbeute von 90 % erhalten, Fp. 233 - 234°C (Zers.).

IR (KBr): 3570, 3470, 1710, 1680, 1630, 1585, 1535  $\text{cm}^{-1}$ .

FD-MS: m/z 398 ( $\text{MH}^+$ ), 397 ( $\text{M}^+$ ).

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 216, 260, 341, 384, 401 nm.

PMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), u. a.: Delta 2,23-3,22 (m, 4H), 2,41 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 4,02 (d, J = 8,4 Hz, 1H, 7-OH), 4,67 (s, 1H, 9-OH), 5,02 (ddd, J = 2,3, 4,3, 8,4 Hz, 1H, 7-H), 7,8-8,4 (m, 4H), 13,51 (s, 1H-11-OH).

Herstellungsweise 2:

4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitro-daunomycinon

(a) Herstellung von 4-Demethoxy-6,7,9-triacetyl-11-desoxy-daunomycinon

0,7 g (2 mM) 4-Demethoxy-11-desoxy-daunomycinon wurden mit 10 ml Acetanhydrid und 10 ml Pyridin bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wurde die Reaktionsmischung wie in Herstellungsweise 1 (a) aufgearbeitet, wobei 0,88 g 4-Demethoxy-6,7,9-triacetyl-11-desoxy-daunomycinon in einer Ausbeute von 93 % erhalten wurden, Fp. 220 - 222°C.

IR (KBr): 1780, 1730, 1720, 1675, 1590  $\text{cm}^{-1}$ .

UV (MeOH) Lambda max: 210, 258, 334 nm.

FD-MS: m/z 479 ( $\text{MH}^+$ ), 478 ( $\text{M}^+$ ).

PMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , T = 40°C), u. a.: Delta 2,03 (s, 6H,  $\text{OCOCH}_3$ ), 2,23 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2,44 (s, 3H,  $\text{Ar-OCOCH}_3$ ), 2,44-3,39 (m, 4H), 6,46 (breit, 1H, 7-H), 7,75-8,3 (m, 5H).

(b) Herstellung von 4-Demethoxy-7,9-diacetyl-11-desoxy-daunomycinon

0,83 g (1,74 mM) 4-Demethoxy-6,7,9-triacetyl-11-desoxy-daunomycinon wurden auf gleiche Weise, wie in Herstellungsweise 1 (b) beschrieben, behandelt, wobei 0,67 g 4-Demethoxy-7,9-diacetyl-11-desoxy-daunomycinon in einer Ausbeute von 88 % erhalten wurden, Fp. 244°C.

IR (KBr): 3430, 1730, 1665, 1640, 1590  $\text{cm}^{-1}$ .

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 208, 226, 254, 334, 384, 402 nm.

FD-MS: m/z 436 (M<sup>+</sup>).

- 5 PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), u. a.: Delta 2,04 (s, 6H, OCOCH<sub>3</sub>), 2,24 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,40-3,30 (m, 4H), 6,47 (dd, J = 2,0, 5,5 Hz, 1H, 7-H), 7,8 - 8,3 (m, 5H), 13,06 (s, 1H, 6-OH).

(c) Herstellung von 4-Demethoxy-7,9-diacetyl-11-desoxy-11-nitrodaunomycinon

- 10 0,62 g (1,42 mM) 4-Demethoxy-7,9-diacetyl-11-desoxydaunomycinon wurden mit 0,57 g (7,1 mM) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> und 4 ml (CF<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O in 90 ml wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> behandelt. Unter Anwendung von Herstellungsweise 1 (c) wurden 0,5 g 4-Demethoxy-7,9-diacetyl-11-desoxy-11-nitrodaunomycinon in einer Ausbeute von 73 % erhalten, Fp. 272 - 274°C (Zers.).

IR (KBr): 3450, 1740, 1710, 1680, 1635, 1590, 1545 (Ar-NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

15

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 208, 254, 334, 400 nm.

FD-MS: m/z 481 (M<sup>+</sup>).

- 20 PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), u. a.: Delta 2,06, 2,04 (s, 6H, OCOCH<sub>3</sub>), 2,2 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,42-3,03 (m, 4H), 6,50 (dd, J = 1,7, 5,5 Hz, 1H, 7-H), 7,8 - 8,4 (m, 4H), 13,50 (s, 1H, 6-OH).

(d) 0,45 g (0,94 mM) 4-Demethoxy-7,9-diacetyl-11-desoxy-11-nitrodaunomycinon wurden mit 0,1 n NaOH, wie in Herstellungsweise 1 (d) beschrieben, behandelt, wobei 0,34 g 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitrodaunomycinon in einer Ausbeute von 91 % erhalten wurden, Fp. 231 - 233°C.

25

IR (KBr): 3550, 1710, 1675, 1630, 1540 cm<sup>-1</sup>.

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 210, 214, 218, 250, 326, 336, 400 nm.

30

FD-MS: m/z 397 (M<sup>+</sup>).

HRMS berechnet [C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>8</sub>]: 397,0798 (gefunden: 397,0808).

- 35 PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), u. a.: Delta 2,18-3,1 (m, 4H), 2,38 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3,85 (d, J = 6,2 Hz, 1H, 7-OH), 4,55 (s, 1H, 9-OH), 5,36 (ddd, J = 1,8, 4,8, 6,2 Hz, 1H, 7-H), 7,8-8,4 (m, 4H), 13,7 (s, 1H, 6-OH).

Beispiel 1: Herstellung von 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitro-N-trifluoracetyl-daunorubicin

- 40 Zu einer gekühlten (15°C) Lösung von 0,7 g (1,76 mM) des racemischen 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitrodaunomycinons in 140 ml wasserfreiem Methylenchlorid wurden gleichzeitig und rasch unter heftigem Rühren und Stickstoffeinblasen 1,88 g (5,28 mM) 1-Chlor-N,O-di(trifluoracetyl)-daunosamin (hergestellt gemäß dem Verfahren in "Cancer Chemotherapy Reports", Teil 3, Bd. 6, Nr. 2, S. 123) in 40 ml wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 1,4 g (5,28 mM) Silbertrifluormethansulfonat in 40 ml wasserfreiem Diäthyläther zugesetzt. Nach 20 min wurden 100 ml gesättigte wässrige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugesetzt und die Mischung 10 min lang gerührt. Die Mischung wurde über ein Filtrierhilfsmittel (Celite) filtriert, die organische Schicht abgetrennt, mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

- 45 Das gelbe Material wurde mit 300 ml MeOH gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, wobei die O-Trifluoracetylgruppe entfernt wurde. Der aus dem Abdampfen des Lösungsmittels resultierende Rückstand wurde auf Silikagel unter Verwendung von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-ÄtOAc (90 : 10 : 1, V/V) als Eluiersystem chromatographiert, wobei 0,43 g Alpha-Glykoside 7(S):9(S) (Ausbeute 39 %) und 0,43 g 7(R):9(R) (Ausbeute 39 %) erhalten wurden.

7(S):9(S): Fp. 245 - 246°C.

55

IR (KBr): 3470, 3450, 1720, 1700 (N-Trifluoracetyl), 1680, 1635, 1590, 1535 cm<sup>-1</sup>.



FD-MS: m/z 623 (MH<sup>+</sup>).

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 208, 260, 341, 384, 401 nm.

5 [Alpha]<sub>D</sub><sup>25°</sup> = + 337 (c = 0,05541 in MeOH).

CD (MeOH): ΔEpsilon 226 nm = + 19,31, ΔEpsilon 270 nm = -9,94, ΔEpsilon 292 nm = +5,67, ΔEpsilon 340 nm = +7,68.

10 PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Delta 1,24 (d, J = 6,8 Hz, 3H, 5'-CH<sub>3</sub>),  
1,82 (td, J = 4,1, 12,4, 12,4 Hz, 1H, 2'<sub>ax</sub>-H), 1,94 (d, J = 8,2 Hz, 1H, 4'-OH),  
1,95 (dd, J = 5,0, 12,4 Hz, 1H, 2'<sub>eq</sub>-H), 2,15 (dd, J = 4,3, 15,1 Hz, 1H, 8<sub>ax</sub>-H), 2,34 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>),  
2,48 (ddd, J = 1,8, 2,3, 15,1 Hz, 1H, 8<sub>eq</sub>-H), 3,10 (d, J = 18,7 Hz, 1H, 10<sub>ax</sub>-H),  
3,27 (dd, J = 1,8, 18,7 Hz, 1H, 10<sub>eq</sub>-H), 3,65 (dd, J = 2,7, 8,2 Hz, 1H, 4'-H), 4,1-4,3 (m, 1H, 3'-H),  
15 4,30 (q, J = 6,8 Hz, 1H, 5'-H), 5,00 (d, J = 4,1 Hz, 1H, 1'-H), 5,11 (dd, J = 2,3, 4,3 Hz, 1H, 7-H),  
6,61 (d, J = 8,0 Hz, 1H, NHCOCF<sub>3</sub>), 7,8-7,9 (m, 2H, 2-H, 3-H), 8,2-8,4 (m, 2H, 1-H, 4-H),  
13,55 (s, 1H, 11-OH).

20 7(R):9(R): Fp. 145 - 146°C

FD-MS: m/z 623 (10, MH<sup>+</sup>); 579 (100)

CD (MeOH): ΔEpsilon 226 nm = -10,9, ΔEpsilon 271 nm = + 7,26, ΔEpsilon 291 nm = -0,27, ΔEpsilon 300 nm = + 0,56, ΔEpsilon 340 nm = -5,1

25 [Alpha]<sub>D</sub><sup>25°</sup> = -293 (c = 0,0635 in MeOH)

PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), u. a.: Delta 5,14 (t, J = 30 Hz, 1H, 7-H), 5,27 (m, 1H, 1'-H).

30 Beispiel 2: Herstellung von 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitro-daunorubicin-hydrochlorid

0,130 g (0,2 mM) 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitro-N-trifluoracetyldaunorubicin wurden in 6 ml Aceton gelöst. Bei 0°C wurden unter einer Stickstoffatmosphäre und unter Rühren 60 ml 1n NaOH zugesetzt. Nach 2 h wurde das Aceton im Vakuum entfernt und der pH mit 0,1n HCl auf 4,5 eingestellt.

35 Die wässrige Lösung wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert, mit 0,1n NaOH auf pH ca. 6,5 bis 7,0 eingestellt und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die organische Schicht wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wurde mit 5 ml MeOH gelöst, mit einigen Tropfen MeOH/HCl-Lösung angesäuert und das Hydrochlorid durch Zusatz von Diäthyläther und n-Hexan ausgefällt. Das feste Material wurde filtriert, mit Diäthyläther bis zur Neutralität gewaschen und getrocknet, wobei 0,080 g 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitrodaunorubicin-hydrochlorid in einer Ausbeute von 68 % erhalten wurden, Fp. 173°C (Zers.).

40 IR (KBr): 3400, 1710, 1675, 1630, 1590, 1540 cm<sup>-1</sup>.

45 FD-MS: m/z 527 (MH<sup>+</sup>).

Beispiel 3: Herstellung von 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitro-N-trifluoracetyldaunorubicin

0,290 g (0,73 mM) des racemischen Aglykons 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitrodaunomycinon wurden, wie im Beispiel 1 beschrieben, in das entsprechende Glykosid überführt. 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitro-N-trifluoracetyldaunorubicin [7(S):9(S)] (0,1 g, Ausbeute 24 %) und sein Diastereoisomer [7(R):9(R)] (0,1 g, Ausbeute 24 %) wurden nach chromatographischer Trennung erhalten.

50 7(S):9(S): Fp. 237 - 240°C (Zers.).

55 IR (KBr): 3500, 3400, 1720, 1675, 1640, 1540 cm<sup>-1</sup>.

FD-MS: m/z 579 (M<sup>+</sup> - COCH<sub>3</sub>).

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 207, 259, 335, 400 nm.

CD (MeOH): ΔEpsilon 221 nm = +11,1, ΔEpsilon 250 nm = + 4,0, ΔEpsilon 289 nm = -5,1,  
ΔEpsilon 330 nm = +3,1, ΔEpsilon 400 nm = +1,0.

5

[Alpha]<sub>D</sub><sup>25°</sup> = + 22 (c = 0,0623 in MeOH)

PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Delta 1,30 (d, J = 6,5 Hz, 3H, 5'-CH<sub>3</sub>),  
1,86 (td, J = 4,0, 13,0, 13,0 Hz, 1H, 2'<sub>ax</sub>-H), 2,03 (dd, J = 4,4, 13,0 Hz, 1H, 2'<sub>eq</sub>-H),  
10 2,13 (dd, J = 4,3, 14,9 Hz, 1H, 8<sub>ax</sub>-H), 2,36 (ddd, J = 1,6, 2,2, 14,9 Hz, 1H, 8<sub>eq</sub>-H),  
2,37 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,89 (dd, J = 1,6, 18,2 Hz, 1H, 10<sub>eq</sub>-H), 3,12 (d, J = 18,2 Hz, 1H, 10<sub>ax</sub>-H),  
3,68 (dd, J = 3,0, 8,0 Hz, 1H, 4'-H), 4,15-4,30 (m, 1H, 3'-H), 4,25 (q, J = 6,5 Hz, 1H, 5'-H),  
4,30 (s, 1H, 9-OH), 5,30 (dd, J = 2,2, 4,3 Hz, 1H, 7-H), 5,47 (d, J = 4,5 Hz, 1H, 1'-H),  
6,70 (d, J = 8,0 Hz, 1H, NHCOCF<sub>3</sub>), 7,8-7,9 (m, 2H, 2-H, 3-H), 8,2-8,4 (m, 2H, 1-H, 4-H),  
15 13,72 (s, 1H, 6-OH).

7(R):9(R): FD-MS: m/z 579 (100, M<sup>+</sup> - COCH<sub>3</sub>)

PMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), u. a.: Delta 5,35 (m, 1H, 1'-H), 5,59 (dd, J = 2,0, 3,5 Hz, 1H, 7-H).

20

Beispiel 4: Herstellung von 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitrodaunorubicin-hydrochlorid

0,090 g (0,145 mM) 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitro-N-trifluoracetyl-daunorubicin wurden, wie im Beispiel  
2 beschrieben, behandelt, wobei 0,061 g 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitrodaunorubicin-hydrochlorid in einer  
Ausbeute von 75 % erhalten wurden, Fp. 212°C (Zers.).

25

IR (KBr): 3400, 2900, 1710, 1670, 1635, 1590, 1540 cm<sup>-1</sup>.

FD-MS: m/z 527 (MH<sup>+</sup>).

30

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 208, 222, 256, 402 nm.

Beispiel 5: 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitrodoxorubicin

0,86 g (1,52 mM) 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitrodoxorubicin-hydrochlorid (Beispiel 2) wurden mit 50 ml  
MeOH und 50 ml Dioxan gelöst. Der gerührten Lösung wurden 1,5 ml Triäthylorthoformiat und 0,92 ml  
35 30 %ige (Masse/Vol.) Br<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Lösung zugesetzt.

Nach Stehen während 4 h bei Raumtemperatur wurde die Lösung in eine Mischung von 300 ml Äthyläther  
und 500 ml n-Hexan gegossen und der gebildete Niederschlag gesammelt und mit Wasser gewaschen.

40

Das feste Material wurde mit 120 ml 0,25n HBr und 120 ml Aceton gelöst. Nach Stehen während 16 h bei  
Raumtemperatur wurden 4,8 g Natriumformiat, gelöst in 50 ml H<sub>2</sub>O, zugesetzt, und nach 24 h bei 50°C wurde  
die Lösung bis zu basischem pH mit einer gesättigten wässrigen NaHCO<sub>3</sub> Lösung behandelt.

Die Reaktionsmischung ergab bei Schütteln mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> einen rötlichen Niederschlag, der filtriert und mit  
Wasser gewaschen wurde.

Die Mutterlauge wurde mehrmals mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei  
eine zweite Ausbeute an Rohmaterial erhalten wurde.

45

Die beiden Ausbeuten wurden vereinigt und in MeOH mit einem Gehalt von 10 % Essigsäure gelöst, der  
Lösung wurden 20 g Silikagel zugesetzt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das feste Material  
wurde auf den Oberteil einer Säule (5 x 30), hergestellt mit Silikagel und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, aufgebracht und dann mit  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ÄtOH 95 % (80 : 10 V/V) eluiert.

Die reinen Fraktionen wurden gesammelt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde  
in MeOH gelöst, auf 0°C gekühlt und mit einer 0,5n HCl/MeOH-Lösung bis pH etwa 3 angesäuert.

50

Der Zusatz von Äthyläther ergab einen gelben Niederschlag, der filtriert und mit Äther gewaschen wurde.  
Nach Trocknen im Vakuum wurden 0,45 g (51 % Gesamtausbeute) 4-Demethoxy-6-desoxy-6-nitro-  
doxorubicinhydrochlorid erhalten.

55

IR (KBr): 3400, 1710, 1675, 1630, 1590, 1540 cm<sup>-1</sup>.

FD-MS: m/z 543 (MH<sup>+</sup>).

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 208, 260, 341, 384, 401 nm.

5 Rf (Kieselgelplatte F254 Merck: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (80 : 20 : 7 : 3) = 0,37.

Beispiel 6: 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitrodoxorubicin

0,35 g (0,62 mM) 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitrodaunorubicinhydrochlorid (Beispiel 4) wurden mit 15 ml MeOH und 15 ml Dioxan gelöst.

10 Der gerührten Lösung wurden 0,5 ml Triäthylorthoformiat und 0,34 ml 30 %ige (Masse/Vol.) Br<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Lösung zugesetzt.

Nach 4 h wurde die Reaktionsmischung in eine Mischung von 150 ml Äthyläther und 300 ml n-Hexan gegossen und der gebildete Niederschlag filtriert und mit Äther gewaschen.

15 Das feste Material wurde mit 25 ml 0,25n HBr und 25 ml Aceton gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gehalten.

1,5 g Natriumformiat, gelöst in 15 ml H<sub>2</sub>O, wurden zugesetzt und die Temperatur 24 h auf 50°C erhöht.

Gesättigte wässrige Natriumbicarbonatlösung wurde bis zu basischem pH zugesetzt und die Mischung mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert.

Die organische Schicht wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

20 Das Rohmaterial wurde auf einer Kieselgelchromatographiesäule unter Eluieren mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH (160 : 20 : 8) gereinigt. Die reinen Fraktionen wurden gesammelt, mit einer wässrigen gesättigten Natriumbicarbonatlösung und mit H<sub>2</sub>O bis zur Neutralität gewaschen und dann das Produkt durch Waschen mit einer Lösung von Wasser und 0,1n HCl bei pH etwa 3 extrahiert.

25 Die wässrige Lösung wurde gefriergetrocknet, wobei 0,17 g (47 % Gesamtausbeute) 4-Demethoxy-11-desoxy-11-nitrodoxorubicinhydrochlorid erhalten wurden.

IR (KBr): 3400, 2900, 1710, 1670, 1635, 1590, 1540 cm<sup>-1</sup>.

30 FD-MS: m/z 543 (MH<sup>+</sup>).

UV und sichtbare Spektren (MeOH) Lambda max: 208, 222, 256, 402 nm.

Rf (Kieselgelplatte F254 Merck: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (80 : 20 : 7 : 3) = 0,407.

35 Die erfindungsgemäß erhältlichen Verbindungen werden zur Formulierung pharmazeutischer Zusammensetzungen verwendet, die ein Anthracyclinglykosid der Formel (A') oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz hiervon in Mischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel oder Träger enthalten.

40

Biologische Wirksamkeit der Verbindungen der Beispiele 2, 4, 5 und 6

Die Verbindungen wurden im Vergleich mit Daunorubicin (DNR) gegen HeLa- und P388-Zellen in vitro untersucht. Die Verbindungen wurden getestet, indem sie in Form der Hydrochloride in Wasser gelöst wurden.

45 Der in vivo-Effekt der Verbindung von Beispiel 4 gegen P388-aszitische Leukämie ist in Tabelle I angegeben.

Die Wirksamkeit der Verbindungen der Beispiele 4 und 2 wurde gegen verbreitete Gross-Leukämie untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle II angegeben. In diesem System waren die beiden neuen Verbindungen in der maximal getesteten Dosis (22,5 mg/kg Verbindung von Beispiel 4, 50 mg/kg Verbindung von Beispiel 2) aktiver als DNR in der maximal verträglichen Dosis (10 mg/kg). Die Verbindungen der Beispiele 6 und 5 wurden in vivo gegen P388-aszitische Leukämie, verbreitete Gross-Leukämie und Brustkarzinom untersucht. Die

50

Ergebnisse sind in den Tabellen III, IV und V angegeben.

55

Tabelle I

Wirkung gegen P388-aszitische Leukämie<sup>a</sup>

5

Verbindung	Dosis <sup>b</sup>	T/C% <sup>c</sup>	Toxische <sup>d</sup> Todesfälle
DNR	2,9	152	1/10
Verbindung von Beispiel 4	4,4	157	5/10
	4	152	0/10
	6	162	0/10
	9	171	1/10
	13,5	124	9/10

10

15

<sup>a</sup> Die Versuche wurden an CDF<sub>1</sub>-Mäusen durchgeführt, die mit 10<sup>6</sup> Leukämiezellen i.p. angeimpft waren.

<sup>b</sup> Behandlung i.p. am Tag 1 nach der Tumorinokulation

<sup>c</sup> Mittlere Überlebenszeit von behandelten Mäusen/mittlere Überlebenszeit der Kontrolle x 100.

<sup>d</sup> Bewertet auf Basis von autoptischen Ergebnissen

20

Tabelle II

Wirkung gegen Gross-Leukämie<sup>a</sup>

25

Verbindung	Dosis <sup>b</sup> mg/kg	T/C% <sup>c</sup>	Toxische <sup>d</sup> Todesfälle
DNR	10	158, 150	0/20
Verbindung von Beispiel 4	15	175, 225	3/20
	10	125	0/10
	15	150	0/10
Verbindung von Beispiel 2	22,5	200	0/10
	25	175	0/10
	50	208	0/10

30

35

<sup>a</sup> Die Versuche wurden an C3H-Mäusen durchgeführt, die mit 2 x 10<sup>6</sup> Leukämiezellen i.v. angeimpft waren.

<sup>b</sup> Behandlung i.v. am Tag 1 nach der Tumorinokulation

<sup>c</sup> Mittlere Überlebenszeit von behandelten Mäusen/mittlere Überlebenszeit der Kontrolle x 100.

<sup>d</sup> Bewertet auf Basis von autoptischen Ergebnissen

40

45

Tabelle III

In vitro-Aktivität gegen HeLa-Zellen und LoVo-Zellen

50

	ID <sub>50</sub> (ng/ml)	
	HeLa <sup>1</sup>	LoVo <sup>1</sup>
DX	19	36
Verbindung von Beispiel 6	18	220
DX		
Verbindung von Beispiel 7		

<sup>1</sup> Kolonieinhibierungstest, durchgeführt nach 24 h Behandlung.

55

Tabelle IV  
In vivo Aktivität gegen aszitische P388- und verbreitete Gross-Leukämie

Verbindung	P388 <sup>1</sup>			Gross <sup>2</sup>		
	Dosis mg/kg	T/C% <sup>3</sup>	Toxische Todesfälle <sup>4</sup>	Dosis mg/kg	T/C% <sup>3</sup>	Toxische Todesfälle <sup>4</sup>
DX	4,4	182	0/10	10	183	0/10
	6,6	209	0/10	13	225	0/10
	10	391	0/10	16,9	233	0/10
Verbindung von Beispiel 6	6,6	195	0/10	17,3	275	0/10
	10	223	0/10	22,5	308	1/10
	15	209	9/10	29,25	117	9/10

<sup>1</sup> P388-Leukämie inokuliert i.p. am Tag 0. Behandlung i.p. am Tag 1.

<sup>2</sup> Gross-Leukämie inokuliert i.v. am Tag 0. Behandlung i.v. am Tag 1.

<sup>3</sup> Mittlere Überlebenszeit von behandelten Mäusen/mittlere Überlebenszeit der Kontrolle x 100

<sup>4</sup> Bewertet auf Basis von autoptischen Ergebnissen.

Tabelle V

In vivo Aktivität gegen Gross-Leukämie und C<sub>3</sub>H Brustkarzinom

Verbindung	Gross <sup>1</sup>			Brustkarzinom (s.c.) <sup>2</sup>	
	Dosis mg/kg	T/C% <sup>3</sup>	Toxische Todesfälle <sup>4</sup>	Dosis mg/kg	% Tumorwachstumsinhibierung
DX	10	158	0/10	6,0	100
	13	200	0/10	7,5	100
	16,9	200	4/10		
Verbindung von Beispiel 5	29,6	200	0/10	8,88	96
	38,5	242	0/10	11,54	100
	50	142	0/10	15	100

<sup>1</sup> Gross-Leukämie inokuliert i.v. am Tag 0. Behandlung i.v. am Tag 1.

<sup>2</sup> Behandlung i.v. q 7 d x 4 beginnend als der Tumor greifbar war.

<sup>3</sup> Mittlere Überlebenszeit von behandelten Mäusen/mittlere Überlebenszeit der Kontrolle x 100

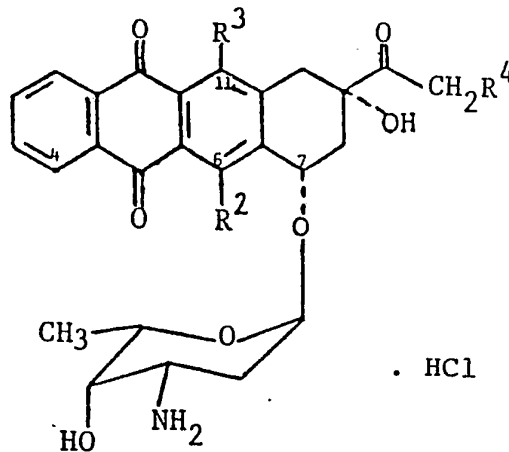
<sup>4</sup> Bewertet auf Basis von autoptischen Ergebnissen.

PATENTANSPRUCH

5

10 Verfahren zur Herstellung von neuen Anthracyclinglykosiden der allgemeinen Formel

15



, (A)

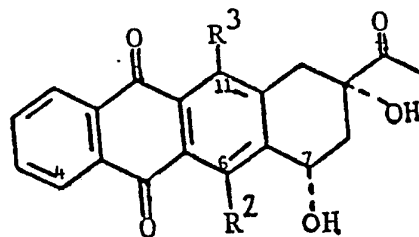
25

. HCl

30

35 worin eine der Gruppen  $R_2$  und  $R_3$  Hydroxy ist und die andere eine Nitrogruppe darstellt und  $R_4$  Wasserstoff oder Hydroxy ist, und deren pharmazeutisch annehmbaren Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Aglykon der allgemeinen Formel

40

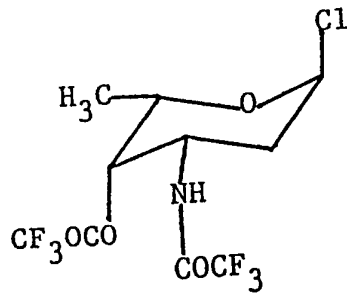


, (B)

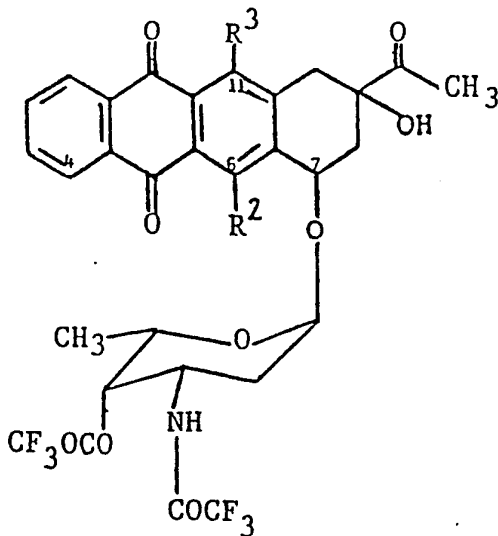
50

55 worin  $R^2$  und  $R^3$  die obige Bedeutung haben, in wasserfreiem Methylendichlorid unter einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur und in Anwesenheit von Silbertrifluormethansulfonat mit 1-Chlor-N,O-di-(trifluoracetyl)-daunosamin der Formel

60



15 unter Bildung einer diastereomeren Mischung von 7(S),9(S)- und 7(R),9(R)-Anthracyclinglykosiden der Formel



45 worin  $R^2$  und  $R^3$  die obige Bedeutung haben, kondensiert; die O-Trifluoracetylschutzgruppe durch Behandlung mit Methanol bei Raumtemperatur über Nacht entfernt; die 7(S),9(S)-N-trifluoracetylierten Glykoside von den 7(R),9(R)-Analoga durch Chromatographie auf einer Silikagelsäule unter Verwendung einer Mischung von Methylendichlorid-Äthylacetat-Essigsäure (90 : 10 : 1 V/V) als Eluiersystem trennt; die N-Trifluoracetylschutzgruppe von den so erhaltenen reinen 7(S),9(S)-Derivaten durch milde alkalische Hydrolyse mit 0,1 n Natriumhydroxid entfernt, die so erhaltenen freien Basen als ihre Hydrochloride der Formel (A') ( $R_4 = H$ ) durch Behandlung mit methanolischem Chlorwasserstoff isoliert und gegebenenfalls die so erhaltenen

50 Verbindungen durch Bromieren in Stellung 14 und anschließende Behandlung der erhaltenen 14-Bromderivate mit wässriger Natriumformiatlösung in ihre Doxorubicinanaloga der Formel (A), worin  $R^4$  Hydroxy ist, überführt, die als die betreffenden Hydrochloride isoliert werden.