



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ **CH 676716 A5**

⑤① Int. Cl.⁵: **C 07 H** 17/04
A 61 K 31/70

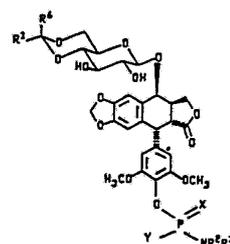
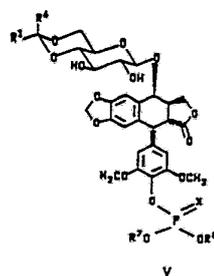
Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

<p>⑳ Gesuchsnummer: 2962/88</p> <p>㉑ Anmeldungsdatum: 04.08.1988</p> <p>⑳ Priorität(en): 04.08.1987 US 081493 27.05.1988 US 199731</p> <p>㉔ Patent erteilt: 28.02.1991</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 28.02.1991</p>	<p>⑦③ Inhaber: Bristol-Myers Squibb Company, New York/NY (US)</p> <p>⑦② Erfinder: Saulnier, Mark G., Middletown/CT (US) Senter, Peter D., Seattle/WA (US) Kadow, John F., Meriden/CT (US)</p> <p>⑦④ Vertreter: Bovard AG, Bern 25</p>
---	---

⑤④ **Epipodophyllotoxin-glukosid-4'-phosphat-Verbindungen.**

⑤⑦ Die Etoposidverbindungen der Formeln V und VII, worin die Symbole die in den Ansprüchen 1 und 13 angegebene Bedeutung besitzen und ihre pharmazeutisch annehmbaren Salze sind wirksame Antitumormittel. Die Wirkstoffe besitzen eine hohe Wasserlöslichkeit, was sich pharmazeutisch vorteilhaft auswirkt.

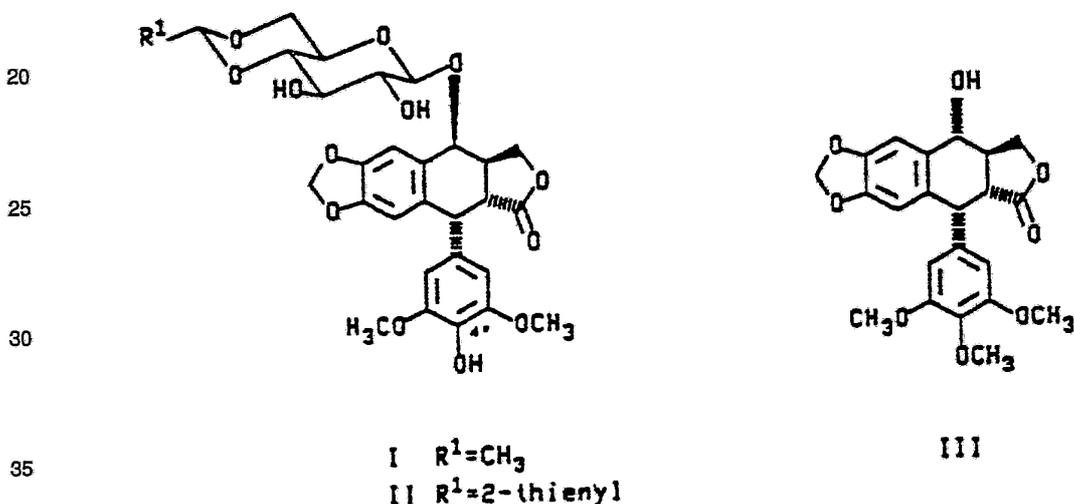


Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf 4'-Phosphatderivate von Epipodophyllotoxin-glukosiden, auf ihre Herstellung und auf pharmazeutische Zusammensetzungen, welche diese Wirkstoffe enthalten. Die erfindungsgemässen Verbindungen besitzen eine Antitumor-Wirkung.

Etoposid (VP-16, I) und Teniposid (VM-26, II) sind in der Klinik als Antikrebsmittel nützlich und sind von natürlich vorkommendem Lignan, Podophyllotoxin (III) abgeleitet; die Klasse der Verbindungen, die Etoposid und Teniposid umfasst, wird manchmal als 4'-Demethylepipodophyllotoxin-glukoside bezeichnet. Etoposid und Teniposid sind Wirkstoffe für die Behandlung einer Anzahl von Krebsarten, einschliesslich des testikulären Krebses, der Kleinzellenlunge, des Ovarien-, Brust-, Schilddrüsen-, Blasenkrebs, Hirntumor, Nichtlymphozytische Leukämie und Hodgkin-Krankheit.

Die Verbindungen der Formel I und II und das Verfahren für ihre Herstellung sind in der US-A 3 408 441 und in der US-A 3 524 844 beschrieben. Die darin offenbarten Verbindungen, insbesondere Etoposid und Teniposid dienen als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Epipodophyllotoxin-glukosid-4'-phosphatderivaten der vorliegenden Erfindung.



Die Phosphorylierung von therapeutischen Mitteln, die eine Hydroxylgruppe enthalten, wurde als Mittel für die Drogenlatenzierung verwendet; die phosphorylierten Derivate können dann *in vivo* durch Phosphatase gespalten werden, um das aktive, ursprüngliche Molekül freizusetzen. Eine kurze Diskussion von Phosphatasen als potentielle Prodrugs ist im Übersichtsartikel «Rational for Design of Biologically Reversible Drug Derivatives: Prodrugs» (Sinkula and Yalkowsky, J. Pharm. Sci., 1975, 64:181-210, Seiten 189-191) beschrieben. Beispiele von Phospaten von bekannten Antitumormitteln sind Camptothecin (Japan Kokai 21-95, 394 und 21-95, 393, Derwent Abst. No. 87-281 016 bzw. 87-281 015) und Daunorubicin (U.S. Patent Nr. 4 185 111).

Podophyllotoxinphosphat-dinatriumsalz IV wurde durch Seligman et al. hergestellt. Das Phosphat wurde jedoch nicht durch Prostansäurephosphatase hydrolysiert und zeigte keine reduzierte Toxizität im Vergleich mit dem ursprünglichen Podophyllotoxin (Cancer Chemotherapy Reports Part I, 1975, 59: 233-242).

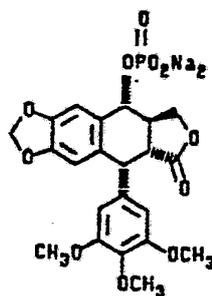
55

60

65

5

10



15

IV

20

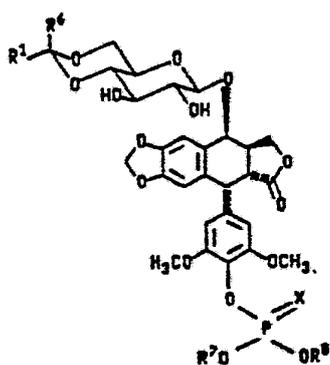
Die vorliegende Erfindung stellt Phosphatester von 4'-Demethylepipodophyllotoxin-glukosiden zur Verfügung, welche als Antitumormittel wirksam sind. Insbesondere sind das Dihydrogenphosphat von 4'-Demethylepipodophyllotoxin-glukosiden und Salze davon gut wasserlöslich und besitzen überlegene pharmazeutische Vorteile bezüglich der üblichen therapeutischen Mittel dieser Klasse, Etoposid und Teniposid, welche nur eine minimale Wasserlöslichkeit aufweisen.

Die vorliegende Erfindung stellt 4'-Phosphatderivate von 4'-Demethylepipodophyllotoxin-glukoside der allgemeinen Formel V

25

30

35



40

V

und pharmazeutisch annehmbare Salze davon zur Verfügung, worin R¹, R⁶, R⁷, R⁸ und X die im Patentanspruch 1 angegebene Bedeutung besitzen.

45

Die Salze der Verbindungen der Formel V umfassen sowohl monoanionische als auch dianionische Salze. Das Kation kann ein Metallion, wie beispielsweise ein Alkali- oder Erdalkalimetallion oder ein Ion einer organischen Stickstoff enthaltenden Gruppe, wie Ammonium, Mono-, Di- oder Trialkylammonium oder Pyridinium sein. Das Kation ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe Natrium, Kalium, Lithium, Cäsium, Magnesium, Kalzium, Aluminium, Ammonium und Mono-, Di- und Trialkylammonium. Eine bevorzugte Ausführungsform stellen Verbindungen der Formel V dar, worin R⁷ und R⁸ beide Wasserstoff sind und pharmazeutisch annehmbare Salze davon. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist Etoposid-4'-dihydrogenphosphat und Thiophosphat und ihre entsprechenden Dinatriumsalze der Formel VIa und VIb

55

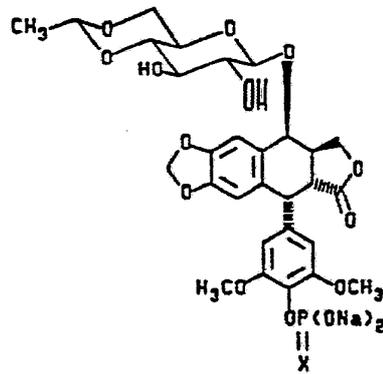
60

65

5

10

15



VI

a: X = O
b: X = S

20

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sind Verbindungen der Formel V, worin R⁷ und R⁸ gleich sind und ausgewählt sind aus 2,2,2-Trihalogenethyl, 2 Cyanoethyl, C₁₋₅-Alkyl, Phenyl und Phenylalkyl, worin der Phenylring gegebenenfalls mit Alkyl, Halogen oder Nitro substituiert ist.

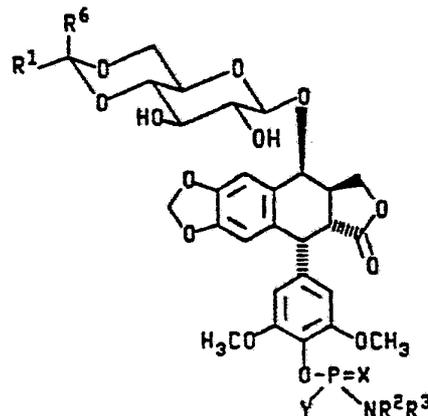
Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die Phosphoramidatderivate der Formel VII

25

30

35

40



VII

45

und pharmazeutisch annehmbare Salze davon mit einer Antitumorwirkung, worin R¹, R⁶ und X wie vorher definiert sind; Y Cl, OH oder NR⁴R⁵ ist; R², R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe H, C₁₋₅-Alkyl, C₂₋₅-Alkenyl, A-substituiertes C₃₋₆-Cycloalkyl, oder R², R³ und das Stickstoffatom, an welches sie gebunden sind, zusammen einen 3- bis 6-gliedrigen Ring bilden; oder R⁴, R⁵ und das Stickstoffatom, an welches die gebunden sind, einen 3- bis 6-gliedrigen Ring bilden, wobei die A-Substituenten wie vorher definiert sind.

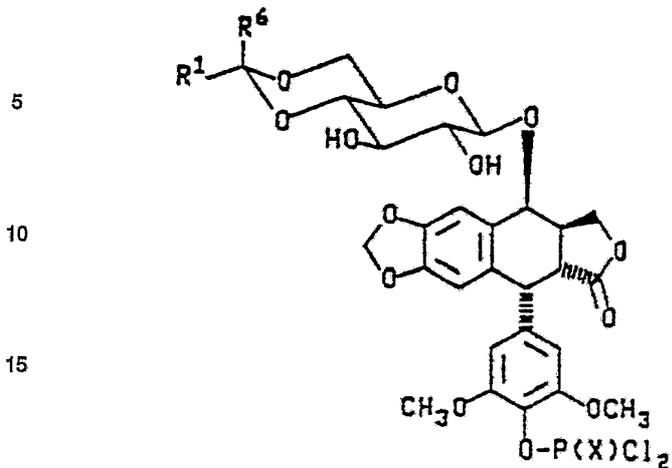
50

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die Zwischenprodukte der Formel VIII, worin R¹, R⁶ und X wie vorher definiert sind. Diese Verbindungen sind nützlich bei der Herstellung der Verbindungen der Formel V.

55

60

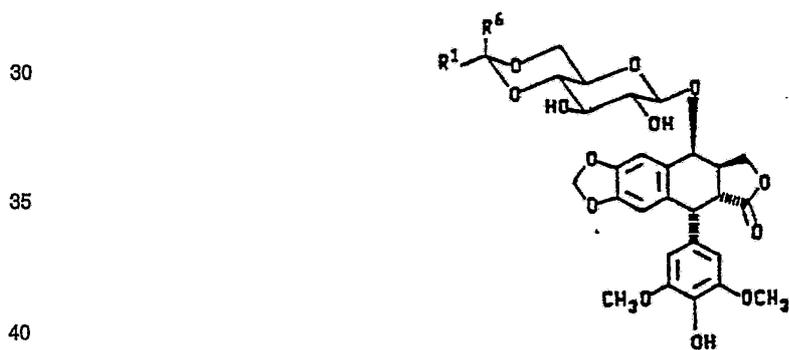
65



VIII

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel V, worin R⁷ und R⁸ beide H sind und die pharmazeutisch annehmbaren Salze, welches folgende Schritte umfasst:

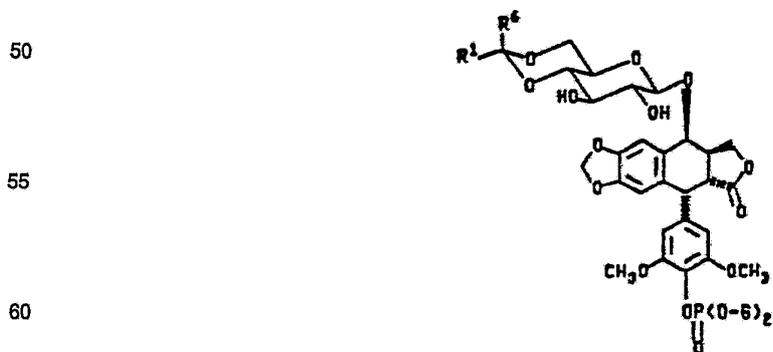
25 a) Umwandlung einer Verbindung der Formel IX



IX

45 in eine Verbindung der Formel X, worin R¹, R⁶ und X wie vorher definiert sind und G eine Phosphat-schutzgruppe darstellt;

b) Entfernen der Phosphat-schutzgruppen



X

65

c) gegebenenfalls Umwandlung des Produktes von Stufe b) in ein pharmazeutisch annehmbares Salz. Die Phosphatschutzgruppen umfassen diejenigen Gruppen, die in der Definition für R⁷ angegeben sind, mit Ausnahme von Wasserstoff, sie sind jedoch nicht darauf beschränkt.

5 Wenn nicht anderweitig spezifiziert, bedeutet der Ausdruck «Alkyl» gerade oder verzweigte Kohlenstoffketten; «Halogen» bedeutet Brom, Chlor, Fluor und Jod; «Etopofos» ist die Verbindung Etoposid-4'-phosphat-dinatriumsalz z.B. Verbindung VIa).

10 Die Phenolgruppe der 4'-Demethylepipodophyllotoxin-glukoside kann mit Phosphoroxichlorid und Thiophosphorylchlorid phosphoryliert werden, wobei die entsprechenden Dichlorphosphate bzw. Dichlorthiophosphate (Formel VIII) erhalten werden. Die Phosphorylierungsreaktion wird in einem zweckmässigen, organischen Lösungsmittel durchgeführt, beispielsweise in Acetonitril und vorzugsweise in Gegenwart einer tertiären Aminbase, beispielsweise in N, N-Diisopropylethylamin.

15 Der Verlauf der Reaktion kann durch Dünnschichtchromatographie (TLC) verfolgt werden, wobei die optimale Reaktionszeit durch das Erscheinen des Produktes oder das Verschwinden des Ausgangsmaterials oder durch beides beurteilt werden kann. Erfahrungsgemäss beträgt die Reaktionszeit 4 bis 72 Std. Die Länge der Reaktionszeit erwies sich als abhängig von der Qualität des verwendeten Phosphor-reagens.

20 Die 4'-Dichlorphosphate der Formel VIII sind vielseitige Zwischenprodukte, welche anschliessend mit nukleophilen Mitteln reagieren, wobei eine Anzahl von Phosphat- und Thiophosphatderivaten erhalten wird. Danach können die Zwischenprodukte hydrolysiert werden, wobei die Phosphate erhalten werden und in Gegenwart einer Base werden die Phosphatsalze erhalten. Wenn beispielsweise VIII mit einem Überschuss von wässrigem Bicarbonat behandelt wird, erhält man das entsprechende 4'-Phosphatdina-trium- und 4'-Thiophosphatdinatriumsalz; Bicarbonate von anderen Kationen, wie von Kalium und Ammo-nium können ebenfalls für die Herstellung der entsprechenden Salze verwendet werden. Das Dichlor-phosphat-Zwischenprodukt VIII kann mit Aminen reagieren, wobei entweder das entsprechende Phosphordiamidat oder Chlorphosphormonoamidat erhalten wird. Beispiele von zweckmässigen Aminen umfassen Ammoniak, primäre Amine, wie Ethylamin, Chlorethylamin, Allylamin, Dimethylaminopropylamin, Hydroxyethylamin, Cyclohexylamin und Aminocyclohexanol; und sekundäre Amine umfassen beispiels-weise Diethylamin, Piperidin, Ethylmethylamin, Methylaminoethanol, Ethylbutylamin und dergleichen. Die Menge des eingesetzten Amins bezüglich derjenigen des Epipodophyllotoxin-dichlorphosphates kann entweder zugunsten des einen oder zugunsten des anderen Produktes eingestellt werden. Wenn bei-spielsweise ein grosser Überschuss des Amins bezüglich des Epipodophyllotoxins verwendet wird, erhält man das symmetrische Phosphordiamidat, d.h. Verbindungen der Formel VII, worin Y NR²R³ ist; das Chlorphosphormonoamidat, d.h. Verbindungen der Formel VII, worin Y Cl ist, kann hergestellt werden, wenn eine gesteuerte Menge des Amins verwendet wird. Das Chlorphosphormonoamidat kann hydroly-siert werden, wobei Verbindungen der Formel VII, worin Y OH ist oder Salze davon, erhalten werden oder es kann weiter mit einem zweiten Amin umgesetzt werden, wobei das unsymmetrische Phosphor-diamidat erhalten wird, d.h. Verbindungen der Formel VII, worin Y NR⁴R⁵ ist und verschieden von NR²R³ ist.

40 Das obenbeschriebene Verfahren wird durch das folgende Reaktionsschema erläutert:

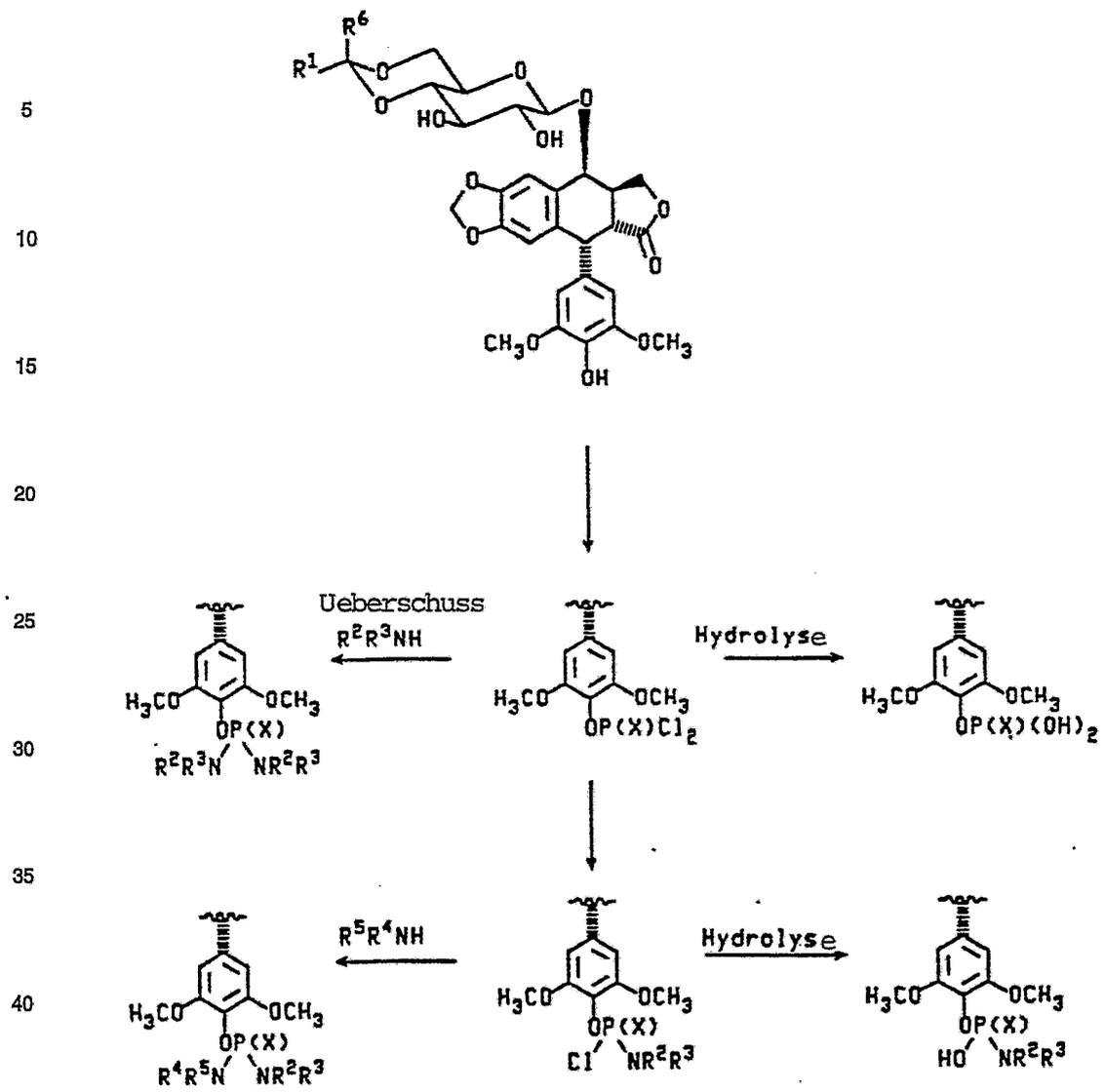
45

50

55

60

65



45

50

55

60

Phosphatryester sind Verbindungen der Formel V, worin R^7 und R^8 nicht H sind und sie können erhalten werden, indem ein 4'-Demethylepipodophyllotoxin-glukosid mit einem Halogenphosphatdiester (z.B. Hal-P(X)(OR⁷)(OR⁸)) behandelt wird. Es wurde gefunden, dass diese Reaktion am wirksamsten in Acetonitril in Gegenwart einer organischen Trialkylaminbase durchgeführt wird; die bevorzugte Base ist Diisopropylethylamin. Es wird mindestens ein Äquivalent des Halogenphosphates und der Aminbase verwendet, wobei jedoch beide Reagenzien vorzugsweise in Mol-Äquivalenten in leichtem Überschuss bezüglich zu denjenigen des Epipodophyllotoxin-glukosid-Reaktanten verwendet werden. Die Reaktion kann bei jeder Temperatur durchgeführt werden, die zur Produktbildung führt; leicht erhöhte Temperaturen, z.B. 30 bis 40°C erleichtern jedoch die Reaktion, welche mehrere Tage bis zu ihrer Beendigung dauern kann. Symmetrische Halogenphosphat-diester (d.h. $R^7=R^8$) können üblicherweise aus dem Alkohol und beispielsweise Phosphorylchlorid hergestellt werden und die asymmetrischen (d.h. R^7 verschieden von R^8) können aus dem Alkohol und dem Dihalogenphosphatester erhalten werden. Es ist ebenfalls möglich, Phosphatryester auf andere Weise herzustellen, beispielsweise indem zuerst das Phenol in einen Phosphitester umgewandelt wird, d.h. durch Umsetzen eines Reagenses, wie (PhCH₂O)₂PN(i-pr)₂ und anschließender Oxidation des Phosphates in den Phosphatester, indem z.B. M-Chlor-perbenzoesäure verwendet wird.

65

Die Phosphatryester können zusätzlich als Zwischenprodukte für die Herstellung von Verbindungen der Formel V und Salzen davon verwendet werden. Beispielsweise wird demzufolge des Dihydroxyphosphat (V, $R^7=R^8=H$) erhalten werden, wenn Diphenylester (V, $R^7=R^8=Phenyl$) einer katalytischen Hydrierung unterworfen wird. Andere zweckmässige Phosphatschutzgruppen sind beispielsweise 2,2,2-

Trichlorethyl, Benzyl, Cyanoethyl, p-Nitro substituiertes Phenyl, Benzyl, Phenetyl und p-Bromphenyl; sie sind jedoch nicht auf diese spezifischen Gruppen eingeschränkt. Das Dihydroxyphosphat (V, R⁷=R⁸=H) werden in Basensalze umgewandelt, indem sie mit einer zweckmässigen Base, z.B. Natriumbicarbonat, Ammoniumbicarbonat oder organischen Aminen umgesetzt werden. Alternativ können die Salze ebenfalls durch Eluierung des Dihydroxyphosphates in einer Ionenaustauschersäule, die ein Harz mit dem gewünschten Kation enthält, gebildet werden.

Obschon die vorliegende Erfindung Phosphoroxchlorid, Halogenphosphat-diester und ihre entsprechenden Schwefelanaloge als Phosphorylierungsreagens verwendet, ist es für den Fachmann offensichtlich, dass andere Phosphorreagenzien, die fähig sind, Phenole zu phosphorylieren, verwendet werden können, wobei zweckmässige Reaktionsbedingungen und -Medien in Übereinstimmung mit dem verwendeten Phosphorylierungsmittel ausgewählt werden müssen. Der Übersichtsartikel «Current Methods of Phosphorylation of Biological Molecules» (Synthesis, 1977, 737-752) enthält weitere Beispiele von Phosphorylierungsmitteln, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

Biologische Eigenschaften

Repräsentative Verbindungen der vorliegenden Erfindung wurden auf Antitumoraktivität gegen die transplantierbare Mäuseleukämie p388 getestet. In allen Versuchen wurden weibliche CDF₁-Mäuse verwendet, welchen ein Tumorinokulum mit 10⁶ Asciteszellen der Mäuseleukämie p388 implantiert war, verwendet. In den Versuchen, worin Etoposid-4'-phosphat, das Dinatriumsalz davon und Etoposid-4'-thiophosphat-dinatriumsalz verwendet wurde, fand die Tumorimplantation und die medikamentöse Behandlung über den intravenösen Weg. In allen anderen Versuchen wurde für die Tumorimplantation und die Medikamentenbehandlung der intraperitoneale Weg verwendet. In allen Fällen wurde in der Positivkontrolle Etoposid intraperitoneal verabreicht. Die Versuche dauerten 28 bis 46 Tage, wobei am Ende dieser Zeit die Anzahl der Überlebenden vermerkt wurde. Die Antitumor-Aktivität wurde in % T/C ausgedrückt, was das Verhältnis der mittleren Überlebenszeit (MST) der mit Medikamenten behandelten Gruppe zur MST der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe darstellt. Eine Verbindung, welche zu einem % T/C-Wert von 125 oder mehr führte, wurde im allgemeinen als solche mit einer signifikanten Antitumor-Aktivität im p388-Test betrachtet. Die Tabelle I zeigt die Resultate der obenbeschriebenen Auswertung. Es sind die maximalen % T/C-Werte und die Dosen, welche diesen Effekt ergeben, geschildert.

Tabelle I: Antitumor-Aktivität gegen die Mäuseleukämie p388

Verbindung von	Dosis* (mg/kg/inj)	Weg	MST (d)	% T/C
Intravenös implantierte Tumorzellen				
Beispiel 1 (Etoposid)	140 50	IV IP	29,0 20,5	363 256
Beispiel 4 (Etoposid)	200 100	IP IP	18,0 21,5	225 269
Beispiel 8 (Etoposid)	125 100	IV IP	24,5 29,5	306 369
Intraperitoneal implantierte Tumorzellen				
Beispiel 2 (Etoposid)	240 60	IP IP	16,5 25,0	165 250
Beispiel 3 (Etoposid)	200 100	IP IP	15,5 27,0	155 270
Beispiel 7 (Etoposid)	240 100	IP IP	25,0 26,0	250 260
Beispiel 9 (Etoposid)	150 100	IP IP	19,5 24,0	217 267

* An den Tagen 5 und 8 wurden Medikamente verabreicht, wenn nicht anders angegeben (Tag 1 war der Tag der Tumorimplantation).

Die erfindungsgemässen Antitumorverbindungen haben sich als aktiv gegen transplantierte Tumore in Versuchstieren erwiesen. Insbesondere die Verbindung der Formel VIa («Etopofos») zeigt eine signifikant höhere Antitumoraktivität als das Etoposid im p388-Test. Dieses selektive Mittel stellt eine gut

wasserlösliche Prodroge von Etoposid dar, welches die Antitumoraktivität in-vitro reduzierte und durch alkalische Phosphatase rasch gespalten wird, wobei das Etoposid freigesetzt wird. Das freigesetzte Etoposid besitzt eine identische Cytotoxizität wie die Ausgangsdroge.

Demzufolge können die erfindungsgemässen Verbindungen der Formeln V und VII wirksam Säugetier-tumoren hemmen, wenn einem tumortragenden Wirt eine tumorhemmend wirksame Dosis verabreicht wird. Zu diesem Zweck kann das Mittel durch konventionelle Wege, wie durch den intravenösen, den intramuskulären, den intratumoralen, den intraarterialen, den intralymphatischen oder den oralen verabreicht werden, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung der Formeln V oder VII und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger enthält. Die Antitumorzusammensetzung kann in jeder zweckmässigen pharmazeutischen Form für den gewünschten Weg der Verabreichung vorliegen. Beispiele von solchen Zusammensetzungen umfassen feste Zusammensetzungen für die orale Verabreichung, wie Tabletten, Kapseln, Pillen, Pulver und Granulen, flüssige Zusammensetzungen für die orale Verabreichung, wie Lösungen, Suspensionen, Sirupe oder Elixiere und Zubereitungen für die parenterale Verabreichung, wie sterile Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen. Sie können in Form von sterilen, festen Zusammensetzungen hergestellt werden, welche in sterilem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder anderen sterilen, injizierbaren Medien aufgelöst werden können.

Optimale Dosierungen und Diäten für einen bestimmten Säugetierwirt können durch den Fachmann leicht festgelegt werden. Die verwendete Dosis ist abhängig von der besonderen formulierten Zusammensetzung, der besonderen verwendeten Verbindung, der Art der Verabreichung und die besondere Lage vom Wirt und vom behandelten Leiden. Viele Faktoren, welche die Wirkung des Medikaments verändern, wie beispielsweise das Alter, das Geschlecht, das Gewicht, die Diät, die Verabreichungszeit, der Verabreichungsweg, der Ausscheidungsgrad, der Zustand des Patienten, Drogenkombinationen, Reaktionsempfindlichkeiten und die Ernsthaftigkeit des Leidens müssen in Betracht gezogen werden.

Die folgenden Beispiele dienen ausschliesslich der Erläuterung der vorliegenden Erfindung, ohne diese einzuschränken.

In den folgenden Beispielen wurden die Protonen- und Kohlenstoff-Kernresonanzspektren (NMR) (unter Verwendung von CDCl_3 oder D_2O als innere Referenz) und die Phosphor-NMR-Spektren (unter Verwendung von 85%iger wässriger H_3PO_4 als äussere Referenz) auf einem Bruker-WM360-Spektrometer aufgenommen. Die Infrarot-Spektren (IR) wurden auf einem Perkin-Elmer-1800 Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometer aufgenommen. «Flash-Chromatographie» bezieht sich auf das Verfahren, welches durch Still beschrieben wurde (W.C. Still; M. Kahn; A. Mitra; J. Org. Chem., 1978, 43, 2923) und wurde unter Verwendung von E. Merck-Kieselgel durchgeführt (230–400 mesh). Die Umkehrphasen-Chromatographie wurde unter positivem Stickstoffdruck und unter Verwendung von C18 (Octadecylsilan) gebunden an Silikagel durchgeführt (40 μm Durchmesser, geliefert von J.T. Baker).

Beispiel 1

Etoposid-4'-phosphat-dinatriumsalz (Verbindung VIa)

Eine magnetisch gerührte Suspension von Etoposid (2,30 g, 391 μmol) in trockenem Acetonitril (210 ml) wurde erwärmt, wobei eine nahezu vollständige Lösung erhalten wurde. Die Lösung wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt und N,N-Diisopropylethylamin (2,36 ml, 13,5 μmol) wurde zugegeben. Die Mischung wurde dann auf 0°C abgekühlt und dann wurde POCl_3 (666 mg, 4,34 μmol) mittels einer Injektionsspritze während 30 Sek. zugegeben. Die Mischung wurde langsam während 2 bis 3 Std. auf Zimmertemperatur erwärmt und das Rühren wurde bei Zimmertemperatur während 63 Std. fortgesetzt. Am Ende dieser Periode wurden 20 Vol.-% und wie in Beispiel 2 beschrieben mit Diethylamin behandelt. Der Rückstand wurde mit einer Natriumbicarbonatlösung (6,0 g, 71,4 μmol) in entionisiertem Wasser (110 ml) behandelt, die Mischung wurde bei Zimmertemperatur während 80 Min. gerührt und dann zwischen gesättigtem wässrigem Natriumbicarbonat (20 ml) deionisiertem Wasser (125 ml) und Ethylacetat (350 ml) verteilt. Die organische Phase wurde weiter mit entionisiertem Wasser (1 \times 50 ml) extrahiert und die kombinierten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (250 ml) gewaschen und einem Vakuum von 0,5 mm bei Zimmertemperatur während 1 Std. unterworfen, um die Lösungsmittel zu entfernen. Der wässrige Teil wurde auf eine Säule mit 4 cm Durchmesser appliziert, die 15 cm Octadecylsilan gebundenes Kieselgel enthielt, welches in Methanol gepackt und mit Wasser equilibriert wurde. Nachdem der gesamte wässrige Teil appliziert war, wurde die Säule mit Wasser (175 ml) eluiert, um die anorganischen Salze zu entfernen und dann wurde das Produkt mit 4:1 Wasser:Methanol eluiert. Die Abdampfung des Lösungsmittels bei 0,5 Torr ergab 744 mg (36%) der reinen Titelverbindung als farbloser Feststoff. Alternativ ergibt die Gefriertrocknung die reine Titelverbindung in Form eines sehr flockigen Feststoffes von niedriger Dichte.

IR (KBr) 3426, 1775, 1593, 1505, 1486, 1337, 1239, 1191, 1122, 1078, 1034, 983, 927, 888, 876, 851, 840, 697, 684, 664, 547 cm^{-1} .

^1H NMR (D_2O) δ 6.93 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.27 (s, 2H), 5.93 (d, 2H), 5.09 (d, 1H, J=2.8 Hz), 4.83 (q, 1H, J=5.0 Hz), 4.68 (d, 1H, J=7.9 Hz), 4.62 (d, 1H, J=5.7 Hz), 4.47–4.35 (m, 2H), 4.24 (dd, 1H,

CH 676 716 A5

J=4.4 and 10.4 Hz), 3.64 (s, 6H), 3.68–3.52 (m, 3H), 3.44–3.30 (m, 3H), 3.17–3.07 (m, 1H), 1.31 (d, 3H, J=5.0 Hz).

90 MHz ^{13}C NMR (D_2O) δ 178.5, 151.8, 148.1, 146.1, 135.0, 132.6, 130.9, 127.4, 109.9, 109.5, 107.4, 101.3, 100.4, 99.6, 79.2, 73.7, 72.7, 72.2, 69.1, 67.1, 65.4, 55.6, 42.8, 40.3, 37.5, 18.8.

5 146 MHz ^{31}P NMR (D_2O) δ 3.79.

Massenspektrum (FAB), m/e, 713 (M^+ +H). $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{Na}_2\text{O}_{16}\text{P}$ benötigt M^+ , 712.

Analyse berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{Na}_2\text{O}_{16}\text{P}$: C, 48.89; H, 4.39; Na, 6.45.

Gefunden*: C, 48.72; H, 4.56; Na, 6.56.

* Eingestellt für 8,16% bestimmt durch die Analyse nach Karl Fischer.

10

Beispiel 2

Etoposid-4'-(Bis[N,N-diethyl]phosphonamid) (VII, X=O, R¹=Methyl, R⁶=H, Y=N(Et)₂, R²=R³=Et)

15 Wie in Beispiel 1 angegeben, wurden 20 Vol.-% der Mischung des Reaktionsproduktes von Etoposid und POCl_3 zu Diethylamin (4 ml) zugegeben und bei Zimmertemperatur während 3 Std. gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft und der hellorange Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie auf Kieselgel gereinigt. Die Elution mit 4% Methanol in Methylenchlorid ergab 271,3 mg (46,9%) der reinen Titelverbindung als hellgelber Feststoff.

20 360 MHz ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.79, (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.20 (s, 2H), 5.96 (ABq, 2H), 4.87 (d, 1H, J=3.2 Hz), 4.71 (q, 1H, J=5.1 Hz), 4.61 (d, 1H, J=7.6 Hz), 4.57 (d, 1H, J=5.2 Hz), 4.39 (dd, 1H, J=9.1 and 10.2 Hz), 4.22–4.13 (m, 2H), 3.74 (m, 1H), 3.65 (s, 6H), 3.55 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.32–3.10 (m, 11H), 2.94–2.83 (m, 1H), 1.37 (d, 3H, J=5.1 Hz), 1.10 (m, 12H).

146 MHz ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 16.49.

25 Massenspektrum (FAB), m/e, 779 (M^+ +H), 573 (M^+ -Zucker). $\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}$ benötigt M^+ , 778.

Beispiel 3

30 Etoposid-4'-(N,N-[2-chlorethyl]phosphorylchlorid)
(VII, R¹=Methyl, R⁶=H, X=O, Y=Cl, R²=R³= $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$)

35 Eine magnetisch gerührte Suspension von Etoposid (2,00 g, 3,40 mmol) in getrocknetem Acetonitril (220 ml) wurde erwärmt, wobei eine nahezu vollständige Lösung erhalten wurde. Die Mischung wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit N,N-Diisopropylethylamin (2,05 ml, 11,8 mmol) behandelt. Die Mischung wurde dann unter einer N_2 -Atmosphäre auf 0°C abgekühlt und Phosphoroxchlorid (624 mg, 4,07 mmol) wurde durch eine Injektionsspritze während 30 Sek. zugegeben. Die Mischung wurde bei 0°C während 2,5 Std. magnetisch gerührt und dann weitere 1,5 Std. bei Zimmertemperatur. Dann wurde schnell Bis-(2-chlorethylamin)-hydrochlorid (1,82 g, 10,2 mmol) zugegeben, unmittelbar gefolgt durch zusätzliches N,N-Diisopropylethylamin (2,10 ml, 12,0 mmol). Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur während 85 Min. gerührt, im Vakuum auf ein Volumen von etwa 5 ml konzentriert und in Ethylacetat (400 ml) und Methanol (5 ml) aufgelöst. Die erhaltene Lösung wurde mit ph 5-Puffer (2 x 200 ml), Wasser (150 ml) und Salzlösung (150 ml) gewaschen und über Natriumsulfat/Magnesiumsulfat getrocknet. Die Abdampfung des Lösungsmittels ergab einen gelb-orangen Feststoff, welcher durch Flash-Chromatographie auf Kieselgel mit 3 bis 4% Methanol in Methylenchlorid gereinigt wurde, wobei 1,25 g (45,4%) der reinen Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurde.

40 360 MHz ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.82 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.27 (s, 2H), 5.99 (d, 2H), 4.90 (d, 1H, J=3.4 Hz), 4.73 (q, 1H, J=5.0 Hz), 4.65–4.60 (m, 2H), 4.41 (m, 1H), 4.25–4.15 (m, 2H), 3.75–3.65 (m, 5H), 3.72 (s, 6H), 3.60–3.23 (m, 9H), 2.91–2.80 (m, 1H), 1.38 (d, 3H, J=5.0 Hz).

146 MHz ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 11.16 and 10.96

50 (zwei Peaks wegen chiraalem Phosphor).

Massenspektrum (FAB), m/e, 812, 810, 808.

$\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{Cl}_3\text{NO}_{14}\text{P}$ benötigt M^+ (^{35}Cl) 809.

Beispiel 4

55

Etoposid-4'-thiophosphat-dinatriumsalz (Verbindung VIb)

60 Eine magnetisch gerührte Suspension von Etoposid (2,04 g, 3,47 mmol) in trockenem Acetonitril (175 ml) wurde erwärmt, wobei eine nahezu vollständige Lösung erhalten wurde. Die Lösung wurde auf Zimmertemperatur abkühlen gelassen, und dann wurde N,N-Diisopropylethylamin (2,00 ml, 11,5 mmol) dazugegeben. Die Mischung wurde dann auf 0°C abgekühlt und Thiophosphorylchlorid (0,720 g, 4,17 mmol) wurde durch eine Spritze während 30 Sek. zugegeben. Die Mischung wurde langsam auf Zimmertemperatur aufwärmen gelassen, während 2 bis 3 Std. und das Rühren wurde während 16 Std. bei Zimmertemperatur fortgesetzt. Die Mischung wurde dann auf 30 bis 35°C erwärmt und bei dieser Temperatur während zusätzlichen 4 Std. gehalten. Ein neuer Hauptfleck mit einem höheren R_f-Wert als Etoposid wurde

65

CH 676 716 A5

durch TLC beobachtet (5% Ethanol in Methylenchlorid). Die Reaktionsmischung wurde mit festem Natriumbicarbonat (7,4 g) behandelt und dann wurde entionisiertes Wasser (100 ml) zugegeben. Die Mischung wurde während 1,5 Std. bei 28 bis 25°C und 1,5 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Die Mischung wurde zwischen entionisiertem Wasser (200 ml), gesättigter, wässriger Bicarbonatlösung (30 ml) und Ethylacetat (300 ml) verteilt. Das weitere Aufarbeiten und die Umkehrphasenchromatographie wurde gemäss dem Verfahren in Beispiel 1 durchgeführt, wobei 1,03 g (40,8%) der reinen Titelverbindung als farblos-er Feststoff erhalten wurde.

360 MHz ^1H NMR (D_2O) δ 6.93 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.27 (s, 2H), 5.93 (d, 2H), 5.09 (d, 1H, $J=2.8$ Hz), 4.83 (q, 1H, $J=5.0$ Hz), 4.68 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 4.63 (d, 1H, $J=5.7$ Hz), 4.47–4.35 (m, 2H), 4.24 (dd, 1H, $J=4.3$ and 10.5 Hz), 3.64 (s, 6H), 3.67–3.52 (m, 3H), 3.47–3.29 (m, 3H), 3.17–3.07 (m, 1H), 1.31 (d, 3H, $J=5.0$ Hz).

Massenspektrum (FAB), m/e 728 (M^+), 706 ($\text{M}^+ + \text{H} - \text{Na}$). $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{Na}_2\text{O}_{15}\text{PS}$ benötigt M^+ , 728.

Beispiel 5

Etoposid-4'-[N,N-bis(2-chlorethyl)amino]-[N-(3-hydroxypropyl)amino]]phosphat
(VII, X=O, R¹=Methyl, R⁶=H, R²=R³=2-Chlorethyl, Y=NH(CH₂)₃OH)

Eine magnetisch gerührte Lösung einer Verbindung gemäss Beispiel 3 (280 mg, 0,346 mmol) in Methylenchlorid (3 ml) wurde mit einer Lösung von 3-Amino-1-propanol (33,5 mg, 0,446 mmol) in Methylenchlorid (1 ml) behandelt. Nach 5 Min. wurde zusätzliches 3-Amino-1-propanol (31,0 mg, 0,413 mmol) in absolutem Methanol (0,5 ml) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde durch direkte Applizierung auf vier präparative TLC-Platten gereinigt (1 mm, E. Merck-Kieselgel), wobei mit 5 bis 8% Methanol in Methylenchlorid entwickelt wurde. Die Elution der gewünschten Produktebande unter Verwendung von 5% Methanol in Ethylacetat und anschliessender Abdampfung im Vakuum und anschliessendem Trocknen bei 0,1 Torr ergab 185 mg (63%) der reinen Titelverbindung als farblos-er Feststoff (Mischung von Diastereomeren am Phosphor).

360 MHz ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.20 (br s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.50 and 6.48 (2s, 1H), 6.26 and 6.25 (2s, 2H), 5.97 (d, 2H), 4.88 (m, 1H), 4.73 (q, 1H), 4.64–4.57 (m, 2H), 4.40 (m, 1H), 4.21–4.13 (m, 2H), 3.71, 3.70 (2s, 6H), 3.71–3.06 (m, 18H), 2.90–2.80 (m, 1H), 1.37 (d, 3H).

Massenspektrum (FAB), m/e , 849, 851 ($\text{M}^+ + \text{H}$, ^{35}Cl , ^{37}Cl). $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_{15}\text{P}$ benötigt M^+ 848- (^{35}Cl) and 850 (^{37}Cl).

Beispiel 6

Etoposid-4'-[N,N-bis(2-chlorethyl)amino]-[N-[2-[3-nitro-pyridyl-2-yl]disulfid]ethyl]amino]]phosphat
(VII, X=O, R¹=Methyl, R⁶=H, R²=R³=2-Chlorethyl, Y=NH(CH₂)₂-SS-(3-nitropyridyl-2-yl))

Eine Mischung der Verbindung von Beispiel 3 (248 mg, 0,306 mmol) und 2-(3-Nitropyridyl)-1-(2-aminoethyl)disulfidhydrochlorid (105 mg, 0,393 mmol) wurde mit Methylenchlorid (7 ml) behandelt und anschliessend wurde Diisopropylethylamin (100 μl , 0,570 mmol) und trockener Methanol (0,5 ml) zugegeben. Die resultierende Lösung wurde bei Zimmertemperatur während 1,5 Std. gerührt und dann durch direkte Applikation auf vier präparative TLC-Platten gereinigt (1 mm, E. Merck-Kieselgel), wobei mit 4 bis 5% Methanol in Ethylacetat entwickelt wurde. Die Elution der gewünschten Produktebande unter Verwendung von 5% Methanol in Ethylacetat und anschliessende Abdampfung im Vakuum und weiteres Trocknen bei 0,1 Torr ergab 231,7 mg (75,3%) der reinen Titelverbindung als gelbbrauner Feststoff (Mischung von Diastereomeren beim Phosphor).

IR (KBr) 1774, 1598, 1584, 1559, 1509, 1486, 1456, 1421, 1397, 1342, 1236, 1160, 1128, 1096, 1038, 1004, 926, 857, 747, 699 cm^{-1} .

360 MHz ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.81 and 8.77 (2m, 1H), 8.48 (m, 1H), 7.33 (m, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.51 and 6.50 (2s, 1H), 6.26 (br s, 2H), 5.97 (d, 2H), 4.89 (m, 1H), 4.73 (q, 1H), 4.65–4.52 (m, 3H), 4.41 (m, 1H), 4.24–4.14 (m, 2H), 3.71, 3.70 (2s, 6H), 3.71–2.85 (m, 19H), 2.68 (br s, 1H, OH), 2.37 (br s, 1H, OH), 1.37 (d, 3H).

Massenspektrum (FAB), m/e , 1005, 1007 ($\text{M}^+ + \text{H}$, ^{35}Cl , ^{37}Cl). $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_{16}\text{PS}_2$ benötigt M^+ , 1004 (^{35}Cl) und 1006 (^{37}Cl).

Beispiel 7

Etoposid-4'-Diphenyl-phosphat (R¹=CH₃, R⁶=H, R⁷=R⁸=Phenyl)

Eine magnetisch gerührte Suspension von Etoposid (10,50 g, 17,84 mmol getrocknet über Phosphor-pentoxid bei 80°C/0,5 Torr) in trockenem Acetonitril (450 ml) wurde mit Diisopropylamin (4,20 ml, 24,1 mmol) behandelt und dann wurde Diphenylchlorphosphat (2,00 ml, 9,65 mmol) rein mit einer Spritze zugegeben. Die Mischung wurde unter Stickstoff während 2 Std. bei 50°C gerührt, wobei an diesem Punkt alles Etoposid aufgelöst war. Zusätzliches Diphenylchlorphosphat (1,80 ml, 8,68 mmol) wurde zugegeben

CH 676 716 A5

und die Reaktionsmischung während 72 Std. auf 45°C gehalten. Nach der Zugabe von zusätzlicher Aminbase (0,75 ml, 4,3 mmol) und Diphenylchlorphosphat (0,8 ml, 3,86 mmol) wurde die Mischung bei 40 bis 45°C während 27 Std. gerührt, mit mehr Diphenylchlorphosphat (0,40 ml, 1,93 mmol) behandelt und während 22 Std. bei 40 bis 45°C gehalten. Dann wurde Isopropanol (20 ml) zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der feste Rückstand in Methylenchlorid (500 ml) aufgelöst und mit Wasser verteilt (400 ml). Die wässrige Phase wurde weiter mit Methylenchlorid (100 ml) extrahiert und die kombinierten organischen Extrakte wurden mit Kochsalzlösung (250 ml) gewaschen und getrocknet (Natriumsulfat/Magnesiumsulfat). Rotationsverdampfung, gefolgt durch Flash-Chromatographie auf Kieselgel unter Verwendung von 2 bis 3% Methanol in Methylenchlorid ergab 12,50 g (85%) der reinen Titelverbindung als farbloser Feststoff.

FAB MS m/e (relative Intensität) 820 (M+H)⁺.
IR (KBr) 3460, 2925, 1775, 1601, 1490 cm⁻¹.
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.28 (m, 8H), 7.15 (m, 2H), 6.78 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 5.95 (m, 2H), 4.85 (d, J=3.5 Hz, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.60 (d, J=7.6 Hz, 1H), 4.56 (d, J=5.1 Hz, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.22–4.13 (m, 2H), 3.72–3.60 (m, 1H), 3.48 (s, 6H), 3.54–3.28 (m, 3H), 3.23 (dd, J=14.2, 5.3 Hz, 1H), 2.78 (m, 1H), 1.35 (d, J=5.1 Hz, 3H).
Analyse berechnet für C₄₁H₄₁O₁₆P: C, 60.00; H, 5.04
Gefunden: C, 60.20; H, 5.16.

20 Beispiel 8

Etoposid-4'-phosphat (V, R¹=CH₃, R⁶=H, R⁷=R⁸=H)

Platinoxid (0,198 g, 0,87 mmol) aus einer frisch geöffneten Flasche (Aldrich Chemical Co.) wurde zu einer Lösung von Etoposid-4'-diphenylphosphat (Produkt von Beispiel 7, 0,79 g, 0,962 mmol) in 95 ml absolutem Ethanol gegeben. Die Lösung wurde auf einem Parr-Apparat unter einem Druck von 45 bis 50 PSI während 4 Std. bei Zimmertemperatur hydriert. Die Reaktionsmischung wurde durch einen Celit-Bausch filtriert, wobei Ethanol als Elutionsmittel verwendet wurde. Die Konzentration im Vakuum und das Trocknen über Phosphorpentoxid während 14 Std. im Vakuum ergab das gewünschte Produkt als weissen Feststoff (0,627 g, 94%):

FAB MS m/e (relative Intensität) 669 (M+H)⁺
IR (KBr) 3440, 2930, 1778, 1604, 1498 cm⁻¹.
¹H NMR (DMSO-d₆) δ 6.93 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.12 (s, 2H), 5.94 (m, 2H), 5.17 (bs, 1H), 4.86 (d, J=3.93 Hz, 1H), 4.64 (q, J=7.5, 5.8 Hz, 1H), 4.51–4.42 (m, 2H), 4.20 (d, J=10.7 Hz, 1H), 4.01 (dd, J=12.1, 5.3 Hz, 1H), 3.51 (s, 6H), 3.51–2.75 (m, 7H), 2.83 (m, 1H), 1.16 (d, J=5.1 Hz, 3H).
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 174.5, 151.2, 151.1, 147.7, 146.2, 126.1, 132.3, 128.8, 109.8, 109.7, 107.9, 101.5, 101.2, 98.5, 80.0, 74.3, 72.7, 71.7, 67.6, 67.2, 65.7, 55.8, 43.0, 37.1, 20.2, 18.5.
Analyse berechnet für C₂₉H₃₃O₁₆P. 0.85% H₂O: C, 50.95; H, 5.11
Gefunden: C, 51.42; H, 4.97.

40 Beispiel 9

Etoposid-4'-bis(2,2,2-trichlorethyl)phosphat (VIII, R⁶=CH₃, R¹=H, R⁷=R⁸=CH₂CCl₃)

Das Verfahren gemäss Beispiel 7 wurde wiederholt, wobei bis(2,2,2-Trichlorethyl)chlorphosphat verwendet wurde und anschliessend eine Flash-Chromatographie auf Kieselgel durchgeführt wurde und die Titelverbindung in 100% Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten wurde.

IR (KBr) 1780, 1610, 1490, 1415, 1345, 1240, 1040, 960, 725 cm⁻¹.
300 MHz ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.81 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.27 (s, 2H), 5.98 (dd, 2H), 4.88 (d, 1H, J=3.4 Hz), 4.82–4.70 (m, 5H), 4.64 (d, 1H, J=7.6 Hz), 4.61 (d, 1H, J=5.3 Hz), 4.41 (dd, 1H), 4.25–4.13 (m, 2H), 3.75 (m, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.56 (m, 1H), 3.43 (dd, 1H), 3.34–3.24 (m, 3H), 2.91–2.82 (m, 1H), 1.38 (d, 3H, J=4.9 Hz).

Massenspektrum (FAB), m/e = 928.9848 (M⁺+H).
C₃₃H₃₆Cl₆O₁₆P benötigt 928.9872.

55 Beispiel 10

Etoposid-4'-phosphat-dinatriumsalz aus Etoposid-4'-phosphat

60 Verfahren A

Kommerzielles Dowex 50 × 8–100 Kationenaustauscherharz in der H-Form (20 g, Aldrich Chemical Co.) wurde mit einem Überschuss 1N NaOH behandelt. Das resultierende Harz in der Na⁺-Form wurde in eine 2 cm-Säule gepackt und mit Wasser equilibriert. Das Etoposid-4'-phosphat (Produkt des Beispiels 8, 1,25 g, 1,87 mmol), in 25 ml entionisiertem Wasser aufgelöst, wurde oben auf die gepackte Säule

CH 676 716 A5

gegeben und die Säule wurde mit Wasser eluiert. Fraktionen, welche die Titelverbindung enthielten, wurden gepoolt, filtriert und gefriergetrocknet, wobei 1,15 g der Titelverbindung in Form eines weissen, flockigen Materials erhalten wurde.

5 Verfahren B

10 Zu 2,90 g (4,34 mmol) des rohen Etoposid-4'-phosphats (Produkt aus Beispiel 8) wurde entionisiertes Wasser (50 ml) und Natriumbicarbonat (3,00 g, 35,7 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur während 30 Min. gerührt, wobei während dieser Zeit die CO₂-Entwicklung aufhörte. Die Mischung wurde dann wie in Beispiel 1 beschrieben, chromatographiert. Die Elution mit entionisiertem Wasser (300 ml) und dann 4:1 Wasser/Methanol ergab 1,90 g (61%) der reinen Titelverbindung in Form eines flockigen Feststoffes, nach der Gefrier Trocknung.

15 Beispiel 11

Das allgemeine in Beispiel 2 beschriebene Verfahren wurde wiederholt, mit der Ausnahme, dass das verwendete Diethylamin durch die nachstehend aufgelisteten Amine ersetzt wurde, wobei die entsprechenden Etoposid-4'-phosphordiamidate erhalten wurden.

Amin	Verbindung VII (X = O, R ¹ = Methyl, R ⁶ = H, Y = NR ² R ³)	
	R ²	R ³
Propylamin	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
25 Ethanolamin	H	CH ₂ CH ₂ OH
Methoxyethylamin	H	CH ₂ CH ₂ OCH ₃
N-Acetylethylendiamin	H	CH ₂ CHNC(O)CH ₃
2-Methylallylamin	H	CH ₂ CH(CH ₃)=CH ₂
30 Allylamin	H	CH ₂ CH=CH ₂
Dimethylaminopropylamin	H	(CH ₂)N(CH ₃) ₂
N-Methylethylendiamin	H	CH ₂ CH ₂ NCH ₃
Trifluorethylamin	H	CH ₂ CF ₃
35 2-Aminoethanthiol	H	CH ₂ CH ₂ SH
Cyclohexylamin	H	Cyclohexyl
2-Amino-1-methoxypropan	H	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃
40 2-(Ethylthio)-ethylamin	H	CH ₂ CH ₂ SCH ₂ CH ₃
Chloretylamin	H	CH ₂ CH ₂ Cl
4-Aminocyclohexanol	H	
Ethylmethylamin	CH ₃	CH ₂ CH ₃
45 Ethylbutylamin	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃
Methylaminoethanol	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
bis(2-Chloretyl)amin	CH ₂ CH ₂ Cl	CH ₂ CH ₂ Cl
2-Propylaminoethanol	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
50 3-Methylaminopropionitril	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CN
Piperidin	R ² +R ³ =	-(CH ₂) ₅ -

55 Beispiel 12

Das allgemeine in Beispiel 3 beschriebene Verfahren wird wiederholt mit der Ausnahme, dass das verwendete bis(2-Chloretyl)amin durch die Amine, welche nachstehend aufgelistet sind, ersetzt wird, wobei die entsprechenden Chlorphosphoramidate erhalten werden.

60

65

CH 676 716 A5

	Amin	Verbindung VII (X = O, R ¹ = Methyl, R ⁶ = H, Y = Cl)	
		R ²	R ³
5	Propylamin	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
	Ethanolamin	H	CH ₂ CH ₂ OH
	Methoxyethylamin	H	CH ₂ CH ₂ OCH ₃
	N-Acetylethylendiamin	H	CH ₂ CHNC(O)CH ₃
10	2-Methylallylamin	H	CH ₂ CH(CH ₃)=CH ₂
	Allylamin	H	CH ₂ CH=CH ₂
	Dimethylaminopropylamin	H	(CH ₂)N(CH ₃) ₂
	N-Methylethylendiamin	H	CH ₂ CH ₂ NCH ₃
15	Trifluorethylamin	H	CH ₂ CF ₃
	2-Aminoethanthiol	H	CH ₂ CH ₂ SH
	Cyclohexylamin	H	Cyclohexyl
	2-Amino-1-methoxypropan	H	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃
20	2-(Ethylthio)-ethylamin	H	CH ₂ CH ₂ SCH ₂ CH ₃
	Chlorethylamin	H	CH ₂ CH ₂ Cl
	4-Aminocyclohexanol	H	4-OH Cyclohexyl
25	Ethylmethylamin	CH ₃	CH ₂ CH ₃
	Ethylbutylamin	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃
	Methylaminoethanol	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
	Diethylamin	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃
30	2-Propylaminoethanol	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
	3-Methylaminopropionitril	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CN
	Piperidin	R ² +R ³ =	-(CH ₂) ₅ -

35

Beispiel 13

Das allgemeine Verfahren gemäss Beispiel 5 wird wiederholt mit der Ausnahme, dass das verwendete 3-Aminopropanol durch die folgenden Amine ersetzt wird, wobei die entsprechenden asymmetrische Eto-

40

45

50

55

60

65

CH 676 716 A5

	Amin	Verbindung VII (X = O, R ¹ = Methyl, R ⁶ = H, Y = NR ⁴ R ⁵ , R ² = R ³ = CH ₂ CH ₂ Cl)	
		R ⁴	R ⁵
5	Propylamin	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
	Ethanolamin	H	CH ₂ CH ₂ OH
	Methoxyethylamin	H	CH ₂ CH ₂ OCH ₃
10	N-Acetylethylendiamin	H	CH ₂ CHNC(O)CH ₃
	2-Methylallylamin	H	CH ₂ CH(CH ₃)=CH ₂
	Allylamin	H	CH ₂ CH=CH ₂
	Dimethylaminopropylamin	H	(CH ₂)N(CH ₃) ₂
15	N-Methylethylendiamin	H	CH ₂ CH ₂ NCH ₃
	Trifluorethylamin	H	CH ₂ CF ₃
	2-Aminoethanthiol	H	CH ₂ CH ₂ SH
	Cyclohexylamin	H	Cyclohexyl
20	2-Amino-1-methoxypropan	H	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃
	2-(Ethythio)-ethylamin	H	CH ₂ CH ₂ SCH ₂ CH ₃
	Chlorethylamin	H	CH ₂ CH ₂ Cl
25	4-Aminocyclohexanol	H	4-OH Cyclohexyl
	Ethylmethylamin	CH ₃	CH ₂ CH ₃
	Ethylbutylamin	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃
	Methylaminoethanol	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
30	bis(2-Chlorethyl)amin	CH ₂ CH ₂ Cl	CH ₂ CH ₂ Cl
	2-Propylaminoethanol	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
	3-Methylaminopropionitril	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CN
35	Piperidin	R ² +R ³ =	-(CH ₂) ₅ -

Beispiel 14

Das allgemeine im Beispiel 7 beschriebene Verfahren wird wiederholt mit der Ausnahme, dass das verwendete Diphenylchlorophosphat durch die nachstehend aufgelisteten Chlorophosphate ersetzt wird, wobei die entsprechenden Etoposid-4'-phosphat-diester erhalten werden (X=O, R¹=Methyl, R⁶=H, R⁷=R⁸=R, wie nachstehend beschrieben).

Chlorophosphate [(RO)₂P(O)Cl]

- 45 R = Methyl
- Ethyl
- Benzyl
- p-Nitrobenzyl
- p-Nitrophenyl
- 50 p-Brombenzyl
- p-Nitrophenethyl
- Cyanoethyl
- o-(t-Butyl)phenyl

55 Beispiel 15

Die allgemeinen Verfahren, beschrieben in den Beispielen 1 bis 16, wurden wiederholt mit der Ausnahme, dass die verwendeten Etoposid-Ausgangsmaterialien durch die entsprechenden Teniposidverbindungen ersetzt wurden, wobei die entsprechenden Teniposid-Produkte erhalten wurden.

60 Beispiel 16

Teniposid-4'-phosphatdinatriumsalz

65 Eine magnetisch gerührte Suspension von Teniposid (4,00 g, 6,10 mmol) in trockenem Acetonitril

CH 676 716 A5

(340 ml) wurde aufgewärmt, wobei eine vollständige Lösung erhalten wurde. Die Lösung wurde dann auf 0°C abgekühlt und N,N-Diisopropylethylamin (3,72 ml, 21,34 mmol) wurde zugegeben. Phosphoroxychlorid (1,04 g, 0,77 mmol) wurde mittels einer Spritze während 1 min zur Mischung gegeben. Die Mischung wurde während 2 bis 3 h langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und das Rühren wurde bei Zimmertemperatur während 24 h fortgesetzt. Am Ende dieser Zeitperiode wurde 300 ml deionisiertes H₂O zugegeben und das gesamte Volumen wurde unter Vakuum auf 50 ml reduziert. Die konzentrierte Mischung wurde mit einer Natriumbicarbonat-Lösung (9,36 g, 111,38 mmol) in deionisiertem Wasser (200 ml) behandelt, die Mischung wurde bei Zimmertemperatur während 2 h gerührt und dann mit Ethylacetat (3 × 100 ml) verteilt. Die wässrige Phase wurde dann einem Vakuum von 0,5 mm bei Zimmertemperatur während 1 h unterworfen, um die aufgelösten Lösungsmittel zu entfernen. Der wässrige Teil wurde dann auf eine Säule mit einem Durchmesser von 4 cm aufgetragen, welche 15 cm Octadecylsilan gebunden an Silicagel enthält, welches in Methanol gepackt und in Wasser equilibriert wurde. Nachdem der gesamte wässrige Teil aufgetragen war, wurde die Säule mit H₂O (300 ml) eluiert, um die anorganischen Salze zu entfernen und dann wurde das Produkt mit 4:1 H₂O:CH₃OH eluiert. Die Produkte-Fractionen wurden im Vakuum auf 300 ml konzentriert, dann gefroren und gefriergetrocknet, wobei 1,09 g (23%) der reinen Titelverbindung als watteartiger, weisser Feststoff erhalten wurde.

IR(KBr) 3421, 2981, 2896, 1773, 1593, 1507, 1485, 1466, 1422, 1384, 1335, 1287, 1236, 1101, 1075, 1040, 988, 927, 853, 809, 768, 711, 552 cm⁻¹.

360 MHz ¹HNMR (D₂O) δ 7,44 (d, 1H, J=3,6 Hz), 7,22 (d, 1H, J=3,6 Hz), 7,03 (t, 1H, J=3,6 Hz), 6,94 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 6,28 (s, 2H), 5,95 (d, 2H, J=7,2 Hz), 5,91 (s, 1H), 5,1 (d, 1H, J=2,5 Hz), 4,41 (m, 4H), 3,86 (t, 1H, J=9,4 Hz), 3,64 (s, 6H), 3,60–3,36 (m, 5H), 3,35 (t, 1H, 7,2 Hz), 3,13 (m, 1H).

Massenspektrum (FAB), m/e, 781 (M⁺+H). C₃₂H₃₁O₁₆SPNa₂ erfordert M⁺, 780

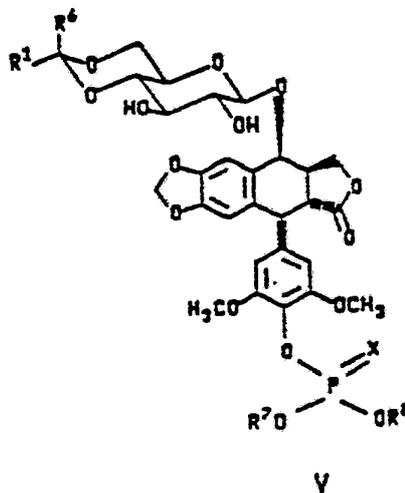
Massenspektrum mit hoher Auflösung C₃₂H₃₁O₁₆SPNa₂

berechnet: 781,0944

gefunden: 781,0947

Patentansprüche

1. Verbindungen der Formel



worin

R⁶ Wasserstoff ist und R¹ C₁₋₁₀-Alkyl, C₁₋₁₀-Alkenyl, C₅₋₆-Cycloalkyl, 2-Furyl, 2-Thienyl, C₆₋₁₀-Aryl, C₇₋₁₄-Aralkyl oder C₈₋₁₄-Aralkylen ist, worin die aromatischen Ringe mit einem oder mehreren der Reste Halogen, C₁₋₈-Alkyl, C₁₋₈-Alkoxy, Nitro oder Amino substituiert sein können oder R¹ und R⁶ beide C₁₋₈-Alkyl sind; oder R¹ und R⁶ und das Kohlenstoffatom, an welches sie gebunden sind, eine C₅₋₆-Cycloalkylgruppe bilden;

X Sauerstoff oder Schwefel ist;

R⁷ und R⁸ Wasserstoff, C₁₋₅-Alkyl, A-substituiertes C₁₋₅-Alkyl, C₂₋₆-Cycloalkyl, A-substituiertes C₃₋₆-Cycloalkyl, C₆₋₁₀-Aryl, A-substituiertes Aryl, Aryl-substituiertes Aryl, C₇₋₁₄-Aralkyl, A-substituiertes Aralkyl oder Alkyl-substituiertes Aralkyl, worin die genannten A-Substituenten Hydroxy, Alkoxy, Alkanoyloxy, Cyano, Amino, Alkylamino, Dialkylamino, Carboxy, Alkylthio, Mercapto, Mercaptothio, Nitropyridyldisulfid, Alkanoylamino, Alkanoyl, Carbamoyl, Nitro oder Halogen bedeuten;

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon.

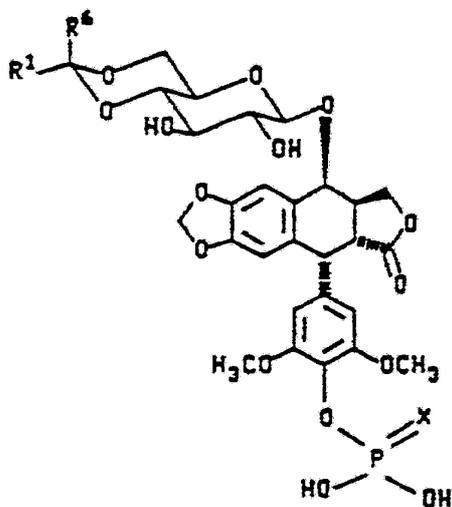
2. Verbindungen gemäss Anspruch 1 der Formel

5

10

15

20



worin R¹, R⁶ und X wie im Anspruch 1 definiert sind oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon.

25

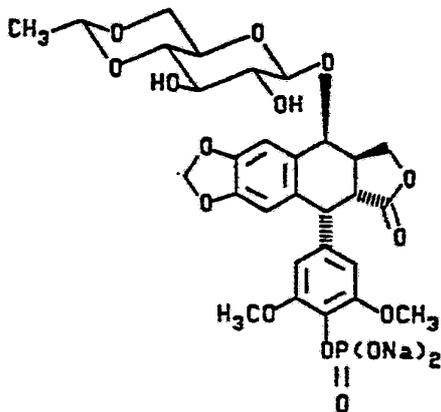
3. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das pharmazeutisch annehmbare Salz das Natriumsalz ist.

4. Etoposid-4'-phosphat-dinatriumsalz der Formel

30

35

40



45

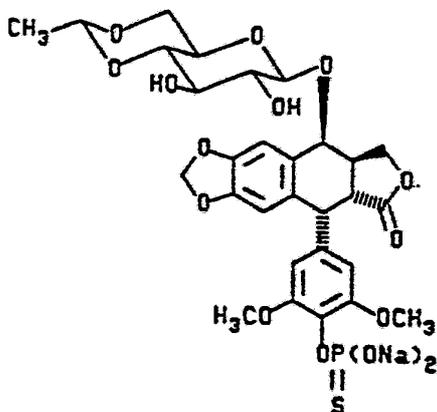
als Verbindung gemäss Anspruch 1.

5. Etoposid-4'-thiophosphat-dinatriumsalz der Formel

50

55

60



65

als Verbindung gemäss Anspruch 1.

6. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einer der Reste R⁷ und R⁸ von Wasserstoff verschieden ist.

7. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 3 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass R⁶ Wasserstoff ist und R¹ Methyl oder 2-Thienyl ist.

8. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 6 oder 7, worin R⁷ und R⁸ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus C₁₋₅-Alkyl; Halogen-substituiertem C₁₋₅-Alkyl, Cyan-substituiertes C₁₋₅-Alkyl, C₆₋₁₀-Aryl oder C₇₋₁₄-Aralkyl ist, wobei der Ring der genannten Aryl- und Aralkylgruppen gegebenenfalls mit Alkyl, Halogen oder Nitro substituiert ist.

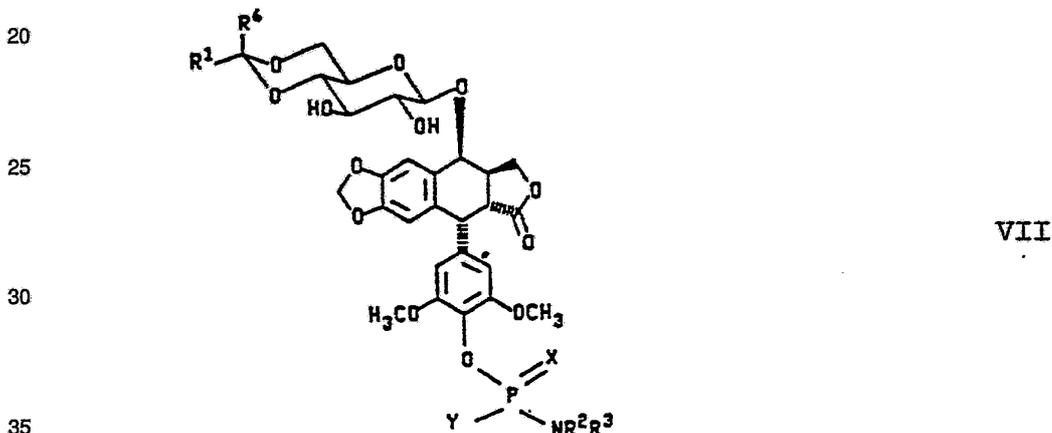
9. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 3, 6, 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ Methyl ist.

10. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 3, 6, 7, 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass X Sauerstoff ist.

11. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 3, 6, 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass X Sauerstoff ist und R⁷ und R⁸ je Phenyl sind.

12. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 3, 6, 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass X Sauerstoff ist und R⁷ und R⁸ je 2,2,2-Trichlorethyl sind.

13. Verbindungen der Formel



worin R¹, R⁶ und X wie im Anspruch 1 definiert sind, Y Cl, OH oder NR⁴R⁵ ist; R², R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander Wasserstoff, C₁₋₅-Alkyl, C₂₋₅-Alkenyl, C₃₋₆-Cycloalkyl, A-substituiertes C₁₋₅-Alkyl, A-substituiertes C₂₋₅-Alkenyl, A-substituiertes, C₃₋₆-Cycloalkyl bedeuten oder R², R³ und das Stickstoffatom, an welches sie gebunden sind, einen 3- bis 6-gliedrigen Ring darstellen; oder R⁴, R⁵ und das Stickstoffatom, an welches sie gebunden sind, zusammen einen 3- bis 6-gliedrigen Ring bilden, wobei die genannten A-Substituenten, wie im Anspruch 1 definiert sind oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon.

14. Verbindungen gemäss Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass R⁶ Wasserstoff ist, R¹ Methyl oder 2-Thienyl ist, Y Cl oder NR⁴R⁵ ist, X Sauerstoff oder Schwefel ist und R², R³, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander Wasserstoff, C₁₋₅-Alkyl, Halogen-substituiertes C₁₋₅-Alkyl, Hydroxy-substituiertes C₁₋₅-Alkyl oder Nitropyridyl-disulfid-substituiertes C₁₋₅-Alkyl bedeuten.

15. Verbindung gemäss Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass X Sauerstoff ist.

16. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ Methyl ist.

17. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass R² und R³ je 2-Chlorethyl bedeuten und Y Cl ist.

18. Verbindungen gemäss Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass Y NR⁴R⁵ ist.

19. Verbindungen gemäss Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass R², R³, R⁴ und R⁵ je Ethyl bedeuten.

20. Verbindungen gemäss Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass R² und R³ je 2-Chlorethyl bedeuten, R⁴ Wasserstoff ist und R⁵ 3-Hydroxypropyl ist.

21. Verbindungen gemäss Anspruch 16, worin R² und R³ je Chlorethyl sind, R⁴ Wasserstoff und R⁵



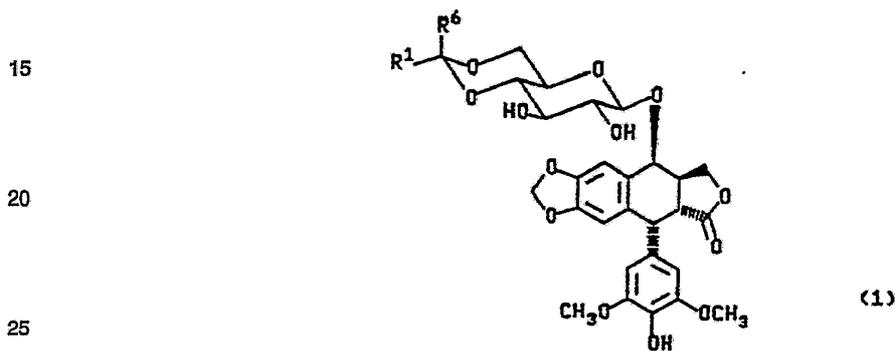
22. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 bis 21, als Mittel für die Hemmung von Tumoren bei Säugetieren.

23. Etoposid-4'-phosphat-dinatriumsalz als Verbindung gemäss Anspruch 22.

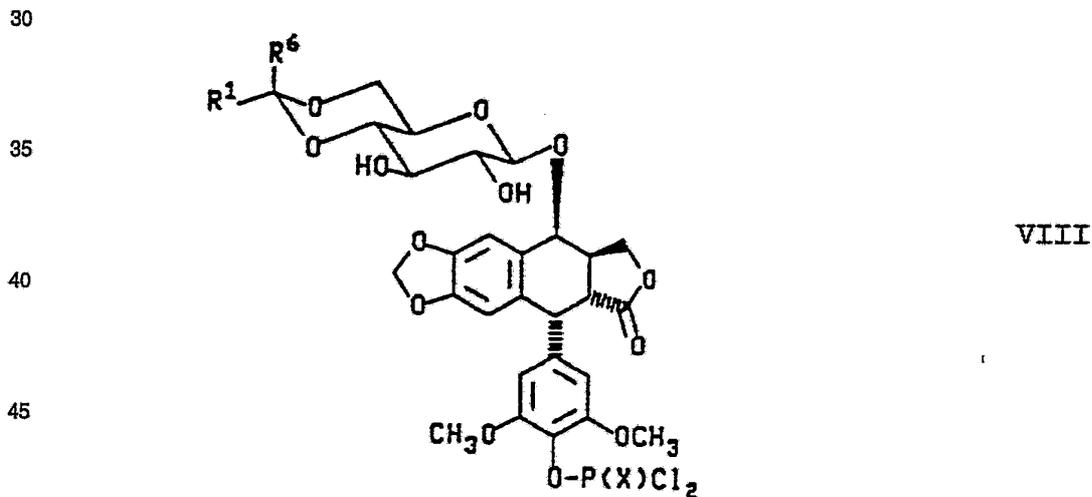
24. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Antitumor-wirksame Menge einer Verbindung gemäss Anspruch 22 oder 23 und einen pharmazeutischen annehmbaren Träger enthält.

25. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel V gemäss Anspruch 1, worin R¹, R⁶ und X die im Anspruch 1 angegebene Bedeutung besitzen und R⁷ und R⁸ Wasserstoff sind oder eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes davon, dadurch gekennzeichnet, dass

a) eine Verbindung der Formel 1



mit einer Verbindung der Formel P(X)Cl₃ in Gegenwart eines Wasserstoff-Akzeptors umgesetzt wird, wobei das Zwischenprodukt der Formel VIII



erhalten wird und

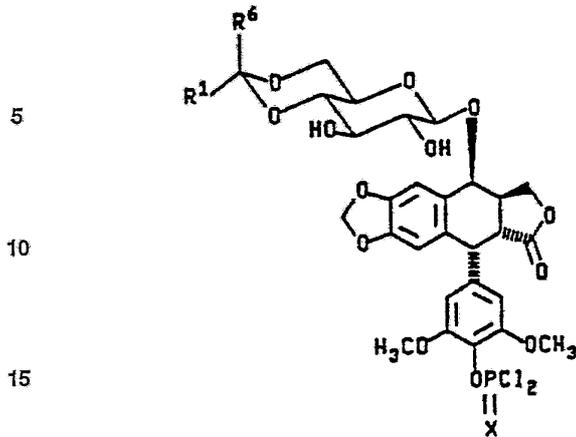
b) die erhaltene Verbindung der Formel VIII hydrolysiert wird und gegebenenfalls in ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon übergeführt wird.

26. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel V gemäss Anspruch 1, worin R¹, R⁶ und X die im Anspruch 1 angegebene Bedeutung besitzen oder eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes davon, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel I gemäss der Definition im Anspruch 25 mit einer Verbindung der Formel P(X)Cl₃ in Gegenwart eines Wasserstoff-Akzeptors umgesetzt wird, wobei das Zwischenprodukt der Formel 2 gemäss der Definition im Anspruch 25 erhalten wird und

c) die erhaltene Verbindung der Formel 2 mit mindestens einem Äquivalent von je R⁷ OH und R⁸ OH umgesetzt wird, wobei R⁷ und R⁸ wie im Anspruch 1 definiert sind, wobei mindestens einer der Reste von Wasserstoff verschieden ist, und in Gegenwart eines Wasserstoff-Akzeptors umgesetzt wird und falls einer der Reste R⁷ und R⁸ Wasserstoff ist, die erhaltene Verbindung gegebenenfalls durch Basenbehandlung in ein pharmazeutisch annehmbares Salz übergeführt wird.

27. Verbindung der Formel

65

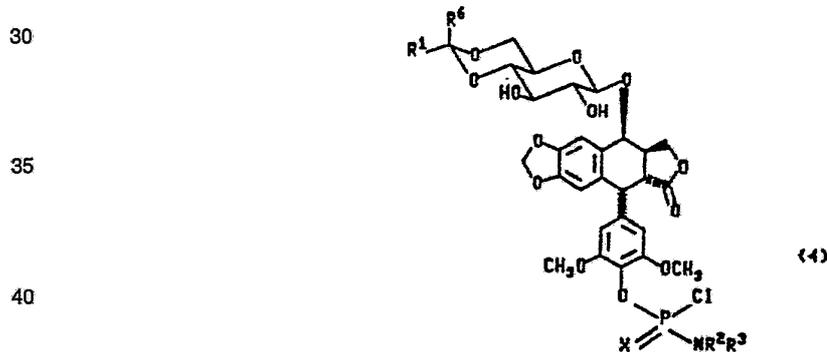


VIII

als Zwischenprodukt im Verfahren gemäss Anspruch 25 oder 26, worin R¹, R⁶ und X wie im Anspruch 1 definiert sind.

20 28. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäss Anspruch 13, worin R¹, R², R³, R⁶ und X wie im Anspruch 13 definiert sind und Y Cl ist, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zwischenprodukt der Formel 2 gemäss der Definition im Patentanspruch 25 mit einem Amin der Formel HNR²R³, worin R² und R³ wie im Anspruch 18 definiert sind oder einem Säureadditionssalz davon umgesetzt wird.

25 29. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäss Anspruch 13, worin R¹, R², R³, R⁶ und X wie im Anspruch 13 definiert sind und Y OH bedeutet oder eines pharmazeutischen annehmbaren Salzes davon, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zwischenprodukt der Formel 2 gemäss der Definition im Anspruch 25 mit einem Amin der Formel HNR²R³ umgesetzt wird, wobei eine Verbindung der Formel 4



erhalten wird und die erhaltene Verbindung der Formel 4 in Gegenwart einer Base hydrolysiert wird und die erhaltene Verbindung gegebenenfalls in pharmazeutisch annehmbares Salz übergeführt wird.

45 30. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäss Anspruch 13, worin R¹, R², R³, R⁶ und X wie im Anspruch 13 definiert sind und Y NR⁴R⁵ bedeutet, wobei R⁴ und R⁵ wie im Anspruch 13 definiert sind oder eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes davon, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zwischenprodukt der Formel 2 gemäss Anspruch 25 mit einem Amin der Formel HNR²R³ oder einem Säureadditionssalz davon umgesetzt wird, wobei eine Verbindung der Formel 4 gemäss der Definition von Anspruch 29 erhalten wird und die erhaltene Verbindung der Formel 4 mit einem zweiten Amin der Formel HNR⁴R⁵ umgesetzt wird und die erhaltene Verbindung gegebenenfalls in ein Säureadditionssalz übergeführt wird.

50 31. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel VIII, worin R¹, R⁶ und X wie im Anspruch 1 definiert sind oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon, dadurch gekennzeichnet, dass
55 a) eine Verbindung der Formel IX

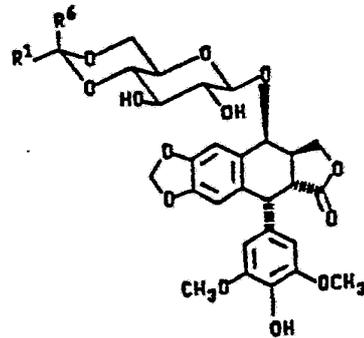
60

65

5

10

15



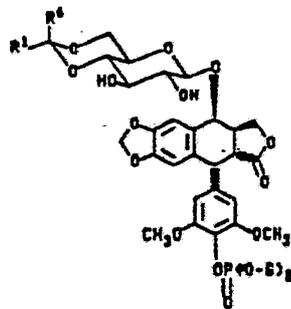
IX

20

mit einer Verbindung der Formel Hal-P(X)(OG)₂, worin Hal Halogen bedeutet und G eine Phosphat-
schutzgruppe ist, umgesetzt, wobei eine Verbindung der Formel X

25

30



X

35

erhalten wird

b) die Phosphatschutzgruppen entfernt werden und

c) die erhaltene Verbindung gegebenenfalls in ein pharmazeutisch annehmbares Salz überführt.

40

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion in Acetonitril oder
C₂₋₅-Alkyl-CN und in Gegenwart eines Trialkylamins durchgeführt wird.

45

50

55

60

65